

**BIOKOMPATIBILITÄT UND ANTIMIKROBIELLE WIR-
KUNG VON KALTEM ATMOSPHERISCHEM PLASMA**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von M. Sc. Sarah Fink

Gutachter:

1. Frau PD Dr. rer. nat. et med. habil. Uta-Christina Hipler
Klinik für Hautkrankheiten, Universitätsklinikum Jena

2. Frau Prof. Dr. Dagmar Fischer
Department Chemie und Pharmazie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

3. Herr Prof. Dr. Stefan Spange
Institut für Chemie, Technische Universität Chemnitz

Tag der Öffentlichen Verteidigung: 21.02.2023

INHALTSVERZEICHNIS

I	Abkürzungsverzeichnis	7
II	Zusammenfassung.....	9
1.	Einleitung.....	11
1.1.	Plasma – Begriffsdefinition und Einführung in die Plasmaphysik.....	11
1.2.	Plasmabestandteile und deren Wirkung auf biologische Systeme.....	12
1.2.1.	UV-Strahlung	12
1.2.2.	Reaktive Spezies.....	13
1.2.3.	Temperatur und Wärmestrahlung.....	14
1.3.	Gerätearten zur Erzeugung von Plasma	14
1.3.1.	Direktes Plasma.....	14
1.3.2.	Indirektes Plasma.....	15
1.4.	Wirkungsweise von Plasma auf eukaryotische Zellen	15
1.5.	Wirkung von Plasma auf prokaryotische Zellen.....	16
1.6.	Plasmamedizin	18
1.6.1.	Behandlung chronischer und akuter Wunden.....	18
1.6.2.	Tumorbehandlung.....	19
1.6.3.	Zahn- und Kieferheilkunde.....	19
1.6.4.	Weitere Anwendungsgebiete der Plasmamedizin	20
1.7.	Risikobewertung.....	20
1.8.	Aufbau und Funktion der Haut	21
1.9.	Hautmodelle.....	22
1.9.1.	Typen von 3D-Hautmodellen	23
Epidermismodelle.....	23	
3D-Vollhautmodelle.....	23	
1.10.	Biokompatibilität und Biofunktionalität.....	24
1.11.	Bedeutung von Hautinfektionen	25
2.	Ziele der Arbeit	27
3.	Methodik	29

3.1. Materialien	29
3.2. Zellbiologische Methoden	34
3.2.1. Zellkultur	34
HaCaT-Keratinocyten	34
Fibroblasten.....	35
Primäre Keratinocyten.....	35
3.2.2. Herstellung von kollagenbasierten 3D-Hautmodellen (CHM).....	36
3.2.3. Herstellung von inhärenten Hautmodellen (FDM).....	37
3.3. Plasmageräte.....	37
3.3.1. Plasmajet	37
3.3.2. DBD-Quelle.....	38
3.4. Molekularbiologische Methoden.....	39
3.4.1. RNA-Isolation	39
3.4.2. Entfernung von Fremd-DNA.....	40
3.4.3. Herstellung von cDNA-Reverse Transkription	40
3.4.4. Realtime qPCR.....	41
3.5. Biochemische Methoden	42
3.5.1. Zytotoxizitätsbestimmung.....	42
3.5.2. MTT-Viabilitätstest	42
3.5.3. Sekretionsanalyse	42
3.6. Histologische Methoden	43
3.6.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	44
3.6.2. Periodsäure-Schiff-Färbung (PAS-Färbung).....	44
3.6.3. Immunhistochemische Färbung.....	45
3.7. Bestimmung der antimikrobiellen Wirkung.....	46
3.7.1. Kultivierung von Bakterien	46
3.7.2. Kultivierung von Hefen.....	46
3.7.3. Untersuchung kontaminierter Agar-Oberflächen (Agar-Test)	46
3.7.4. Biofilm-Herstellung.....	46
3.7.5. Plasmabehandlung des Biofilms.....	46
CelltiterBlue®-Färbung.....	47
Kristallviolett-Färbung	47
3.8. Infektion und Plasmabehandlung von Hautmodellen (FDM).....	48
Analyse der Autofluoreszenz von <i>C. albicans</i>	48

3.9. Statistische Analyse	48
4. Ergebnisse	49
4.1. Untersuchungen zum Plasmajet	49
4.1.1. Antimikrobielle Wirkung	50
4.1.2. Biokompatibilität und Zytotoxizität	52
4.1.2.1. Viabilitätsuntersuchung mittels 2D-Kultur	52
4.1.2.2. 3D-Versuche am humanen Vollhautmodell	54
4.1.2.2.1. Genexpressionsanalyse.....	59
4.1.2.2.2. Untersuchung der Sekretion	63
4.2. Einfluss des Arbeitsgases	65
4.2.1. Biokompatibilität und Zytotoxizität	65
4.2.2. Genexpressionsanalyse.....	67
4.2.3 Sekretionsanalyse	71
4.3. Untersuchungen zur DBD-Plasmaquelle	73
4.3.1. Antimikrobielle Wirkung	73
4.3.1.1. Agar-Test.....	73
4.3.1.2. Antimikrobieller Effekt gegen Biofilme	75
4.3.2. Biokompatibilität und Zytotoxizität	77
4.3.2.1. Untersuchung der Viabilität mittels 2D-Kultur	78
4.3.2.2. 3D-Versuche mittels humanen Vollhautmodellen	79
4.3.2.2.1. Genexpressionsanalyse.....	81
4.3.2.2.2. Sekretionsanalyse	87
4.4. Wirkung von Plasma am 3D-Modell für kutane Candidose	89
4.4.1. Analyse der Autofluoreszenz	89
4.4.2. Histologische Untersuchungen und Analyse der Viabilität.....	90
4.4.3. Expressionsanalyse pro-inflammatorischer Zytokine	93
4.4.4. Expression antimikrobieller Peptide.....	95
4.4.5. Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine	96
5. Diskussion	97
5.1. Antimikrobielle Untersuchungen.....	97
5.1.1. Agar-Test.....	97
5.1.2. Biofilminaktivierung	100

5.2. Biokompatibilität und Zytotoxizität	104
5.3. Expression und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine	108
5.4. Untersuchung des Regenerationspotentials	111
5.5. Antimikrobielle Wirkung am 3D-Modell für kutane Candidose.....	113
5.5.1. Verringerung des mikrobiellen Wachstums	113
5.5.2. Expression und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine.....	115
5.5.3. Expression antimikrobielle Peptide	117
6. Schlussfolgerungen	119
III Literatur- und Quellenverzeichnis	122
IV Anhang	146
Danksagung.....	146
Tabellenverzeichnis	147
Abbildungsverzeichnis	148
Ehrenwörtliche Erklärung	154

I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMP	antimikrobielle Peptide
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNS)
CHM	kollagenbasiertes Hautmodell
DBD	Dielectric Barrier Discharge (dielektrische Barriereentladung)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNase	Desoxyribonuklease
ECM	extrazelluläre Matrix
eDNA	extrazelluläre DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FBS	Fetal Bovine Serum (fetales Kälberserum)
FDM	Fibroblast-derived matrix (Fibroblasten abgeleitete Matrix)
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fibroblastenwachstumsfaktor)
fw	forward (vorwärts)
hBD	humanes Betadefensin
HE	Hämatoxylin-Eosin
hFGF	Human Fibroblast Growth Factor (humaner Fibroblastenwachstumsfaktor)
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
KAP	kaltes atmosphärisches Plasma
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LTCC	Low Temperature Cofired Ceramic (Niedertemperatur-Einbrand-Keramiken)
MAPK	mitogen-aktivierte-Proteine-Kinase
MTP	Mikrotiterplatte
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PAS	Periodic Acid-Schiff-Reaction (Periodsäure-Schiff-Reaktion)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

PRR	Pattern Recognition Receptors (Mustererkennungsrezeptoren)
PSF	Penicillin/Streptomycin/Fungizone
rev	reverse (rückwärts)
RNase	Ribonuklease
RNS	reaktive Stickstoffspezies
RONS	reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	real-time quantitative PCR (quantitative Echtzeit-PCR)
SDA	Sabouraud-Dextrose-Agar
T ₃	Trijodthyronin
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TLR	Toll-like Rezeptoren
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNFα	Tumornekrosefaktor-alpha
TSB	Trypton-Soja-Bouillon

II ZUSAMMENFASSUNG

Alternative Behandlungsmethoden zu Antibiotika sind aufgrund der stetig steigenden mikrobiellen Resistenzen von großer Bedeutung. Kaltes atmosphärisches Plasma besitzt durch seine antimikrobiellen Eigenschaften und erwarteter guter Zellverträglichkeit ein hohes therapeutisches Potential. Angesichts der Variabilität der unterschiedlichen Plasmageräte ist die Prüfung der Biofunktionalität und Biokompatibilität jedes Typs essentiell. Erste Bewertungen der Verträglichkeit erfolgen meist anhand von 2D-Kulturen. Daher wurden erste Versuche zur Zellverträglichkeit eines gepulsten Plasmajets und einer DBD-Quelle anhand von 2D-Zellkultur vergleichend durchgeführt. Hier zeigte sich eine stark schädigende Wirkung des Plasmas bei beiden Plasmageräten. Diese Art dieser Prüfung spiegelt in *in vivo* Bedingungen nur ungenügend wider. Das Mittel der Wahl sind meist Tierversuche, beispielsweise an Mäusen. Es gibt jedoch deutliche Unterschiede zwischen muriner und humaner Haut, was eine direkte Übertragung der Testergebnisse schwierig macht. Humane 3D-Hautmodelle stellen den grundlegenden Aufbau der Haut nach und bilden ein Intermediat zwischen 2D-Kultur und Tierversuchen. Daher wurden die Untersuchungen auf ein humanes 3D-Vollhautmodell übertragen um die Biokompatibilität anwendungsnah zu bewerten. Dem gegenüber sollte die antimikrobielle Wirkung in Form der Biofunktionalität gestellt werden.

Die Analyse der antimikrobiellen Wirkung zeigte für beide Plasmaquellen einen sehr guten Effekt. Dieser war abhängig von Arbeitsgas und Geräteaufbau. Die antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber verschiedener Biofilme war dagegen deutlich verringert.

Bei der Biokompatibilität zeigte sich beim Plasmajet für niedrige Leistung oder geringe Behandlungszeiten eine gute Verträglichkeit. Hohe Behandlungszeiten oder ein gesteigerter Leistungseinsatz führten jedoch zur Schädigung der Hautmodelle. Im Gegensatz dazu war bei den gewählten Parametern der DBD-Plasmaquelle keine sichtbare Schädigung erkennbar.

Ein grundlegendes Ziel dieser Arbeit war die Erforschung der antimikrobiellen Wirkung am 3D-Hautmodell. Aufgrund der sehr guten Biokompatibilität sowie antimikrobiellen Wirkung hatte die DBD-Plasmaquelle das größte Anwendungspotential und wurde daher für die Untersuchungen am Infektionsmodell genutzt. *Candida albicans* ist der häufigste Erreger invasiver Pilzinfektionen und ist in der Lage Resistenzen gegen herkömmliche Antimykotika zu entwickeln. Die komplexe Interaktion zwischen Plasma, mikrobiellen Erregern und dem Gewebe ist in der Literatur kaum erforscht. Daher wurde in dieser Arbeit ein 3D-Candidosemodell etabliert um die Plasmawirkung mittels DBD-Plasmaquelle zu untersuchen und einen ersten Einblick in den Zusammenhang zwischen Plasma und Erreger am Gewebe zu erhalten. Die Hautmodelle

reagierten auf die Infektion mit *Candida* mit einer gesteigerten Expression und Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen sowie Expression antimikrobieller Peptide, was für eine Infektion charakteristisch ist. Die Plasmabehandlung der infizierten Hautmodelle führte zu einem Rückgang des Hyphenwachstums sowie der untersuchten Infektionsmarker. Die DBD-Plasmaquelle ist daher für die antimikrobielle Dekontamination der Haut geeignet.

Grundsätzlich sollte geklärt werden, ob 3D-Hautmodelle ein geeignetes System für die Untersuchung von KAP darstellen. Neben der Analyse der antimikrobiellen Wirkung am 3D-Hautmodell sollten daher Plasmaeffekte aus der Literatur vergleichend am 3D-Hautmodell erforscht werden. Diese wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen anhand von 2D-Kulturen oder Mausmodellen nachgewiesen und beziehen sich vor allem auf die Expression und Sekretion von Zytokinen sowie Markern des Regenerationspotentials. Es galt zu klären, ob die jeweiligen Plasmageräte unterschiedliche Reaktionen in den Hautmodellen auslösen. Die Plasmabehandlung mittels Plasmajet führte zur gesteigerten Expression und Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, Wachstumsfaktoren sowie Proliferationsmarkern. Dies könnte bei verträglichen Parametern ein Indiz für eine verbesserte Regenerationsfähigkeit der Haut sein und einen therapeutischen Effekt erzielen. Einige dieser stimulatorischen Effekte konnten auch bei der Behandlung mit dem Arbeitsgas, ohne Zünden des Plasmas, nachgewiesen werden. Die Behandlung der Hautmodelle mit der DBD-Plasmaquelle führte zu keiner deutlichen Expression und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine oder Regenerationsmarker. Daher ist hier eine Verbesserung der regenerativen Wirkung nicht zu erwarten. Die Plasmabehandlung führte jedoch zu einer Reduktion der Genexpression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine und antimikrobieller Peptide. Dieser Effekt könnte künftig bei der Therapie von entzündlichen Hauterkrankungen wie Psoriasis und atopischer Dermatitis eine Rolle spielen.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 3D-Hautmodelle eine sehr gute Grundlage für die Testung von neuen Plasmaquellen darstellen, da sie durch ihren Aufbau die humane Haut realitätsnah darstellen und deren Reaktion auf Reize widerspiegeln. Mittels unterschiedlicher histologischer und molekularbiologischer Untersuchungen kann somit zukünftig eine anwendungsnahe Beurteilung der Effektivität und Verträglichkeit von Plasmageräten erfolgen um somit die Erforschung der Plasmawirkung grundlegend zu unterstützen.

1. Einleitung

Physikalische Plasmen werden schon seit langem untersucht, die medizinische Anwendung ist jedoch ein junges Forschungsfeld. Dazu muss die Reaktion von biologischen Systemen auf das Plasma analysiert werden, um eine therapeutische Anwendung zu erreichen. Aufgrund seiner antimikrobiellen Wirkung stellt Plasma eine hervorragende Alternative zur Antibiotikatherapie dar, vor allem da Mikroorganismen zunehmend Resistenzen gegenüber häufig verwendeten Antibiotika ausgebildet haben.

1.1. Plasma – Begriffsdefinition und Einführung in die Plasmaphysik

In der Physik gibt es neben den klassischen Aggregatzuständen fest, flüssig und gasförmig einen vierten, der als Plasma bezeichnet wird. Bei Plasma handelt sich um ein ionisiertes Gas, welches unter anderem aus Elektronen und Ionen besteht und freie Ladungsträger besitzt. Plasma entsteht, indem einem Gas Energie zugeführt wird, wobei seine Moleküle angeregt werden und so reaktive Spezies entstehen (Bardos und Barankova 2010). Hinsichtlich ihrer Temperatur können Plasmen in zwei Kategorien eingeteilt werden: Hochtemperatur-Plasmen und Niedrigtemperatur-Plasmen. Bei dem Hochtemperatur-Plasma ist die Temperatur der schweren Teilchen gleich der Temperatur der Elektronen. Sie befinden sich im thermalen Equilibrium. Dabei kann das entstehende Plasma Temperaturen von bis zu mehreren Millionen Grad Celsius erreichen. Niedrigtemperatur-Plasmen können wiederum in thermale Plasmen und nicht-thermale Plasmen eingeteilt werden. Bei thermalen Plasmen befinden sich die Teilchen in einem „quasi-Equilibrium“, wobei sich diese nur lokal im Equilibrium befinden. Sie können Temperaturen von 100°C bis 150°C aufweisen. Bei nicht-thermalen Plasma sind dagegen nur die Elektronen erhitzt. Aufgrund des Masseunterschiedes zwischen Elektronen und schweren Teilchen resultieren daraus sehr niedrige Plasmatemperaturen von 30-60°C. Es wird daher auch als kaltes Plasma bezeichnet. Eine weitere Unterteilung kann basierend auf dem Druck vorgenommen werden. Bei atmosphärischem Plasma wird das Plasma unter atmosphärischem Druck von 10^{-4} bis 10^{-2} kPa erzeugt. Niederdruckplasma hingegen wird mittels Vakuum gebildet. Kalte atmosphärische Plasmen (KAP) sind also Plasmen, die unter Normaldruck erzeugt werden und eine niedrige Temperatur besitzen, was zunächst der Behandlung von hitzelabilen Oberflächen oder biologischen Materialien diene, jedoch in der medizinischen Anwendung immer mehr Bedeutung erlangt (Tendero et al. 2006, Weltmann und von Woedtke 2017, Nasiru et al. 2021).

1.2. Plasmabestandteile und deren Wirkung auf biologische Systeme

Neben Elektronen und Ionen besitzt das entstandene Plasma weitere Bestandteile wie beispielsweise UV-Strahlung, reaktive Spezies, Wärmestrahlung und elektromagnetische Felder (Abb. 1, verändert nach (Hans-Robert Metelmann 2016)). Die Zusammensetzung des Plasmas ist dabei unter anderem abhängig von dem eingesetzten Arbeitsgas und dem Druck. Die Plasma-Bestandteile sind für die unterschiedliche Wirkungsweise des Plasmas auf biologische Systeme wie eukaryotische und prokaryotische Zellen oder auch Viren verantwortlich. Der Effekt des Plasmas ist jedoch stark abhängig von der Konzentration der Bestandteile und der Art sowie Status der Zelle. Als wirkungsvollste Bestandteile des Plasmas gelten UV-Strahlung und reaktive Spezies (von Woedtke et al. 2013).

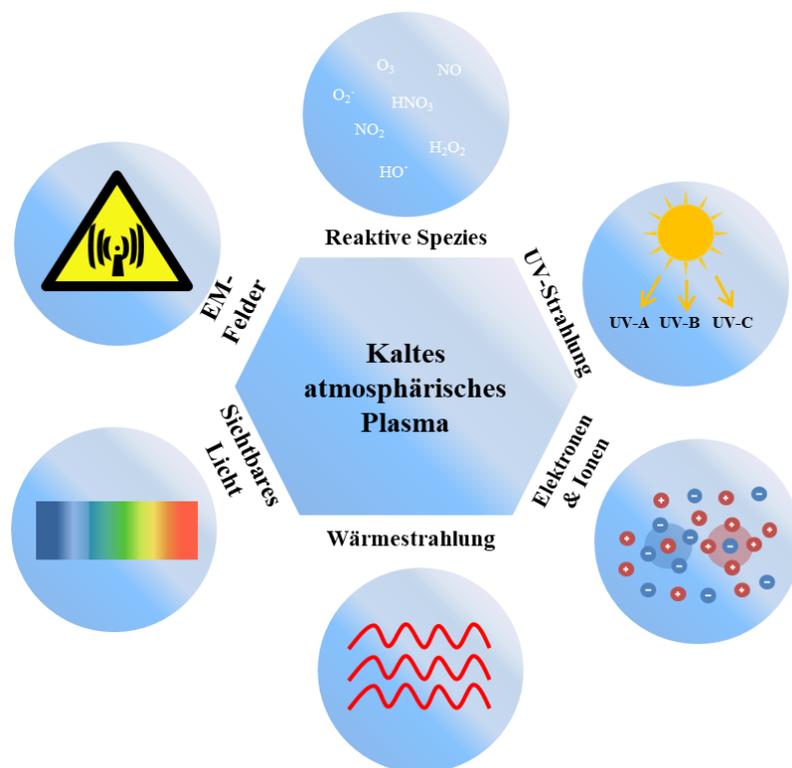


Abbildung 1: Zusammensetzung von Plasma. Das Plasma besteht aus einer Reihe von Bestandteilen, welche Einfluss auf biologische Systeme haben können.

1.2.1. UV-Strahlung

Aufgrund von Ionisierungs- und Anregungsreaktionen werden Photonen aus dem Plasma als sichtbares Licht sowie UV-Strahlung emittiert (Jaritz et al. 2017). Als UV-Strahlung wird kurzwelliges Licht im Bereich von 100 nm bis 380 nm bezeichnet. Die Unterteilung erfolgt dabei

in UV-A; UV-B sowie UV-C-Strahlung. Diese besitzen unterschiedliche Eindringtiefen in die Haut, wobei UV-A die größte Eindringtiefe besitzt (Dale Wilson et al. 2012). UV-Strahlung kann in Bakterien sowie eukaryotischen Zellen zu DNA-Schädigungen und sogar zum Zelltod führen (Taylor et al. 2020). Die menschliche Haut besitzt Schutzsysteme, wie z.B. Pigmentierung, was sie bis zu einem gewissen Grad vor Schädigung bewahrt (Brenner und Hearing 2008). Die Dosis und Wellenlänge sind für das Schadensausmaß ausschlaggebend. Langzeit-Bestrahlung kann bei Säugerzellen zu Mutationen oder auch oxidativem Stress führen (McMillan et al. 2008). Jedoch wird eine schonende Bestrahlung mit UV-B z.B. in der Therapie von Psoriasis oder Mykosen eingesetzt (Dale Wilson et al. 2012).

1.2.2. Reaktive Spezies

Durch die Interaktion von angeregten und ionisierten Atomen oder Molekülen mit anderen Atomen oder Molekülen des Arbeitsgases werden im Plasma reaktive Spezies gebildet (Weltmann und von Woedtke 2017). Neben den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) existieren auch reaktive Stickstoffspezies (RNS). Diese reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) beeinflussen verschiedene physiologische und biochemische Vorgänge. Ein Großteil der RONS besitzt ungepaarte Elektronen, welche hochreaktiv sind und mit Zellbestandteilen reagieren können. Als Vertreter der ROS gelten Hyperoxid Anion ($O_2^{\cdot-}$) Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sowie das Hydroxyl-Radikal (OH^{\cdot}). Als Vertreter der RNS sind Stickstoffmonoxid (NO) und Stickstoffdioxid (NO_2) sowie Peroxinitrit ($ONOO^-$) zu nennen (Di Meo et al. 2016). Reaktive Sauerstoffspezies können in der Zelle zur Oxidation von DNA, Proteinen oder Lipiden führen, was Veränderungen in der Zelle oder Zelltod verursacht und zur Entstehung verschiedener Krankheiten beiträgt. Jedoch spielen RONS auch eine essentielle Rolle als Signalmoleküle bei biochemischen Vorgängen, welche an Wachstumsfaktorexpression, Zytokinproduktion oder Immunabwehr beteiligt sind. Reaktive Spezies werden größtenteils durch den zelleigenen Metabolismus gebildet. Dabei ist das antioxidative System des Organismus in der Lage, diese bis zu einem gewissen Maße zu neutralisieren (Auten und Davis 2009). Medizinisch werden reaktive Sauerstoffspezies vor allem in der Strahlentherapie genutzt, wobei indirekt zellulärer Stress verursacht wird, um Tumorzellen abzutöten (Kim et al. 2019). Die Schädigung der Zellen durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies ist daher stark abhängig von der Konzentration und der Fähigkeit des antioxidativen Systems, diese zu neutralisieren (Patel et al. 1999).

1.2.3. Temperatur und Wärmestrahlung

Eine erhöhte Temperatur über 40°C kann aufgrund von Denaturierung sowie Aggregation von Proteinen zum Zelltod führen und sollte bei dem medizinischen Einsatz von Plasma nicht überschritten werden (Roti 2008). Richtig eingesetzt hat Wärme einen stimulierenden Effekt, indem sie die Durchblutung im Gewebe steigert. Wärmetherapie wird beispielsweise zur Behandlung von Schmerzen oder verschiedenen Erkrankungen wie Durchblutungsstörungen, Neuralgien oder schlecht heilenden Wunden eingesetzt (Bayata und Ermertcan 2012, Plewig et al. 2018).

1.3. Gerätearten zur Erzeugung von Plasma

Neben der Plasmakoagulation mittels heißem Plasmas hat kaltes Plasma für die medizinische Therapie immer mehr an Bedeutung gewonnen. Für kalte Plasmen gibt es zwei grundlegende Erzeugungsarten: direktes Plasma und indirektes Plasma. Die Plasmageräte unterscheiden sich im Aufbau und Erzeugungsmodus des Plasmas. Grundsätzlich bestehen die Apparaturen aus einer Stromquelle, Elektrode und Gegenelektrode, einem Dielektrikum sowie einer optionalen Gaszufuhr. Als Arbeitsgase können die Umgebungsluft aber auch Stickstoff, Helium oder Argon dienen (Wiegand und Elsner 2017).

1.3.1. Direktes Plasma

Bei dieser Art der Plasmaerzeugung befindet sich eine Elektrode im Gerät und das Gewebe stellt die Gegenelektrode dar, wobei der Strom durch das zu behandelnde Gewebe fließt (Abb. 2 verändert nach (Weltmann et al. 2010)). Das Plasma wird dabei zwischen dem Gewebe und der Elektrode gebildet und besitzt eine hohe Dichte an plasmagenerierten Teilchen (Isbary et al. 2013a). Als käuflich erwerbbares und bereits angewendetes Gerät mit direktem Plasma ist der PlasmaDerm[®] der Firma Cinogy zu nennen (Brehmer et al. 2015).

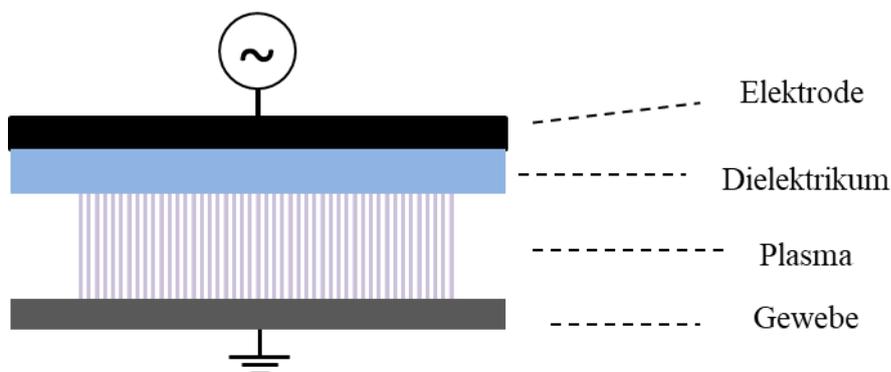


Abbildung 2: Funktionsweise von direktem Plasma

1.3.2. Indirektes Plasma

Bei dieser Geräteart wird das Plasma in einer geschlossenen Anordnung zwischen Elektrode und Gegenelektrode produziert und durch den Gasstrom zum Anwendungsort transportiert (Abb. 3; verändert nach (Weltmann et al. 2010)). Dabei kommt das Gewebe nicht direkt mit dem Plasma in Kontakt, sondern mit der Emission des Plasmas, welches beim Austritt mit der Umgebungsluft reagiert. Eine häufige Anwendungsform sind Plasmajets, welche oft mit zusätzlichem Arbeitsgas arbeiten (Brany et al. 2020). Ein kommerziell erhältliches Beispiel dieser Geräteart ist der kINPen MED[®] der Neoplas med GmbH (Plattfaut et al. 2021).

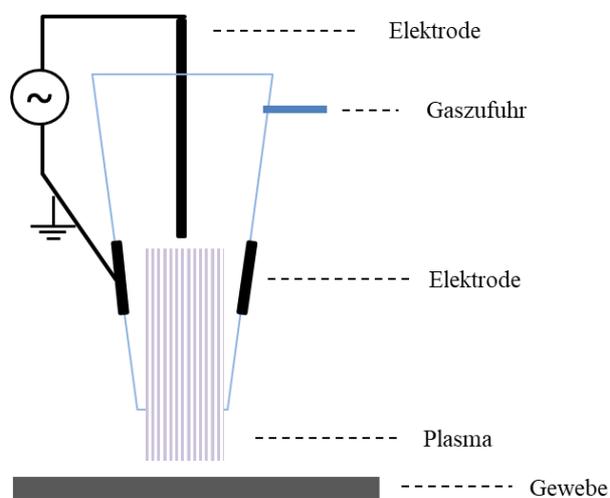


Abbildung 3: Erzeugung von indirektem Plasma

1.4. Wirkungsweise von Plasma auf eukaryotische Zellen

Bei der Plasmabehandlung von Zellen und Geweben kommen die Plasmabestandteile in Kontakt mit der Zellmembran oder anderen Zellbestandteilen und können so zu einer Änderung an oder in der Zelle führen (Laroussi 2020). Die Wirkung von Plasma ist dabei abhängig von unterschiedlichen Faktoren, wie z.B. Arbeitsgas, Geräteaufbau, Behandlungsabstand, etc. Daher ist das Ergebnis der Plasmabehandlung für jede Plasmaquelle und behandelte Zellart bzw. Gewebe individuell. Die Effekte umfassen ein weites Spektrum und reichen über Zelltod bis hin zur Steigerung des Zellstoffwechsels. Forschungen zeigen, dass Plasma in normalen sowie malignen Zellen zur Apoptose, dem programmierten Zelltod, führen kann. Es wird angenommen, dass die im Plasma enthaltenen reaktiven Spezies zu oxidativem Stress und dadurch zur Akti-

vierung des programmierten Zelltodes führen (Stoffels et al. 2008). Daneben wurde auch Nekrose von Fibroblasten in Reaktion auf Plasmabehandlung beobachtet (Virard et al. 2015). Neben den zytotoxischen Reaktionen sind auch nicht-toxische und reversible Reaktionen entdeckt worden. Plasma kann einen positiven Effekt auf die Blutgerinnung haben. Dabei aktiviert das Plasma die körpereigene Koagulation oder führt mittels eines alternativen Weges zur Protein-Aggregation (Ikehara et al. 2015). Eine gesteigerte Proliferation von verschiedenen Zellarten wie Fibroblasten (Brun et al. 2014), Keratinozyten (Hasse et al. 2016b) und Endothelzellen (Kalghatgi et al. 2010) wurde ebenfalls nach Plasmabehandlung festgestellt. Auch wundheilungsrelevante Gene, verschiedene Interleukine wie IL-6 und IL-8 (Arndt et al. 2013) oder Angiogenese-bezogene Proteine (Arndt et al. 2018b) konnten durch KAP an 2D-Kulturen aktiviert werden, verbunden mit einer verbesserten Migration der Zellen und einer gesteigerten Produktion von Kollagenen (Shome et al. 2020). Die Beeinflussung von Zelladhäsionsmolekülen stellt einen weiteren Effekt des Plasmas dar. Es wurde die reversible Ablösung von vaskulären Zellen nach Plasmabehandlung beschrieben, welche wahrscheinlich durch elektrostatische Wechselwirkungen hervorgerufen werden (Haertel et al. 2011). Weiterhin zeigte sich bei Keratinozyten eine veränderte Expression von Zelladhäsionsproteinen in nicht-tumorigenen Zellen (Haertel et al. 2011) sowie Krebszellen (Lee et al. 2009). Zudem ist eine Beeinflussung der Melanin-Synthese mittels Plasma möglich, was einen Einfluss auf die Färbung der Haut haben kann (Hasse et al. 2019).

Neben der direkten Behandlung von Zellen und Geweben gibt es noch die Möglichkeit einer Behandlung mit plasmaaktivierten Flüssigkeiten. Diese besitzen aufgrund der Reaktion von Plasma mit der Flüssigkeit unterschiedliche reaktive Moleküle. Diese Thematik umfasst ein eigenes Forschungsfeld welches auch als indirekte Plasmabehandlung bezeichnet wird. Die Forschungsgebiete und Wirkungsweisen beider Behandlungsarten sind hierbei grundlegend vergleichbar (Kaushik et al. 2019).

1.5. Wirkung von Plasma auf prokaryotische Zellen

Mitte der 1990er Jahre wurde erstmals die antimikrobielle Wirkung von KAP untersucht (Laroussi 1996). Mit der Zeit hat sich der Einsatz von Plasma als wirkungsvolles antimikrobielles Mittel erwiesen, welches nicht nur Bakterien, sondern auch klinisch relevante Hefen, Pilze und Viren inaktivieren kann (Tab. 1) (Haertel et al. 2014, Niedzwiedz et al. 2019). Die Wirkungsweise von Plasma auf prokaryotische Zellen ist noch nicht im Detail erforscht, dennoch wird angenommen, dass die antimikrobielle Wirkung vor allem durch die reaktiven Spezies verursacht wird. Diese bewirken beispielsweise die Oxidation von Lipiden in der Membran

von Bakterien, DNA oder Proteinen, was zum Zelltod führt. Plasma sorgt zusätzlich für eine pH-Änderung des umgebenden Mediums, was die Zellfunktion wie Enzymaktivität oder Proteinstabilität des Mikroorganismus stören kann (Bourke et al. 2017). Die durch das Plasma emittierte UV-Strahlung führt weiterhin zur Dimerisierung von Basenpaaren in der Mikrobend-DNA, dies kann einen Einfluss auf die Replikationsfähigkeit haben. Durch auftretende Ladungen im Plasma, die mit der Zellmembran in Wechselwirkung treten, kann es zur Zerstörung der Zellmembran von Bakterien und Pilzen kommen (Liao et al. 2017). Bei Viren sind die Inaktivierungsmechanismen vielfältig, begründen sich jedoch vor allem auf die Zerstörung des viralen Kapsids oder der Virushülle durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (Filipic et al. 2020).

Tabelle 1: Übersicht der Inaktivierung von Mikroorganismen mittels KAP

BAKTERIEN	HEFEN/ PILZE	VIREN
<i>Escherichia coli</i> (Lotfy et al. 2020)	<i>Candida albicans</i> (Maisch et al. 2012b)	Respiratory Syncytial Virus (Sakudo et al. 2017)
<i>Bacillus subtilis</i> (Deng et al. 2006)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Ma et al. 2013)	Human Parainfluenza Virus type 3 (Terrier et al. 2009)
<i>Staphylococcus aureus</i> (Maisch et al. 2012a)	<i>Malassezia pachydermatis</i> (Wiegand et al. 2017)	Influenza A Virus Subtype H5N2 (Terrier et al. 2009)
<i>Salmonella enterica</i> (Fernandez et al. 2013)	<i>Trichophyton rubrum</i> (Heinlin et al. 2013)	Noroviruses (Ahlfeld et al. 2015)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Wang et al. 2020)	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (Bulson et al. 2020)	SARS-CoV-2 (Chen et al. 2020)
<i>Klebsiella pneumonia</i> (Modic et al. 2017)	<i>Aspergillus flavus</i> (Ott et al. 2021)	
<i>Enterococcus faecalis</i> (Theinkom et al. 2019)		

Im klinischen Alltag kommen Mikroorganismen jedoch häufiger als Biofilme vor, welche aufgrund ihres komplexen Aufbaus deutlich resistenter gegenüber antimikrobiellen Behandlungen sind. Biofilme können dabei akute sowie chronische Infektionen bis hin zu Sepsis auslösen (Deva et al. 2013). Die Plasma-Behandlung von Biofilmen stellt eine zusätzliche Behandlungsoption zu den bisherigen Methoden dar. Mittels Plasmabehandlung ist es möglich, auch klinisch relevante, antibiotikaresistente Biofilme zu inaktiveren wie beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* und *Enterococcus faecium* (Flynn et al. 2015). Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass die Plasmapbestandteile in den Biofilm eindringen können und so zu Veränderungen der Zellmembranintegrität, Zerstörung von extrazellulären polymeren Substanzen und metabolischer Veränderung führen. Des Weiteren können mittels Plasmabehandlung auch Quorum-Sensing-Moleküle zerstört werden, um so die Bildung von Biofilmen zu stören (Bourke et al. 2017).

1.6. Plasmamedizin

Plasma wird in der Industrie bereits angewendet, beispielsweise bei Plasmafernsehern, Oberflächenbeschichtung oder Plasmaschneiden. Es zeigte sich jedoch, dass Plasma auch eine sehr gute Wirkung gegen verschiedene Mikroorganismen besitzt, sodass auch hitzeinstabile Materialien desinfiziert werden können. Aufgrund der sehr guten antimikrobiellen Wirkung hat sich vor einigen Jahren ein eigenes Forschungsfeld gebildet, die Plasmamedizin. Ziel der Plasmamedizin ist die Verwendung von Plasma an tierischem und menschlichem Gewebe, um so einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Mit der Zeit haben sich zahlreiche Forschungsfelder in der Plasmamedizin entwickelt wie die Behandlung chronischer Wunden, Tumorbehandlung sowie Anwendungen in der Zahnmedizin und Dermatologie. Diese konnten bisher vielversprechende Ergebnisse erzielen (von Woedtke et al. 2013):

1.6.1. Behandlung chronischer und akuter Wunden

Eines der größten Forschungsgebiete der Plasmamedizin ist die Behandlung von chronischen Wunden. Erste klinische Studien belegen die positiven Effekte der Plasmabehandlung auf die Wundheilung (Isbary et al. 2013b, Stratmann et al. 2020, Mirpour et al. 2020). Aber auch akute Wunden können mit Plasma therapiert werden, um eine Infektion zu verhindern und die Wundheilung zu fördern (Nishijima et al. 2019). Zum einen kann Plasma Wundkeime reduzieren, die durch ihre toxischen Nebenprodukte die Wundheilung hemmen. Zum anderen führen die Plasmapbestandteile wie z.B. reaktive Spezies zur Förderung der Wundheilung, beispielsweise durch

veränderte oder gesteigerte Signalweiterleitung. Dabei werden Fibroblasten aktiviert, welche die Matrix-Synthese in Form von Kollagen unterstützen. Daneben wird die Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren angeregt, welche die Reepithelialisierung sowie Angiogenese fördern (Arndt et al. 2018a).

1.6.2. Tumorbehandlung

Ein weiteres großes Forschungsfeld der Plasmamedizin betrifft die Inaktivierung von Tumorzellen. Auf diesem Gebiet gibt es zahlreiche Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien, die das selektive Abtöten von Tumorzellen bestätigen wie beispielsweise Melanomzellen (Hasse et al. 2020), Pankreaskrebszellen (Hattori et al. 2015) und viele andere (Dubuc et al. 2018). Dabei wirkt das Plasma selektiv auf Krebszellen, ohne gesunde Zellen zu schädigen (Brany et al. 2020). Als hauptsächlicher Effektor gelten laut Forschungstand die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies. Tumorzellen unterscheiden sich von gesunden Zellen durch eine hohe Stoffwechselrate, bei der intrazellulär viele reaktive Spezies gebildet werden. Zudem besitzen Krebszellen mehr Aquaporine als gesunde Zellen, was zu einer gesteigerten Diffusion von reaktiven Spezies in die Zelle führen kann. Häufig ist auch der Cholesterolgehalt der Membran von Tumorzellen verringert, was ebenfalls in einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber reaktiven Spezies resultieren kann. Kommen nun weitere externe reaktive Spezies durch das Plasma hinzu, kann das zelleigene Redox-Schutzsystem diese nicht mehr neutralisieren, was zur Oxidation und Schädigung von Proteinen und DNA führt. Als Folge werden Signalwege induziert, welche zur Seneszenz, Nekrose oder Apoptose führen (Semmler et al. 2020). Die aktuelle Forschung zeigt ein klares Potential für die Tumorbehandlung mittels Plasma, jedoch sind viele dieser Versuche an 2D-Kulturen durchgeführt worden. Da Tumore in einer dreidimensionalen Masse vorliegen und die Eindringtiefe des Plasmas beschränkt ist oder von verschiedenen Parametern abhängt, kann unter Umständen nicht der gesamte Tumor inaktiviert werden. In diesem Forschungsgebiet wird daher intensiv geforscht, um durch Optimierung eine klinische Relevanz gegenüber Standardtherapien zu erreichen (Shuheng et al. 2020).

1.6.3. Zahn- und Kieferheilkunde

Aufgrund der hervorragenden antimikrobiellen Wirkung hat Plasma in der Zahnheilkunde ein hohes Anwendungspotential. Die Forschungsgebiete zielen vor allem auf die Reinigung und Dekontamination dentaler Prothesen (Duske et al. 2015) oder die direkte Verwendung von Plasma am Zahn, um Biofilme zu entfernen (Jablonowski et al. 2017). Eine Kombination aus

mechanischer Reinigung und Plasmabehandlung hat sich hier als besonders effektiv erwiesen (Matthes et al. 2015). Des Weiteren bezieht sich die Forschung auf die Plasmaaktivierung von dentalen Implantaten, um so die Zelladhäsion zu begünstigen und die Einheilung zu beschleunigen (Canullo et al. 2017, Ujino et al. 2019, Duske et al. 2012). Auch das Anheften von Mikroorganismen kann durch die plasmabedingte Oberflächenveränderung verhindert werden (Yang et al. 2020). Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Wurzelkanalbehandlung mittels Plasma, da hier oft antibiotikaresistente Mikroorganismen angesiedelt sind. Hier kann Plasma auch an schlecht erreichbaren Stellen wirken, jedoch reduziert sich der Plasmaeffekt mit steigendem Abstand (Kerlikowski et al. 2020).

1.6.4. Weitere Anwendungsgebiete der Plasmamedizin

Speziell in der Dermatologie gibt es neben der Wund- und Tumorbehandlung einige Anwendungsgebiete wie beispielsweise Fußpilzbehandlung (Lipner et al. 2017), Behandlung von Psoriasis (Klebes et al. 2014) oder auch atopischer Dermatitis (Lee et al. 2019). Aber auch für die Behandlung von aktinischer Keratose, eine Vorstufe des Plattenepithelkarzinoms, stellt Plasma eine potentielle Alternative oder Kombinationsbehandlung dar (Wirtz et al. 2018). Jedoch steht die Forschung in diesen Bereichen hinsichtlich der Wirkung noch am Anfang.

1.7. Risikobewertung

Einige Plasmabestandteile wie reaktive Spezies oder UV-Strahlung sind potentiell zytotoxisch sowie genotoxisch, da bei bestimmten Konzentrationen Veränderungen oder Schädigungen von Proteinen oder DNA erfolgen können. Die zytotoxischen Effekte von Plasma wurden bereits weitgehend erforscht (Virard et al. 2015, Maisch et al. 2017). Mittels unterschiedlicher molekularbiologischer Methoden konnten gelegentlich DNA-Schäden, wie z.B. Doppelstrangbrüche festgestellt werden. Auch die Mutagenität von Plasma wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Vereinzelt konnten auch hier mutagene Effekte beobachtet werden. Diese zytotoxischen und genotoxischen Effekte sind jedoch stark abhängig von den Plasmaparametern wie Gerätetyp, Arbeitsgas oder Behandlungszeit- oder Abstand. Für eine einheitliche Bestimmung potentieller Risiken wurde daher 2014 die DIN SPEC 91315 eingeführt, welche die Anforderungen an medizinische Plasmaquellen definiert. Die Langzeitwirkungen einer Plasmabehandlung sind bisher kaum bekannt, da die Plasmamedizin noch ein junges Forschungsfeld ist. Jedoch zeigte eine 1-Jahr-Folgezeitstudie keine prä-karzinogenen Hautveränderungen an den

behandelten Stellen (Boehm und Bourke 2019). Auch eine 5-jährige Folgezeitstudie an Probanden konnte keine Nebenwirkungen oder maligne Veränderungen feststellen (Rutkowski et al. 2020).

1.8. Aufbau und Funktion der Haut

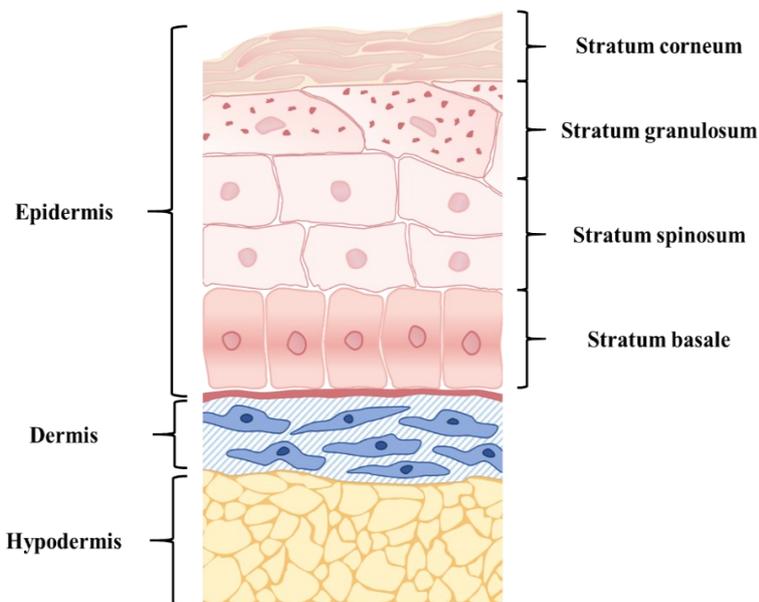


Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Haut. Die humane Haut besteht grundlegend aus 3 Teilen: Hypodermis, Dermis und Epidermis. Die Epidermis wiederum ist in verschiedene Schichten unterteilt.

Mit einem Gewicht von bis zu 15% des Gesamtkörpergewichtes eines Erwachsenen, stellt die Haut das größte Organ des menschlichen Körpers dar. Sie übt nicht nur Funktionen wie Sinneswahrnehmung, Schutz vor äußeren Einflüssen, Isolation oder Energiespeicher aus, sondern gibt auch Informationen über Alter oder Gesundheitszustand beim Menschen an.

Grundlegend besteht die Haut aus 3 Schichten: Epidermis,

Dermis und Hypodermis (Abb. 4 verändert nach (Fink et al. 2022)). Die Epidermis besitzt keine Gefäße und ist wiederum in verschiedene Schichten eingeteilt: Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum corneum. Diese Schichten bestehen zum großen Teil aus Keratinozyten, welche während ihrer Differenzierung die verschiedenen Schichten durchlaufen und dabei verhornen. Die Basalmembran als unterste Schicht besteht aus ebennmäßig geformten Zellen, die durch ihre Hemidesmosomen mit der Dermis verankert sind. Adulte Stammzellen sorgen in der Basalmembran durch Proliferation für die Generierung weiterer Keratinozyten. Die nachfolgende Stratum spinosum enthält, im Gegensatz zur Basalmembran, polygonal geformte Zellen, welche erste Anzeichen der terminalen Differenzierung zeigen. Die angrenzende Stratum granulosum zeichnet sich durch abgeflachte, granuläre Zellen aus, die für die beginnende Verhornung charakteristisch sind. Die abschließende Schicht stellt das Stratum corneum dar. Die Zellen dieser Schicht enthalten weder Zellkerne noch Organellen und sind abgeflacht. Die Kerneozyten zusammen mit den abgelagerten Lipiden bilden die erste Barriere-Schicht der Haut. Neben den Keratinozyten enthält die Epidermis noch andere zelluläre Bestandteile wie Merkelzellen, Langerhanszellen, Melanozyten und freie Nervenenden. Merkelzellen sind

basal vorkommende mechanorezeptive Zellen, welche mit Nervenenden verbunden sind. Langerhanszellen, als mobile Immunzellen der Haut, sind für die Antigen-Präsentation zu den T-Lymphozyten verantwortlich. Melanozyten befinden sich in der Stratum basale und sind für die Melaninsynthese zuständig. Das Melanin wird an die Keratinozyten übertragen und soll diese vor UV-Strahlung schützen. Die unter der Epidermis liegende Dermis wird als Bindegewebe bezeichnet und besteht aus Kollagenfasern, die die Dehnbarkeit der Haut vermitteln. Sie besitzt im Gegensatz zur Epidermis Gefäße und Nerven. Weiterhin befinden sich in der Dermis kollagenproduzierende Fibroblasten, Makrophagen, Mastzellen und Lymphozyten sowie verschiedene Rezeptoren (Meissner-Tastkörperchen und Ruffini-Körperchen). Die Hypodermis bildet die unterste Schicht der Haut und besteht hauptsächlich aus Fettgewebe und lockerem Bindegewebe. Sie dient als Energiespeicher sowie dem Kälteschutz. Die hier angesiedelten Vater-Pacini-Körperchen sind Rezeptoren, welche auf Vibration reagieren (Kanitakis 2002).

1.9. Hautmodelle

Für toxikologische Untersuchungen werden in den meisten Fällen 2D-Kulturen unterschiedlichster Zellarten verwendet. Zwar geben sie einen ersten Eindruck über die Wirkung von Substanzen oder Behandlungen, zeigen jedoch aufgrund der fehlenden Komplexität nur eingeschränkt aussagekräftige Zellreaktionen und geben *in vivo* Bedingungen nicht korrekt wieder. Die fehlenden Interaktionen mit Nachbarzellen im 3D-Umfeld sowie die Abwesenheit einer extrazellulären Matrix spielen hier eine große Rolle. Beispielsweise besitzt die Haut eine Hornschicht, welche den Organismus vor äußerer Schädigung schützt. Dieser Bestandteil ist bei einer 2D-Kultur mit Keratinozyten nicht vorhanden. Die Toxizität bei 2D-Kulturen ist folglich deutlich höher ausgeprägt als bei komplexen Geweben. Daher werden *in vitro* Analysen häufig auf das Tiermodell übertragen, um weitere Informationen zu gewinnen. Die Aussagekraft von Tierversuchen ist jedoch schwierig auf den Menschen zu beziehen, da sich Aufbau und Immunsystem der Haut unterscheiden. Die Schnittstelle zwischen 2D-Zellkultur und Tierversuchen können 3D-Hautmodelle bilden, welche aus humanen Zellen bestehen und einen komplexen Aufbau aufweisen (Brohem et al. 2011).

Die Grundlage für die heutigen Hautmodelle wurde Mitte des 20. Jahrhunderts gelegt. Die Kultivierung von Keratinozyten *in vitro* wurde erstmals 1948 beschrieben. Einen großen Durchbruch gelang Rheinwald und Green im Jahre 1975, als sie mittels einer Nährschicht aus 3T3-Fibroblasten Keratinozyten-Kolonien aus einem einzigen Keratinozyt gewinnen konnten, um eine große Menge an Zellen zu generieren. Diese Modelle waren jedoch noch sehr einfach und hatten nicht alle Funktionen heutiger Hautmodelle. Eines der ersten explantierten Hautmodelle

wurde 1976 beschrieben. Diese Methode wurde durch Einsatz von einer Kollagenmatrix und der Air-Lift-Kultivierung verbessert. Seit den 1980er Jahren erfolgte eine stetige Optimierung der Herstellung von Hautmodellen und dem Einbringen von zusätzlichen Zellen wie Melanozyten, Endothelzellen oder Langerhans-Zellen. Inzwischen werden kommerziell erhältliche Hautmodelle für toxikologische Untersuchungen verwendet. Dabei wird die Herstellung von Hautmodellen durch den Einsatz von neuen Technologien wie 3D-Drucken oder „skin on a chip“ optimiert und beschleunigt (Niehues et al. 2018, Randall et al. 2018).

1.9.1. Typen von 3D-Hautmodellen

Epidermismodelle

Diese Modelle bestehen nur aus einer Epidermis, die auf einer Membran kultiviert wird. Durch Einsatz verschiedener Medien sowie einer Kultivierung an der Medium-Luft-Grenze (Air-Lift-Kultivierung) wird eine Differenzierung der Epidermis erreicht. Aufgrund des Fehlens anderer Zellarten wie Fibroblasten und Immunzellen ist keine Kommunikation zwischen unterschiedlichen Zelltypen möglich und somit die Analyse von Entzündungen limitiert. Diese Modelle lassen sich jedoch sehr gut standardisieren. Kommerziell erhältliche Modelle sind beispielsweise EpiSkin™, EpiDerm™, SKinEthic™ RhE, und EpiCs® (Zeitvogel und Werfel 2020).

3D-Vollhautmodelle

Diese Art der Hautmodelle besteht aus einer Epidermis, welche aus Keratinozyten gebildet wird, sowie einer Dermis mit Fibroblasten (Abb. 5). Die Dermis kann aus unterschiedlichen Trägermaterialien, wie z.B. Kollagen, Hydrogel oder polymeren Fasern bestehen sowie von den Fibroblasten selber gebildet werden. Es besteht die Möglichkeit, weitere Zellarten wie Endothelzellen oder Melanozyten in das Hautmodell einzubringen (Przekora 2020). Ein einfaches, kommerziell erhältliches Modell ist beispielsweise das Hautmodell der Firma Phenion (Ackermann et al. 2010).

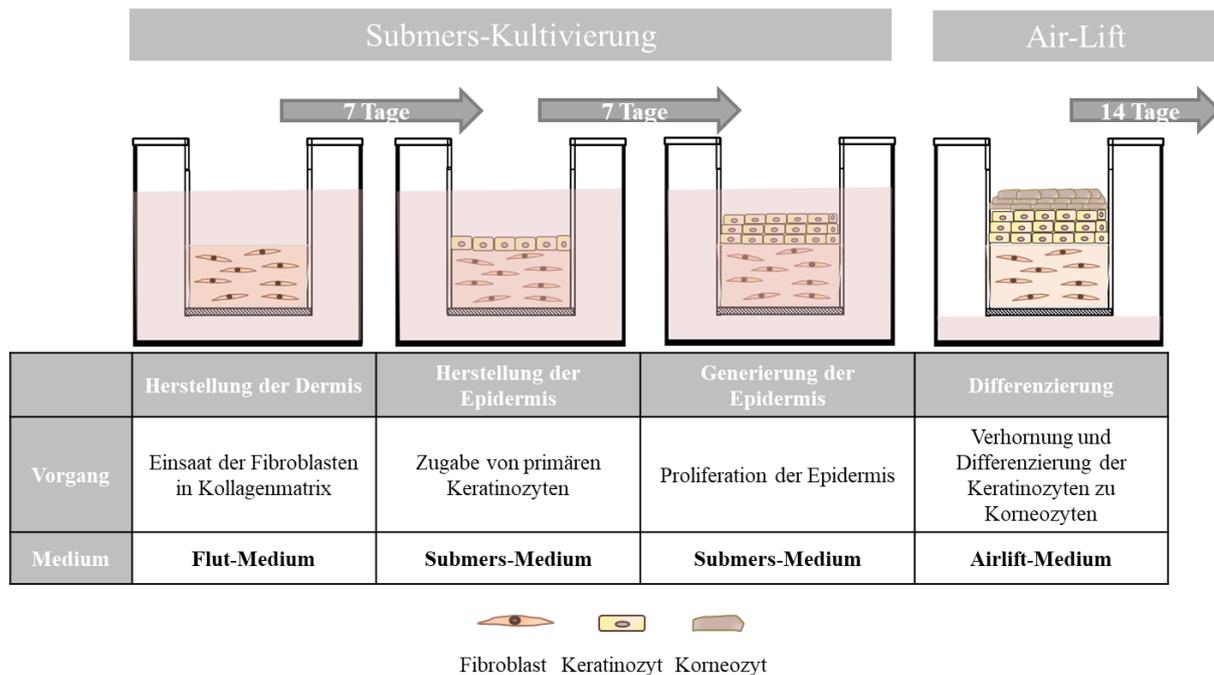


Abbildung 5: Kultivierung von Vollhautmodellen. Fibroblasten werden in einer Kollagenmatrix eingesät. Nach einer bestimmten Kultivierungszeit werden Keratinozyten auf das Dermismodell gegeben und zur Proliferation angeregt. Danach erfolgt die Kultivierung an der Medium-Luft-Grenze, um die Differenzierung der Epidermis zu erreichen.

1.10. Biokompatibilität und Biofunktionalität

Für die Evaluierung neuer Substanzen oder medizinischer Geräte ist die Überprüfung der Biokompatibilität und Biofunktionalität von großer Wichtigkeit, um Schäden oder Risikofaktoren am Patienten auszuschließen und einen therapeutischen Erfolg zu gewährleisten. Dabei dürfen die Produkte bei direktem Kontakt zum Gewebe keinen schädlichen Einfluss haben. Die DIN EN ISO 10993 regelt die biologischen Anforderungen zur Beurteilung von Medizinprodukten. Dies schließt verschiedene Zytotoxizitäts-, Genotoxizitäts- und Proliferationsanalysen ein. Für *in vitro* Studien werden häufig unterschiedliche Zellkulturtest angewandt, welche an permanenten Zelllinien durchgeführt werden (Onuki et al. 2008). Für Untersuchungen, welche die Haut betreffen, werden in der Regel primäre Keratinozyten, Fibroblasten oder die HaCaT-Keratinozytenzelllinie verwendet (Wiegand und Hipler 2009). Zusätzlich regelt die DIN SPEC 91315 die allgemeinen Anforderungen von medizinischen Plasmaquellen. Hier werden die Parameter der Geräte sowie Wirkung auf biologische Systeme definiert (von Woedtke et al. 2020). Die Biofunktionalität beschreibt in dieser Arbeit vor allem die antimikrobielle Wirkung von Plasma gegen Mikroorganismen (Abb. 6).

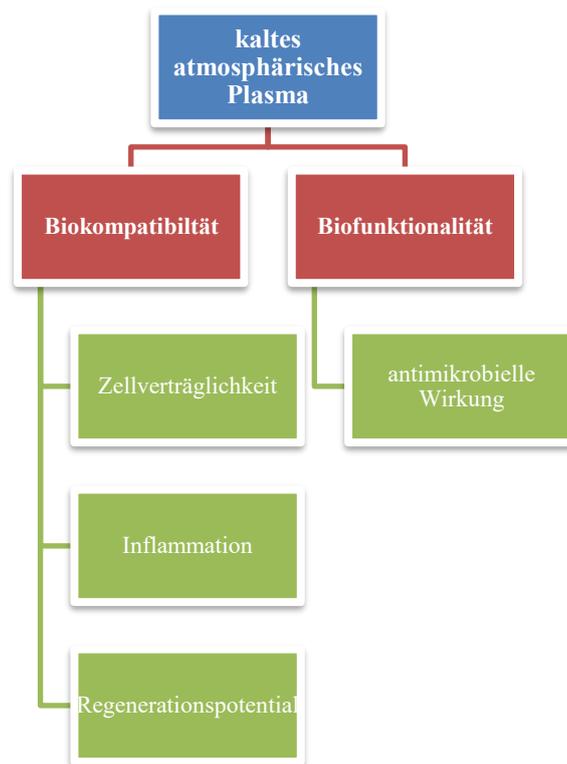


Abbildung 6: Untersuchung der Biokompatibilität und Biofunktionalität von kaltem atmosphärischem Plasma in dieser Arbeit.

1.11. Bedeutung von Hautinfektionen

Die mikrobielle Infektion der Epidermis, Dermis und Subkutis stehen in Verbindung mit lokalen Schmerzen und können zu schwerwiegenden Gesundheitsproblemen wie Sepsis, Endokarditis oder Osteomyelitis führen (Dahlman et al. 2017). Häufig werden diese durch opportunistische Mikroorganismen der Haut wie Bakterien oder Hefen unter bestimmten Bedingungen wie beispielsweise Immunsuppression ausgelöst. Dabei können die Mikroorganismen über die unverletzte Haut eindringen oder über vorgeschädigte Haut wie bei der atopischen Dermatitis (Aman et al. 2020). Ein besonderes Risiko stellen nosokomiale Infektionen dar, da die Krankheitserreger beispielsweise bei frisch operierten Wunden einfach in die Haut eindringen können. In Deutschland erkranken jährlich etwa 500.000 Menschen an nosokomialen Infektionen wobei bis zu 15.000 Patienten daran versterben (Gastmeier und Geffers 2008). Die Infektion erfolgt meist exogen über den Kontakt mit Personen oder kontaminierten Gegenständen oder endogen durch die Flora des Patienten selbst. Als häufigste Erreger von nosokomialen Infektionen gelten unter anderem *S. aureus*, *E. coli* oder auch *P. aeruginosa* (Mir et al. 2021). Neben den verschiedenen Bakterien gilt als Hauptverursacher von nosokomialen Infektionen auch die

Hefe *C. albicans*. Etwa 6,5% der Blutinfektionen werden durch *C. albicans* ausgelöst und können zu systemischen Infektionen führen (Meyer et al. 2013). *C. albicans* ist ein polymorpher Pilz, welcher als knospende Hefe, als Pseudohyphen oder echte Hyphen wachsen kann. Als Kommensale der humanen Haut kann er unter bestimmten Bedingungen wie Immunsuppression oder Veränderungen des Mikrobioms zum opportunistischen Pathogen werden (Mayer et al. 2013). Vergleichbar zu den Bakterien kann es bei langer antimykotischer Behandlung zu Resistenzen gegenüber Fungiziden kommen (Costa-de-Oliveira und Rodrigues 2020).

2. Ziele der Arbeit

Aufgrund seines therapeutischen Potentials wird kaltes atmosphärisches Plasma in der Medizin zukünftig eine große Rolle spielen. Durch die Komplexität der Plasmazusammensetzung birgt das Plasma ein mögliches Risikopotential für den Patienten. Für den Einsatz in der medizinischen Therapie ist daher die Prüfung der Sicherheit solcher Plasmageräte von höchster Bedeutung. Aus diesem Grund wurde von Wissenschaftlern eine DIN-Norm (DIN-SPEC 91315) für die Charakterisierung grundlegender Leistungsparameter sowie biologischer und biomedizinischer Experimente entwickelt. Die vorgegebenen Testungen umfassen beispielsweise Temperatur, Strahlungsemission, und Stromfluss der Plasmaquellen sowie dessen Effekte auf Mikroorganismen und Zellkulturen *in vitro* und stellen eine gute Grundlage dar.

In dieser Arbeit wurden daher erste Versuche zur Erforschung zwei verschiedener Plasmaquellen zunächst mittels 2D-Kultur durchgeführt. Bei den Plasmageräten handelte es sich einerseits um einen gepulsten Plasmajet und andererseits um eine DBD-Quelle, welche vergleichend analysiert wurden. Untersuchungen anhand von 2D-Kulturen spiegeln *in vivo* Bedingungen jedoch nicht ausreichend wider. Für eine realitätsnahe Untersuchung ist daher die Betrachtung in einem Zellverband notwendig, wobei auch der Einfluss von strukturellen Komponenten erfasst werden kann. Oftmals werden daher Tierversuche, beispielsweise in Form von Mausmodellen, angewandt. Der Aufbau der murinen Haut unterscheidet sich jedoch deutlich von der humanen Haut, sodass eine Übertragung der Ergebnisse schwierig ist. Als Intermediat zwischen *in vitro* und *in vivo* Bedingungen dienen 3D-Hautmodelle, welche den Aufbau der humanen Haut grundlegend widerspiegeln. Daher sollte in dieser Arbeit die Untersuchung der Biokompatibilität von KAP auf ein humanes 3D-Hautmodell übertragen werden. Dabei wurden verschiedene Behandlungsparameter ausgetestet, um anhand molekularbiologischer und histologischer Methoden einen verträglichen Parameterbereich zu ermitteln und die Biokompatibilität der Plasmaquellen dahingehend zu bewerten. Die antimikrobielle Wirkung auf verschiedene klinisch relevante Mikroorganismen sollte den Ergebnissen in Form der Biofunktionalität gegenübergestellt werden.

Der Hefepilz *Candida albicans* ist einer der Hauptverursacher von nosokomialen Infektionen, welche zu schwerwiegenden systemischen Infektionen führen können. *C. albicans* ist zudem in der Lage Resistenzen gegenüber den gängigen Fungiziden zu bilden, was Alternativbehandlungen notwendig macht. Nur wenige Studien haben sich mit der Interaktion zwischen Plasma und

infizierter Haut befasst. Besonders die molekularbiologischen Vorgänge sind bisher nicht untersucht worden. Zudem ist die Plasmabehandlung der Haut am 3D-Infektionsmodell in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Daher sollte in dieser Arbeit ein Hautmodell der kutanen Candidose für die Erforschung der Plasmabehandlung am Infektionsmodell etabliert werden. Es erfolgte dabei die Übertragung der erhaltenen Ergebnisse der Biokompatibilitätsuntersuchungen sowie der antimikrobiellen Wirkung auf das Infektionsmodell. Mittels verschiedener histologischer und molekularbiologischer Methoden sollte dabei untersucht werden, wie einerseits das Hautmodell auf eine Infektion reagiert. Andererseits galt es zu klären, ob Plasma in der Lage ist *C. albicans* im 3D-Infektionsmodell zu inaktivieren.

Abschließend sollte in dieser Arbeit ermittelt werden, ob das 3D-Hautmodell dazu geeignet ist die Plasmawirkung realitätsnah darzustellen. Die Effekte von KAP auf 2D-Kulturen oder Tiermodellen sind bereits nachgewiesen worden. Besonders pro-inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren sind bei der Erforschung von Interesse, da sie einen Einfluss auf die inflammatorische Reaktion und damit verbunden auch einen positiven Effekt auf die Regeneration der Haut haben können. Die Wirkung von Plasma auf humane 3D-Hautmodelle ist in der Literatur bisher kaum beschrieben. Daher erfolgte die Untersuchung der Plasmabehandlung der beiden Plasmaquellen am 3D-Hautmodell hinsichtlich der inflammatorischen Wirkung sowie Markern, welche für die Regeneration charakteristisch sind. Zusammen mit den Ergebnissen des Infektionsmodells sollte eine Beurteilung der Eignung des Hautmodelles für die Prüfung von Plasmageräten erfolgen.

Bei erfolgreicher Prüfung und Etablierung könnten diese Untersuchungen für die Entwicklung und Prüfung neuer Plasmageräte in diesem expandierenden Forschungsbereich einen grundlegenden Beitrag leisten.

3. Methodik

3.1. Materialien

Tabelle 2: Zelllinien und Bakterien

Bezeichnung	Hersteller
<i>A. baumannii</i> DSM 102929	DSMZ, Deutschland
<i>C. albicans</i> ATCC MYA-2876	ATCC, USA
<i>C. albicans</i> DSM 1386	DSMZ, Deutschland
<i>E. coli</i> DSM 498	DSMZ, Deutschland
HaCaT-Keratinocyten	DKFZ Heidelberg, Prof. Dr. N. E. Fusenig
<i>P. aeruginosa</i> DSM 22644	DSMZ, Deutschland
Primäre humane dermale Fibroblasten	PeloBiotech, Deutschland
Primäre humane epidermale Keratinocyten	Isoliert aus humaner Vorhaut - genehmigt von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der FSU Jena (4739-03/16)
<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117	DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Deutschland
<i>S. aureus</i> DSM 4910	DSMZ, Deutschland
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	ATCC (American Type Culture Collection), USA

Tabelle 3: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Adenin	Sigma Aldrich, USA
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich, USA
BSA	Merck, Deutschland
CaCl ₂	Serumwerk Bernburg, Deutschland
CASYton	OLS OMNI Life Science, Deutschland
Cell Conditioner	Roche, Schweiz
CelltiterBlue [®]	Promega, USA
Chlorhexidin	Sigma Aldrich, USA
Dispase	Sigma Aldrich, USA
DMEM F/12	Thermo Fisher; USA
DMEM High Glucose; 4,5 g/L	Bioconcept, Schweiz
DNase I	Thermo Fisher, USA
Dulbecco's PBS	Bioconcept, Schweiz
EDTA (Versen); 1 %	Merck, Deutschland

Einbettmedium (Histofluid)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Deutschland
Eosin	Merck, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth, Deutschland
ETDA (DNase I)	Thermo Fisher, USA
Ethanol, 96 %	Nordbrand Nordhausen, Deutschland
Ethanol, absolut	Nordbrand Nordhausen, Deutschland
EZ, Prep	Roche, Schweiz
FBS	PAN Biotech, Deutschland
Fibronektin	Promocell, Deutschland
Formalin-Lösung; 4 %-ig,	Dr. K. Hollborn & Söhne, Deutschland
Gelneutralisationslösung	Fraunhofer Institut, Deutschland
Gentamycin (10 mg/mL)	Thermo Fisher, USA
Hämatoxylin	Merck, Deutschland
hFGF	Cellsystems, Deutschland
Holo-Transferrin	BBI Solution, UK
Hydrokortison	Sigma Aldrich, USA
Insulin, human; 5 mg/ml	PeloBiotech, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Deutschland
Keratinocyte Basal Medium 2	Promocell, Deutschland
Kristallviolett	Sigma Aldrich, USA
Kryomedium	Promocell, Deutschland
MTT	Thermo Fisher, USA
NaCl	Fresenius Kabi, Deutschland
Oligo(dT)18 Primer	Thermo Fisher, USA
Paraffin	Merck, Deutschland
Penicillin/Streptomycin/Fungizone (PSF)	Bioconcept, Schweiz
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich, USA
Proteinase-K Lösung	AppliChem, Deutschland
Rattenschwanz-Kollagen	Fraunhofer Institut, Deutschland
Reaktionspuffer (DNase I)	Thermo Fisher, USA
Reinstwasser	Fresenius Kabi, Deutschland
Reverse Transkriptase	Thermo Fisher, USA
RLT (Lyse) Puffer	Qiagen, Deutschland
RNase-freies Wasser	Carl Roth, Deutschland
RT buffer	Qiagen, Deutschland
Sabouraud-Dextrose-Agar (SDA)-Platten	bioMérieux, Frankreich
Sabouraud-Glucose-Bouillon (SGB)	Merck, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, USA
Streptavidin-Peroxidase	Mabtech, Schweden
SYBR-Green	Qiagen, Deutschland
T ₃	Sigma Aldrich, USA
TMB Substrat	Thermo Fisher, USA
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher, USA

Trypton-Soja-Bouillon (TSB)	Sigma Aldrich, USA
Tween 20	Carl Roth, Deutschland
Xylol	Carl Roth, Deutschland
Yellow buffer	Qiagen, Deutschland

Tabelle 4: Zusammensetzung von Puffer und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Air-Lift-Medium	50% DMEM + 50% DMEM/F12 + 5% FBS + 0,05 mg/mL Gentamycin + 0,33 µg/mL Hydrokortison + 5 µg/mL Holo-Transferrin + 0,005 mg/mL Insulin + 3,99x10 ⁻⁹ mg/mL T3 + 13,51 µg/mL Adenin + 1,88 mM CaCl ₂
Ascorbinsäure-Lösung	90 mg Ascorbinsäure in 4,5 mL Reinstwasser
ELISA-Blockpuffer	PBS mit 0,1 % BSA
ELISA-Stopplösung	2N H ₂ SO ₄ in H ₂ O
ELISA-Waschpuffer	PBS mit 0,05 % Tween 20
Fibroblasten-Medium	DMEM + 2% FBS + 5 ng/ml hFGF + 5 µg/ml Insulin + 0,05 mg/mL Gentamycin
Flutmedium	DMEM + 10% FBS + 0,05 mg/mL Gentamycin
HaCaT-Medium	DMEM + 10% FBS + 1% PSF
IL-1α Reagent Diluent/IL-8 Block buffer	PBS + 1% BSA
IL-6 Incubation buffer	PBS + 0,05 % Tween + 0,1 % BSA
IL-8 Reagent Diluent	20mM Trizma base + 150 mM NaCl + 0.5 µl/ml Tween 20 + 0,1% BSA
Keratinocyten-Medium (+Supplemente) (Promocell, Deutschland)	Keratinocyte Basal Medium 2 + 5 µg/ml Insulin + 10 µg/ml Transferin + 4 µl/ml BPE + 0,125 ng/ml EGF + 0,33 µg/ml Hydrocortison + 0,39 µg/mL Epinephrine + 0,06 mmol/l CaCl ₂ + 0,05 mg/mL Gentamycin
LDH-Stopplösung	1M Essigsäure in PBS
Submersmedium	Keratinocyte Growth Medium 2 + 5% FBS + 0,05 mg/mL Gentamycin [+ 1,88 mM CaCl ₂]

Tabelle 5: Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Ki67-Antikörper (Primärantikörper)	Dako, Deutschland

Tabelle 6: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Absorptionsmessgerät	BMG-Labtech, Deutschland
ASYS Atlantis Mikropplatten-Wascher	Thermo Fisher, USA
AxioCam MRc - Kamera	Zeiss, Deutschland
AxioScope.A1 Mikroskop	Zeiss, Deutschland
Casy [®] Zellzahlmessgerät	Schärfe-System, Deutschland
CO ₂ -Brutschrank (5 % CO ₂ ; 37 °C)	Sanyo Electric, Japan
FLUOstarGalaxy	BMG Labtech, Deutschland
Heizplatte	Sigma Aldrich, USA
Histo-Färbeautomat, Autostainer XL	Leica, Deutschland
Histokinette, Shandon Exelsior ES,	Thermo Fisher Scientific, USA
IHC-Färbeautomat	Roche, Schweiz
Mikroskop für Zellbegutachtung	Olympus, Japan
Mikrotom	Leica, Deutschland
MolecuLight i:X [™]	Smith & Nephew, UK
PCR UV2 Werkbank	Analytik Jena, Deutschland
PlateFuge [™] Mikropplatten Zentrifuge	Benchmark Scientific, USA
PolarStar [®] Plattenlesegerät	BMG Labtech, Deutschland
QIAcube	Qiagen, Deutschland
qTOWER3G	Analytik Jena, Deutschland
Retsch [®] MM 301 Kugelmühle	Retsch, Deutschland
Schüttelwasserbad	Lauda, Deutschland
Schüttler	BMG-Labtech, Deutschland
SPECTROstar [®] Omega Plattenlesegerät	BMG Labtech, Deutschland
Sterilbank	Thermo Sicientific, USA
Thermocycler	Eppendorf, Deutschland
UV/Vis plate	BMG Labtech, Deutschland
Wärmeschrank	Heraeus, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf, Deutschland

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
12-well Mikrotiterplatte	Greiner bio-one, Österreich
Abdeckfolie	Greiner bio-one, Österreich
CASY cups	OLS OMNI Life Science, Deutschland
Columbia-Blutagar (COS)-Platten	Biomerieux, Frankreich
diverse PCR-Spitzen	StarLab, Deutschland
diverse Pipettenspitzen	Eppendorf, Deutschland
Hochbindende 96-well-MTP	Greiner bio-one, Österreich
Kanülen, Sterican Ø 1,2 mm	Braun, Deutschland

Mikrotiterplatte Schwarz, mit durchsichtigem Boden	Greiner bio-one, Österreich
Mikrotiterplatte, 96-well, F-Boden, klar	Greiner bio-one, Österreich
Müller-Hinton-Agar (MH)-Platten	Biomerieux, Frankreich
Objektträger	Thermo Scientific, USA
PCR Abdeckfolie	StarLab, Deutschland
PCR Platten	StarLab, Deutschland
Reaktionsgefäße, 0,5 mL	Qiagen, Deutschland
Reaktionsgefäße, 1,5 mL	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäße, 15 mL	Greiner bio-one, Österreich
Reaktionsgefäße, 2 mL	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäße, 5 mL	Eppendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße, 50 mL	Greiner bio-one, Österreich
Stahlkugeln	Retsch, Deutschland
Thincert® Platte, 12-well, klar	Greiner bio-one, Österreich
Thincert® Zellkultureinsatz für 12-well Platten, Porendurchmesser: 8 µm und 0,4 µm	Greiner bio-one, Österreich
Zellkulturflasche, 250 mL, 75 cm ²	Greiner bio-one, Österreich
Zellsieb	BD Bioscience, USA

Tabelle 8: Kits und Assays

Bezeichnung	Hersteller
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche, Schweiz
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher, USA
Human FGF basic DuoSet ELISA	Biotechne, USA
Human IL-1 alpha/IL-1F1 Quantikine ELISA Kit	Biotechne, USA
Human IL-6 ELISA development kit (HRP)	Mabtech, Schweden
Human IL-8/CXCL8 Quantikine ELISA Kit	Biotechne, USA
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Deutschland
ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (inkl. Sekundär-Antikörper)	Roche, Schweiz

Tabelle 9: Primersequenzen

Bezeichnung	Sequenz (5'– 3')
hBD-2_for	TGATGTCCTCCCCAGACTCA
hBD2_rev	CCACCAAAAACACCTGGAAGAG
IL1α_for	CGCCAATGACTCAGAGGAAGA
IL-1α_rev	AGGGCGTCATTCAGGATGAA

IL-6_for	CCACCGGGAACGAAAGAGAA
IL-6_rev	GAGAAGGCAACTGGACCGAA

Tabelle 10: kommerzielle Primer

Bezeichnung	Hersteller
CXCL-8/IL-8	Qiagen, Deutschland
FGF-2	Qiagen, Deutschland
FGF-7	Qiagen, Deutschland
IL-23	Qiagen, Deutschland
Ki67	Qiagen, Deutschland
RNase7	Qiagen, Deutschland
S100A7	Qiagen, Deutschland
TGF β	Qiagen, Deutschland
TNF α	Qiagen, Deutschland
β -Aktin	Qiagen, Deutschland

3.2. Zellbiologische Methoden

3.2.1. Zellkultur

Die Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt. Alle Zellen wurden mittels speziellem Kryomedium in flüssigem Stickstoff gelagert und bei Bedarf zügig aufgetaut. Die Zellsuspension wurde nachfolgend vorsichtig in das entsprechende Nährmedium getropft und die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Der Medium-Wechsel erfolgte dreimal wöchentlich, wobei die Zellen nach 7 Tagen bereit für das Passagieren waren.

HaCaT-Keratinocyten

Bei dieser Zellart handelt es sich um eine humane, epitheliale Zelllinie, die spontan transformiert und nicht tumorigen ist (Boukamp et al. 1988). Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. N.E. Fusenig (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Die Keratinocyten wurden in DMEM kultiviert, welches mit 10% FBS und Antibiotika (PSF) supplementiert war. Für das Passagieren der Zellen wurde das Medium komplett abgenommen und mit warmem PBS gespült. Durch die Behandlung der Zellen mit Trypsin-EDTA erfolgte das Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche. Nach etwa 10 min wurde der Vorgang durch die Zugabe von DMEM abgestoppt. Die Zellsuspension wurde anschließend für 5 min bei 1.000

rpm zentrifugiert und das erhaltene Pellet in DMEM aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Zellzahlmessgerät (Casy®). Für die 2D-Versuche wurde eine Zellzahl von $7,5 \times 10^5$ Zellen/mL eingestellt und jeweils 500 μ L in 24-*well*-Platten pipettiert. Nach 24h Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ konnte die Plasmabehandlung erfolgen.

Fibroblasten

Das Passagieren der Zellen erfolgte mittels Trypsin-Behandlung. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit warmem PBS gespült. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Trypsin für 2-3 min, um die Zell-Zell-Verbindungen zu lösen. Durch Klopfen und Schütteln wurden die Zellen vorsichtig von der Zellkulturflasche gelöst und der Vorgang mit PBS + 10% FBS gestoppt. Nachfolgend wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugen-Röhrchen gegeben und für 5 min bei 1.000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Die Zellzahl der Suspension wurde mittels Casy®-Zellzahlmessgerät bestimmt und die entsprechende Zellzahl in Zellkulturflaschen eingesät oder für die Herstellung von Hautmodellen verwendet.

Primäre Keratinozyten

Primäre epidermale Keratinozyten wurden aus humaner juveniler Vorhaut isoliert. Die Genehmigung erfolgte durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität, Jena (4739-03/16).

Für die Isolation der Keratinozyten wurde das Gewebe kurz in 70% Ethanol getaucht und auf einem Tablett fixiert, um Fett und Blutgefäße zu entfernen. Die Vorhaut wurde dann über Nacht in Dispase (22U/mL) im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Trennung von Epidermis und Dermis durch Abstreifen mit einer Pinzette. Die Epidermis wurde anschließend für maximal 10 min mit Trypsin behandelt. Das Abstoppen des Trypsinierungsvorganges erfolgte durch PBS + 10% FBS. Die Zellsuspension wurde über ein Zellsieb in ein Zentrifugen-Röhrchen gegeben und nochmals mit PBS + 10% FBS nachgespült. Anschließend wurde die Suspension für 5 min bei 1.000 rpm (ohne Bremse) zentrifugiert und das Pellet in Keratinozyten-Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde mittels Casy®-Zellzahlmessgerät bestimmt und eine entsprechende Zellzahl in Zellkulturflaschen eingesät. Die Keratinozyten wurden auf Masse kultiviert und in Kryomedium bis zum Gebrauch in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2.2. Herstellung von kollagenbasierten 3D-Hautmodellen (CHM)

Die Hautmodelle bestehen aus einer Kollagen-Matrix mit eingebetteten Fibroblasten. Nach einer Woche werden primäre Keratinozyten dazugegeben, welche die Epidermis bilden. Im *Air-Lift* wird ein Milieu hergestellt, welches der Differenzierung der Epidermis dient.

Für die Herstellung der 3D-Hautmodelle wurden frisch passagierte humane Fibroblasten verwendet. Diese wurden in gekühlter Gelneutralisationslösung aufgenommen und mit dem Kollagen vermischt (1×10^5 Fibroblasten pro ml Kollagengemisch). Jeweils 750 μL des Kollagengemisches wurden zügig in die Inserts (Porengröße 8 μm) pipettiert und anschließend zur Aushärtung für 15 min im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nachfolgend wurden die Inserts und die Außenseite der Inserts mit Flutmedium gefüllt. Die Dermis-Modelle wurden dann für 7 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und das Medium alle 3 Tage gewechselt, sodass anschließend die Epidermis erstellt werden konnte. Dafür wurde das Flutmedium vollständig von den Hautmodellen entfernt, Fibronectin-Lösung (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) auf die Modelle gegeben und für 30 min im Brutschrank inkubiert. Währenddessen wurden die primären Keratinozyten aufgetaut, wobei die Zellsuspension vorsichtig in PBS + 10% FBS getropft wurde. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1.000 rpm sowie Zellzahlbestimmung wurden 150 μL Keratinozytensuspension (ca. 1×10^6 Zellen/mL) auf die Hautmodelle gegeben und für 45 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das restliche Flutmedium entfernt und das Insert sowie die Außenseite mit Submers-Medium gefüllt und für 7 Tage im Brutschrank inkubiert. Der Medium-Wechsel erfolgte alle 3 Tage, wobei beim letzten Wechsel dem Submers-Medium CaCl_2 supplementiert wurde. Als letzter Schritt schloss sich die *Air-Lift*-Kultivierung an, wobei die Hautmodelle an der Medium-Luft-Grenze kultiviert wurden. Dafür wurden die Hautmodelle in den Inserts in Thincerts™-Platten mit *Air-Lift*-Medium umgesetzt, sodass die Modelle nur von unten versorgt wurden. Die Inkubation erfolgte für 12 Tage, wobei das Medium 2-mal wöchentlich gewechselt wurde. Die ausdifferenzierten Hautmodelle konnten nun für die entsprechenden Versuche verwendet werden.

Für histologische Untersuchungen wurden die behandelten Hautmodelle in Formalin gelagert. Mittels flüssigen Stickstoffes erfolgte die Konservierung der Modelle für die spätere RNA-Isolierung. Die Überstände wurden für biochemische Untersuchungen gesammelt und bei -20°C eingefroren.

3.2.3. Herstellung von inhärenten Hautmodellen (FDM)

Diese Hautmodelle unterscheiden sich von den CHM darin, dass sie ihre eigene Kollagenmatrix bilden. Die Medien für die Herstellung von FDM waren mit den Medien von CHM identisch, es musste jedoch Ascorbinsäure supplementiert werden, um die Kollagenbildung der Fibroblasten zu anzuregen.

Für die Herstellung der Hautmodelle wurden frisch passagierte humane Fibroblasten verwendet. Diese wurden in Flutmedium (+150µg/ml Ascorbinsäure) aufgenommen und eine Zellzahl von $1,5 \times 10^5$ /mL eingestellt. In jedes Insert (Porengröße 0,4 µm) erfolgte die Zugabe von 1 mL Zellsuspension. Der Medium-Wechsel erfolgte alle 4 Tage, sodass nach 21 Tagen die Keratinozyten dazugegeben werden konnten. Die weiteren Schritte sind mit der Herstellung von CHM identisch.

3.3. Plasmageräte

3.3.1. Plasmajet

Eines der zu testenden Plasmageräte ist der gepulste Plasmajet der Firma Tigres. Dieser wurde von Innovent e.V. zur Verfügung gestellt. Die Plasmaanlage besteht aus einer Steuereinheit, einer elektrischen Versorgungseinheit sowie einer Prozessgasversorgung und dem Plasmakopf. Der Plasmakopf selbst besteht aus einer konzentrisch liegenden Innenelektrode, an welcher Hochspannung anliegt, während die Außenelektrode geerdet ist (Abb. 7A; verändert nach (Weltmann et al. 2010)). Unter konstantem Druck von 6 bar kann der Plasmajet mittels verschiedener Gasquellen zwischen den beiden Elektroden Plasma produzieren, welches aufgrund der gepulsten Erzeugung eine Temperatur von $\leq 40^\circ\text{C}$ besitzt (Abb. 7B; nach (Fink 2015)). Das Plasma wird durch den entstandenen Gasdruck aus der Düse zum Anwendungsort transportiert. Für die Plasmabehandlung wurden die Platten, Hautmodelle in den Inserts oder die Mikroorganismen in Agarplatten auf einem Objektisch fixiert und mit einem Arbeitsabstand von 10 mm zur Plasmadüse ausgerichtet. Für die elektrische Leistung wurden die Parameter 30W und 60W gewählt. Die punktförmige Behandlung der Hautmodelle sowie Mikroorganismen erfolgte mittels Luft oder Stickstoff als Arbeitsgas.

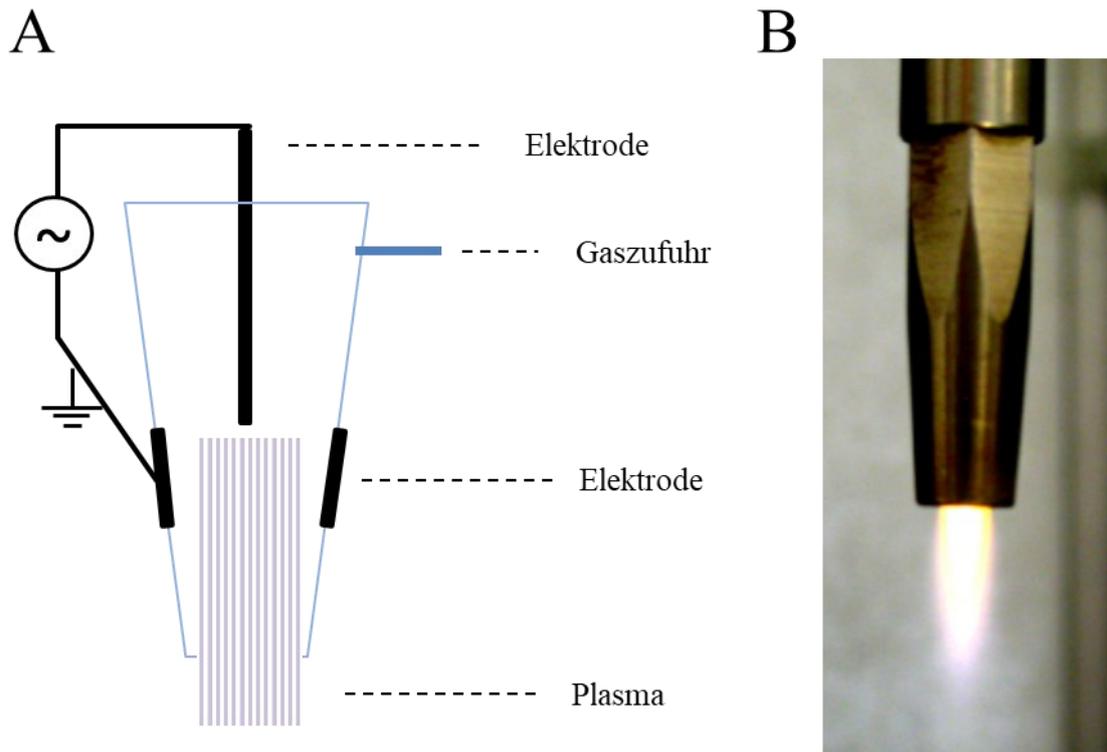


Abbildung 7: Aufbau des Plasmajets. Schematische Illustration des Geräteaufbaus (A) sowie Darstellung des Plasmakopfes bei gezündetem Plasma mit Luft als Arbeitsgas (B).

3.3.2. DBD-Quelle

Dieses Gerät wurde vom Institut für Mikro- und Nanotechnologien der TU Ilmenau entwickelt und in Kooperation für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Es besteht grundlegend aus einer Stromversorgung und einem Handstück (Abb. 8A). Am Ende des Handstückes befindet sich ein Plasmachip (Durchmesser ca. 10 mm), welcher mittels LTCC-Technologie (Low Temperature Cofired Ceramic) hergestellt wurde (Abb. 8B; verändert nach (Fischer et al. 2017)). Diese indirekte Plasmaquelle verwendet das Prinzip der dielektrischen Barriereentladung (DBD, Dielectric Barrier Discharge) und wird daher im Folgenden als DBD-Plasmaquelle bezeichnet. Bei dem DBD-Prinzip wird im Allgemeinen mindestens eine Elektrode mittels dielektrischer Barriere (z.B. Keramik) zum Plasmaraum hin isoliert (Hans-Robert Metelmann 2016). Der Plasmachip des Gerätes enthält koplanar angeordnete Elektroden, welche im Dielektrikum eingebracht sind (Abb. 8B). Bei einer elektrischen Leistung von ca. 5W entsteht das Plasma an der Oberfläche des Plasmachips zwischen den Elektroden. Durch die koplanare Anordnung der Elektroden im Plasmachip wird kein Strom durch das Behandlungsobjekt geleitet. Im Gegensatz zum oben beschriebenen Plasmajet benötigt diese Plasma-Quelle keine externe

Gaszufuhr, sondern nutzt die Umgebungsluft als Arbeitsgas. Der Prototyp ist mit einem Abstandhalter konstruiert, sodass ein gleichmäßiger Behandlungsabstand von 1 mm gewährleistet werden konnte.

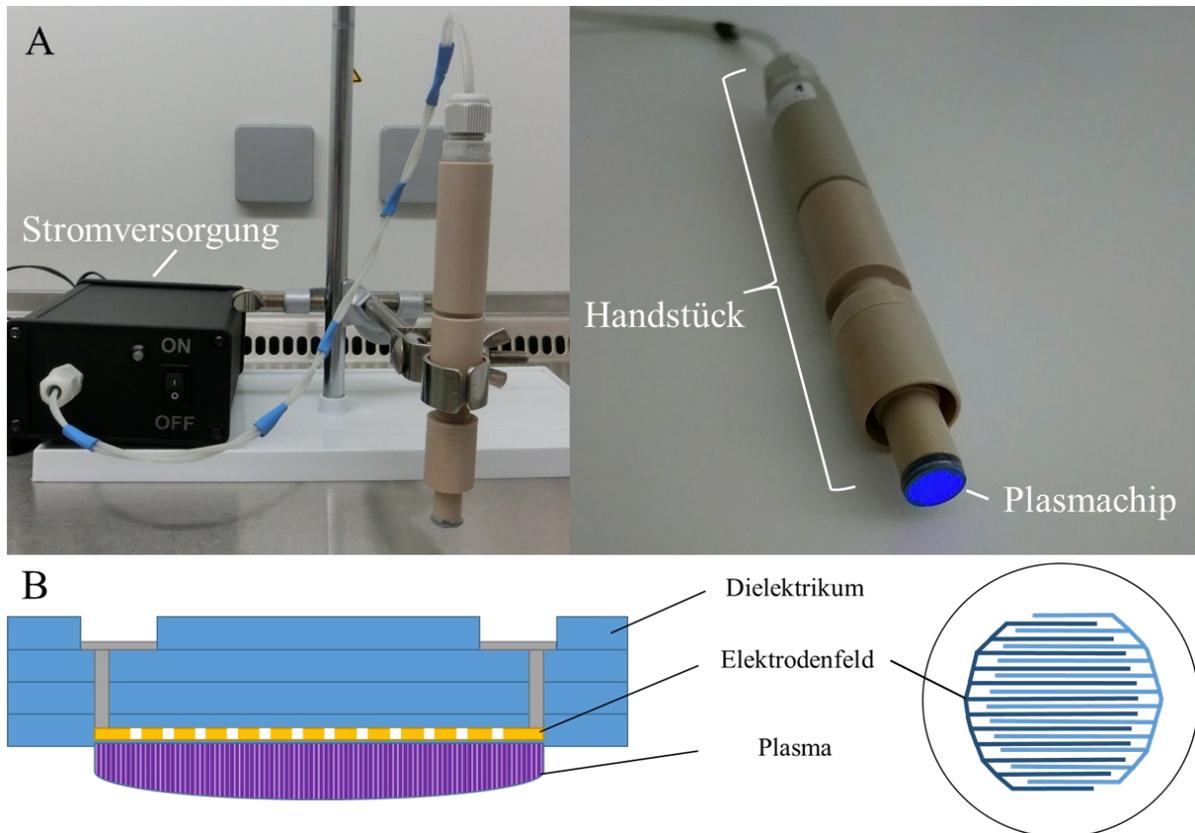


Abbildung 8: DBD-Plasmaquelle. Geräteaufbau (A) sowie Darstellung des Plasmachips mit dem Elektrodenfeld (B), bestehend aus zwei Elektroden.

3.4. Molekularbiologische Methoden

3.4.1. RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurden die Hautmodelle im gefrorenen Zustand aus den Gefäßen entnommen, in RNase-freie Reaktionsgefäße mit Stahlkugeln überführt und jeweils 600 μL RLT-Puffer (mit β -Mercaptoethanol) dazugegeben. Mittels Kugelmühle wurden die Hautmodelle für 2 min homogenisiert und das Lysat in ein neues Röhrchen überführt. Das Reaktionsgefäß mit den Stahlkugeln wurde anschließend mit 600 μL RNase-freiem Wasser gespült und die Flüssigkeit zu dem restlichen Lysat gegeben. In jedes Reaktionsgefäß wurde nachfolgend 12 μL Proteinase-K gegeben und die Lysate für 10 min bei 55°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 600 μL RLT-Puffer und Zentrifugation für 3 min bei 10.000 rpm bei

Raumtemperatur. 600 µL des Überstandes wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben und die RNA mittels QIAcube laut Vorgaben des Herstellers isoliert.

3.4.2. Entfernung von Fremd-DNA

Für die Entfernung von Fremd-DNA wurde zu 41 µL der isolierten RNA 5 µL Reaktionspuffer sowie 4 µL DNase gegeben und für 30 min bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit 2 µL EDTA abgestoppt und für 10 min bei 65°C inkubiert. Die Proben konnten dann weiterverarbeitet oder bei -80°C eingefroren werden. Für die Bestimmung der RNA-Konzentration wurden jeweils 2 µL RNA auf einer UV-VIS-Platte gemessen und anschließend eine RNA-Konzentration von 200 ng RNA pro Reaktionsgefäß eingestellt.

3.4.3. Herstellung von cDNA-Reverse Transkription

Für das Umschreiben der RNA in cDNA wurde ein Master-Mix entsprechend der aufgeführten Tabelle hergestellt.

Tabelle 11: Herstellung des cDNA-Mastermixes

Komponente	Volumen/Reaktion [µL]
10x RT Puffer	2,0
25× dNTP Mix (100 mM)	0,8
20×Oligo(dT)18 Primer	1,0
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1,0
RNase-freies H ₂ O	5,2

Es wurden jeweils 10 µL Master-Mix und 10 µL RNA in ein Reaktionsgefäß gegeben und im Thermocycler folgende Zyklen durchlaufen:

Tabelle 12: Zyklen der cDNA-Synthese

	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4
Temperatur [°C]	25	37	85	4
Zeit [min]	10	120	5	∞

Die gewonnene cDNA konnte bis zu Gebrauch bei -80°C eingefroren werden.

3.4.4. Realtime qPCR

Vor der Verwendung in der RT qPCR wurde die cDNA in *yellow-buffer* verdünnt. Dafür wurden 8 μL cDNA auf 152 μL *yellow buffer* gegeben. Der Mastermix für die RT-qPCR wurde laut folgender Tabelle hergestellt:

Tabelle 13: Herstellung des Mastermixes für die RT-qPCR

		1x Reaktion (Eurofins-Primer)	1x Reaktion (Qiagen Primer)
2x Sybr Green (QuantiNova, Qiagen)		10 μl	10 μl
Primer fw (10 μM)	Primer (10x) Qiagen	1 μl	2 μl
Primer rv (10 μM)		1 μl	
H ₂ O		5 μl	5 μl
Σ		17 μl	17 μl

Jeweils 17 μL des Master-Mixes wurden in eine PCR-Platte pipettiert und 3 μL cDNA dazugegeben. Für die Leerkontrolle wurde 3 μL *yellow buffer* zu dem Mastermix gegeben. Anschließend wurde die Platte mit einer hitzebeständigen Folie abgedeckt, zentrifugiert und im qTower die Messungen durchgeführt:

Tabelle 14: Zyklen der RT-qPCR

	Temperatur [°C]	Zeit
Initialisierung	95	3 min
Denaturierung	95	5 s
Annealing	57	10 s
Extension/Elongation	72	10 s
Anzahl Zyklen	40	
Schmelzkurve	65 - 95	1°C/ s

3.5. Biochemische Methoden

3.5.1. Zytotoxizitätsbestimmung

Dieser Test beruht auf der Messung der Laktat-Dehydrogenase, welche bei nekrotischem Zelltod in den Überstand abgegeben wird. Die Analyse erfolgte mittels des „*Cytotoxicity Detection Kit*“ laut Angaben des Herstellers. Dafür wurden jeweils 50 μL des Zellkulturüberstandes in eine klare 96-*well*-Platte gegeben und 50 μL Substratlösung dazugegeben. Nach 30 min Inkubation im Dunkeln wurde der Vorgang abgestoppt und die Absorption anschließend im FluostarGalaxy bei 490 nm mit der Referenzwellenlänge 620 nm gemessen.

3.5.2. MTT-Viabilitätstest

Dieser kolorimetrische Assay beruht auf der Reduktion eines gelben Tetrazoliumsalzes zu einem lilafarbenen Formazansalz durch metabolisch aktive Zellen.

Für die Untersuchung der Viabilität wurde der Überstand der Zellen abgenommen und durch 500 μL MTT-Lösung (3 mg/mL in PBS) ersetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation im Brutschrank für 2h bei 37°C und 5% CO₂. Die MTT-Lösung wurde verworfen und je 1 mL Isopropanol in die *Wells* pipettiert. Nach der Inkubation auf dem Schüttler für 2h im Dunkeln wurde je 200 μL der Probe in eine durchsichtige MTP gegeben und die Absorption bei 550 nm am FluostarGalaxy gemessen.

3.5.3. Sekretionsanalyse

Die Bestimmung der Sekretion spezifischer Proteine erfolgte anhand des Zellkulturüberstandes und wurde mittels eines *Enzyme-linked-Immunesorbent-Assay* (ELISA) gemessen. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Vorgaben der Hersteller:

Tabelle 15: Schematischer Verlauf des ELISA

	IL-6	IL-1α; IL-8; FGF-2
Beschichtung	Primärantikörper; Inkubation über Nacht im Kühlschrank	Primärantikörper; Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur
Waschen	2x 200 μ l PBS	3x 400 μ l Waschpuffer
Blockieren	200 μ l 0,1 % BSA in PBS-Tween	300 μ l 1 % BSA in PBS
Inkubation	1 h bei RT	
Waschen	5x 300 μ l Waschpuffer	3x 400 μ l Waschpuffer
Zugabe	100 μ l Zellkulturüberstand bzw. Standard	
Inkubation	2 h bei RT	
Waschen	5x 300 μ l Waschpuffer	3x 400 μ l Waschpuffer
Zugabe	100 μ l spezifische Antikörperlösung	
Inkubation	1 h bei RT	2 h bei RT
Waschen	5x 300 μ l Waschpuffer	3x 400 μ l Waschpuffer
Zugabe	100 μ l Streptavidin-konjugierte Peroxidase	
Inkubation	1 h bei RT	20 min bei RT
Waschen	5x 300 μ l Waschpuffer	3x 400 μ l Waschpuffer
Zugabe	100 μ l TMB-Substrat-Lösung	
Inkubation	20 min im Dunkeln	
Zugabe	100 μ l Stopplösung	

Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm im Spectrostar Omega mit einer Referenzwellenlängenmessung bei 620 nm. Die quantitative Auswertung erfolgt anhand der Standardkurve.

3.6. Histologische Methoden

Für eine spätere histologische Präparation und Fixierung wurden die Hautmodelle in Formalin aufbewahrt. Zunächst wurden die Hautmodelle in einer Histokinette in aufsteigender Alkoholreihe bei 40°C inkubiert. Nach dreimaliger Behandlung mit 40 °C warmem Xylol erfolgte die Überführung in 60°C warmes Paraffin. Vor dem Schneiden am Mikrotom wurden die ausgehärteten Blöcke bei -15°C gelagert, um anschließend Schnitte von ca. 4 μ m Dicke anzufertigen. Nach der Inkubation im 40°C warmen Wasserbad konnten die Schnitte auf Objektträger aufgezogen werden. Die Trocknung erfolgte auf einer Heizplatte bei 45°C und im Wärmeschrank bei 60°C für 35 min.

3.6.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Durch eine absteigende Alkoholreihe wurde das enthaltene Paraffin entfernt, um die Färbung mittels Färbeautomat durchzuführen.

Tabelle 16: Ablauf der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Reagenz	Inkubationszeit
Xylol	5 min + 10 min
absoluter Alkohol	1 min + 3 min
96% Alkohol	3 min + 3 min
70% Alkohol	3 min
50% Alkohol	3 min
Aqua dest.	3 min
Hämatoxylin	4 min
Leitungswasser	10 min
Aqua dest.	3 min + 3 min
Eosin	2 min
Leitungswasser	5 min
Aqua dest.	3 min + 5 min
50% Alkohol	3 min
70% Alkohol	3 min
96% Alkohol	5 min
absoluter Alkohol	3 min + 3 min
Xylol	2 min + 5 min

Mittels Einbettmedium und einem Deckglas wurden die Schnitte auf dem Objektträger fixiert.

3.6.2. Periodsäure-Schiff-Färbung (PAS-Färbung)

Mittels PAS-Färbung können pilzspezifische Bestandteile wie Glykoproteine und Proteoglykane sichtbar gemacht werden, um einen Nachweis der Pilzinfektion zu ermöglichen.

Tabelle 17: Ablaufprotokoll der Periodsäure-Schiff-Färbung

Periodsäure-Schiff-Färbung

Reagenz	Inkubationszeit
Aqua dest.	Spülen
Periodsäure	5 min
Leitungswasser	3 min
Aqua dest.	Spülen
Schiffs-Reagenz	15 min
Leitungswasser	3 min
Aqua dest.	Spülen
Hämatoxylin	2 min
Leitungswasser	3 min
50% Alkohol	Spülen
70% Alkohol	Spülen
Alkohol, absolut	Spülen
Xylol	Spülen

Mittels Einbettmedium und einem Deckglas wurden die Schnitte auf dem Objektträger fixiert. Für die Graphische Auswertung der Infektion wurden die Schnitte ohne Gegenfärbung (Hämatoxylin) erstellt. Anhand des Bildbearbeitungsprogrammes ImageJ wurde das Verhältnis zwischen infizierter und nicht-infizierter Fläche bestimmt.

3.6.3. Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemischen (IHC) Färbungen der Hautmodelle wurden mittels des IHC-Färbautomaten nach Ablaufprotokoll des Herstellers durchgeführt. Für die Inkubationsschritte wurde ein flüssiger *Coverslip* erzeugt, um einen einheitlichen Reaktionsraum aufrechtzuerhalten. Dabei können die Reagenzien ohne die Verdunstung von Flüssigkeit einwirken. Nachfolgend wurden die Schnitte mittels EZ-Prep entparaffiniert und mit *Cell-Conditioner* behandelt. Dies dient der Hydrolyse der kovalenten Proteinvernetzungen und der Unterstützung der Bindung von spezifischen Antikörpern. Nachfolgend wurden die Objektträger mit Reaktionspuffer gewaschen und der Primärantikörper aufgetragen und inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurde die Antigen-Antikörper-Bindung mittels *Alkaline-Phosphatase-Red Detection Kit* sichtbar gemacht und die Schnitte mittels Einbettmedium und Deckglas eingedeckt.

3.7. Bestimmung der antimikrobiellen Wirkung

3.7.1. Kultivierung von Bakterien

Für die Experimente zur Kultivierung von Bakterien wurde am Vortag eine Gebrauchskultur angesetzt. Dafür wurden 2-3 Kolonien von der Stammkultur entnommen und in 20 mL Trypton-Soja-Bouillon gegeben und über Nacht im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert.

3.7.2. Kultivierung von Hefen

Für den Ansatz der Gebrauchskultur zur Kultivierung von Hefen wurde am Vortag von der Stammkultur 2-3 Kolonien entnommen und in 20 mL Sabouraud-Glukose-Bouillon gegeben. Die Inkubation über Nacht erfolgte bei 37°C im Schüttelwasserbad.

3.7.3. Untersuchung kontaminierter Agar-Oberflächen (Agar-Test)

Für den Agar-Test wurden die Übernacht-Kulturen 1:10 in 0,9% NaCl verdünnt und 100 µL der Suspension auf Sabouraud-Dextrose-Agar-Platten (Hefen) bzw. Müller-Hinton-Agarplatten (Bakterien) ausplattiert. Nach der Plasmabehandlung erfolgte die Inkubation im Brutschrank über Nacht bei 37°C. Anschließend wurde der entstandene Hemmhof bewertet.

3.7.4. Biofilm-Herstellung

Zur Biofilm-Herstellung wurden jeweils 1-2 Kolonien in das jeweilige Nährmedium gegeben und bei 37°C im Schüttelwasserbad für ca. 4h geschüttelt. Danach wurde am SpectroStar Omega die optische Dichte der Bakterien-Suspension bei 600 nm gemessen. Diese sollte zwischen 0,4 und 0,6 liegen. Anschließend wurde die Zellsuspension 1:10 im jeweiligen Medium verdünnt und je 2 mL in jedes Well einer 12-well-Platte gegeben. Für den Ansatz mit *P. aeruginosa* wurde das Nährmedium 1:20 in NaCl verdünnt, um einen optimalen Biofilm zu erhalten. Nach 24h erfolgte der Medium-Wechsel, wobei der *S. aureus*-Biofilm einmal mit PBS gewaschen wurde, um nicht haftende Zellen zu entfernen. Nach 48h war der Biofilm ausgereift und konnte mit Plasma behandelt werden.

3.7.5. Plasmabehandlung des Biofilms

Aus technischen Gründen erfolgte die Plasmabehandlung des Biofilms nur mit der DBD-Quelle. Hierfür wurde das Nährmedium verworfen und die Plasmaquelle mit 1 mm Abstand

zum Biofilm platziert. Die Plasmabehandlung erfolgte bis zu 2 min. Anschließend wurde 1 mL NaCl auf den behandelten Biofilm gegeben um eine Austrocknung zu verhindern. Als Negativkontrolle diente das NaCl. Anschließend erfolgte die Viabilitätsmessung mittels CelltiterBlue® und der Nachweis der Biofilm-Haftung mittels Kristallviolett-Färbung.

CelltiterBlue®-Färbung

Der CelltiterBlue®-Assay ist ein Fluoreszenz-basierter Test für den Viabilitäts-Nachweis von Zellen. Lebende Zellen sind bei diesem Test in der Lage, den Redox-Farbstoff Resazurin in fluoreszentes Resorufin umzuwandeln.

Nach der Plasmabehandlung wurde der Überstand verworfen und mit CelltiterBlue®-Lösung (1:10 verdünnt in Nährmedium) ersetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation im Brutschrank bei 37°C. Die Inkubationszeit richtete sich dabei nach der metabolischen Aktivität der Mikroorganismen und konnte bis zu 4h betragen. Anschließend wurde 100 µL Lösung in eine schwarze Mikrotiterplatte (MTP) überführt und die Fluoreszenz am PolarStar® gemessen.

Kristallviolett-Färbung

Kristallviolett ist ein kationischer Triphenylmethanfarbstoff, der zum Anfärben von Mikroorganismen verwendet wird und auch der Massebestimmung von Biofilmen dient. Bei dieser Färbung lassen sich jedoch lebende von toten Zellen nicht unterscheiden.

Der Überstand wurde aus den Platten entfernt und der Biofilm im Brutschrank bei 37°C für 30 min getrocknet. Anschließend wurde in jedes Well 0,1%ige Kristallviolett-Lösung gegeben und weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte das zweimalige Waschen der Platten mit PBS, um die überflüssige Farbe zu entfernen. Es folgte ein weiterer Trocknungsschritt der Platten für 30 min bei 37°C. Zum Lösen des Farbstoffes wurde anschließend je 1 mL Ethanol in jedes *Well* gegeben und auf dem Schüttler bei 400 rpm für 30 min geschüttelt. 100 µL des Überstandes wurden nachfolgend in eine durchsichtige MTP gegeben und die optische Dichte bei 570nm gemessen.

3.8. Infektion und Plasmabehandlung von Hautmodellen (FDM)

Für die Infektionsversuche wurde das Antibiotikum 3 Tage vor Infektion aus der Rezeptur des *Air-Lift*-Mediums entfernt und das Medium am Tag der Infektion nochmals gewechselt. Die *C. albicans*-Kultur wurde wie in 3.7.2. beschrieben über Nacht kultiviert. 1 mL der Mikroorganismen-Suspension wurde in ein steriles Röhrchen gegeben und 10 min bei 4°C und 3.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin verworfen und das Pellet in 1 mL PBS aufgenommen und nochmals zentrifugiert. Nach der Aufnahme des Pellets in 1 mL PBS konnte die Suspension auf die Hautmodelle gegeben werden. Jeweils 20 µL der *C. albicans*-Suspension wurde je Hautmodell pipettiert und für 1h im Brutschrank inkubiert. Anschließend konnte die Plasmabehandlung erfolgen. Danach wurden die Hautmodelle im Brutschrank inkubiert. Die Probenentnahme und molekularbiologischen Analysen erfolgten nach 1h, 24h und 48h.

Analyse der Autofluoreszenz von *C. albicans*

Anhand des Bildgebungsgerätes MolecuLight i:X™ lassen sich Mikroorganismen in Echtzeit visualisieren. Das Untersuchungsobjekt wird dabei mit violetterem Licht (405 nm) bestrahlt, wobei Matrixbestandteile wie Kollagen grün fluoreszieren. Aufgrund von endogen produzierten Porphyrinen oder Pyoverdin emittieren verschiedene Mikroorganismen beispielsweise ein rotes oder grünes Fluoreszenzsignal und lassen sich somit auf dem Hautmodell sichtbar machen.

Für die Analyse der Autofluoreszenz von *C. albicans* wurden die Hautmodelle vorsichtig aus ihren Inserts entfernt und auf eine dunkle Unterlage platziert. Von den Hautmodellen wurden nach 1h, 24h und 48h Bilder erstellt.

3.9. Statistische Analyse

Alle Versuche wurden mindestens in zwei voneinander unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Dabei erfolgte bei den einzelnen Messungen mindestens eine Doppelbestimmung. Die statistische Auswertung wurde mittels des nichtparametrischen Mann-Whitney (U)-Testes anhand der Statistiksoftware IBM SPSS 27 durchgeführt. Die Auswertungen, Tabellen und Abbildungen wurden mit Microsoft Excel sowie OriginLab 2019 erstellt. Statistisch signifikante Werte werden in den Diagrammen durch Sternsymbolik gekennzeichnet, wobei für p -Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.

4. Ergebnisse

Die im Folgenden vorgestellten, durchgeführten Versuche an den beiden Plasmageräten unterscheiden sich teilweise. Dies ist durch die technischen Limitationen des Plasmajets hervorgerufen. Bei dem Plasmajet handelt es sich um eine größere Anlage (L x B x H: 1,95m x 1,65m x 1,00 m), welche mit einem Gasdruck von 6 bar arbeitet, der nicht abgeändert werden kann. Dadurch konnten die antimikrobiellen Versuche zum Biofilm oder der Infektion der Hautmodelle nicht durchgeführt werden, da der hohe Gasdruck z.B. zum Abtragen des Biofilms führte und in Kreuzkontaminationen resultierte. Damit ist der getestete Plasmajet auch nicht für zukünftige, klinische Anwendungen geeignet und die Weiterentwicklung des Gerätes wurde eingestellt. Daher wurden die Infektionsversuche der Hautmodelle ausschließlich mit der vielversprechenderen DBD-Quelle durchgeführt.

4.1. Untersuchungen zum Plasmajet

Teilergebnisse des folgenden Abschnittes zum Plasmajet wurden wie folgt vorab publiziert:

- Atmosphärische Plasmen: Anwendungen, Entwicklungen, Anlagen. Technologie-Spezial zum 10-jährigen Jubiläum des Anwenderkreises Atmosphärendruckplasma (ak-adp).2019. ISBN: 978-3-00-063646-2
- Plasmamedizin-Workshop des ak-adp (Anwenderkreis Atmosphärendruckplasma): Therapeutischer Einsatz von physikalischem Plasmen, Neue Erkenntnisse aus Physik, Medizin und Biologie; 13.-14.09.2017 in Rostock
- Horn K, Beier O, Wiegand C, Laaouina A, Fink S, Pfuch A, Schimanski A, Gruenler B, Hipler U. 2017. Screening Test of a New Pulsed Plasma Jet for Medical Application. Plasma Medicine, 7 (2):133-145.

4.1.1. Antimikrobielle Wirkung

Um die antimikrobielle Wirkung des Plasmajets zu ermitteln, wurde ein Agar-Test verwendet. Dabei handelt es sich um die Nachstellung einer kontaminierten biologischen Oberfläche mittels Agarplatten. Hierfür erfolgte die Ausplattierung verschiedener klinisch relevanter Mikroorganismen. Nach punktförmiger Behandlung und Inkubation wurde der entstandene Hemmhof ausgewertet. Im Vergleich wurden die eingesetzten Leistungen von 30W und 60W betrachtet sowie unterschiedliche Arbeitsgase (Abb. 9). Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Besonders deutliche Unterschiede zeigt die Verwendung der verschiedenen Arbeitsgase. Während der Einsatz von Stickstoff als Arbeitsgas (Abb. 9B) generell eine sehr gute antimikrobielle Wirkung aufweist, ist dieser Effekt bei Luft (Abb. 9A) vergleichsweise deutlich geringer. Weiterhin hat die Höhe der eingesetzten Leistung einen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität. Der Einsatz von 60W Leistung hat einen stärkeren antimikrobiellen Effekt verglichen mit 30W Leistungseinsatz. Zusätzlich ist die Effektstärke abhängig von der Behandlungszeit. Die Unterschiede in der Wirksamkeit zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien sind gering. Im Gegensatz dazu zeigt die Plasmabehandlung der Hefe *C. albicans* eine schwächere antimikrobielle Wirkung im Vergleich zu den eingesetzten Bakterienstämmen. Die Behandlung mit dem Arbeitsgas, ohne die Zündung des Plasmas, hat keinen antimikrobiellen Effekt.

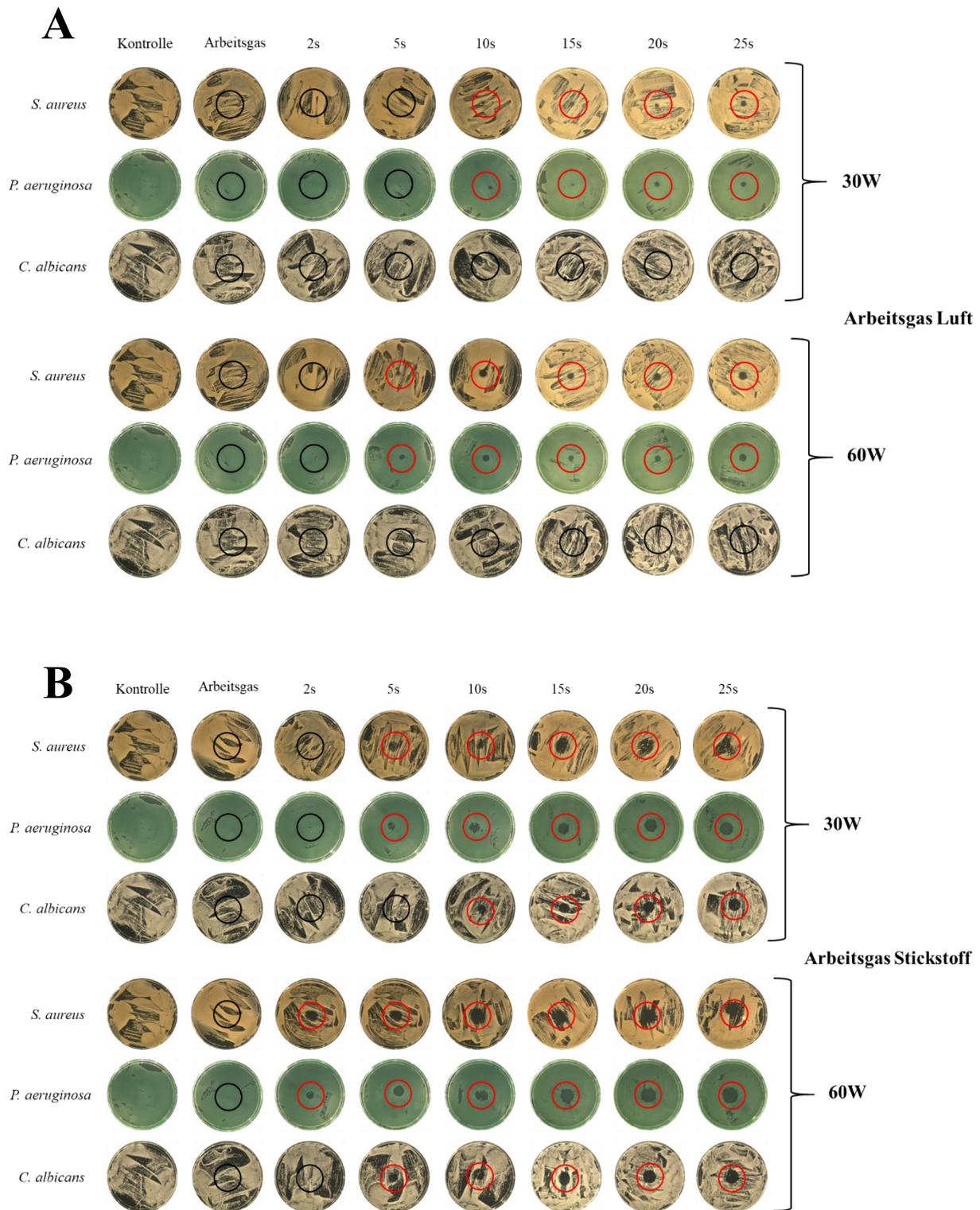


Abbildung 9: Antimikrobielle Wirkung des Plasmajets: verschiedene klinisch relevante Mikroorganismen wurden auf Agarplatten ausplattiert und mit dem Plasma behandelt. Nach 24h Inkubationszeit wurde der entstandene Hemmhof bewertet. Dargestellt sind die Ergebnisse für die Arbeitsgase A) Luft und B) Stickstoff. Die Behandlungsfläche ist mit einem Ring gekennzeichnet: rot=Effekt, schwarz=kein Effekt.

Arbeitsgas	Leistung [W]	Behandlungszeit [s]	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Luft	30	2	-	-	-
		5	-	-	-
		10	-/+	-/+	-
		15	-/+	-/+	-
		20	-/+	+	-
	25	+	+	-	
	60	2	-	-	-
		5	-/+	-/+	-
		10	+	+	-
		15	+	+	-
20		+	+	-	
Stickstoff	30	2	-	-/+	-
		5	+	+	-
		10	+	++	-/+
		15	++	++	++
		20	++	++	++
	25	++	++	++	
	60	2	++	+	-
		5	++	++	+
		10	+++	+++	+
		15	+++	+++	++
20		+++	+++	++	
25	+++	+++	++		

Tabelle 18: Übersicht der antimikrobiellen Wirkung des Plasmajets.

- kein antimikrobieller Effekt

-/+ leichte antimikrobielle Wirkung

+ antimikrobieller Effekt, auf Behandlungsfeld beschränkt, Wachstum von Kolonien möglich

++ deutlicher antimikrobieller Effekt

+++ starker antimikrobieller Effekt, Effekt geht über Behandlungsfeld hinaus kein Wachstum von Kolonien im Behandlungsfeld

4.1.2. Biokompatibilität und Zytotoxizität

4.1.2.1. Viabilitätsuntersuchung mittels 2D-Kultur

Für eine erste Einschätzung der Plasmaverträglichkeit wurde die Untersuchung der Viabilität mittels 2D-Kultur durchgeführt. Dafür wurden die HaCaT-Zellen mit dem Plasmajet behandelt und als Parameter verschiedene Leistungen und Behandlungszeiten sowie unterschiedliche Arbeitsgase gewählt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte 24h nach Behandlung.

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 10 dargestellt. Im Vergleich mit der Kontrolle ist die Viabilität der plasmabehandelten Zellen sehr gering. Eine starke Schädigung erfolgt unabhängig vom eingesetzten Parameter. Ein signifikanter Unterschied besteht zwischen den unterschiedlichen Arbeitsgasen. Luft als Arbeitsgas führt zu einer signifikant geringeren Schädigung verglichen mit Stickstoff.

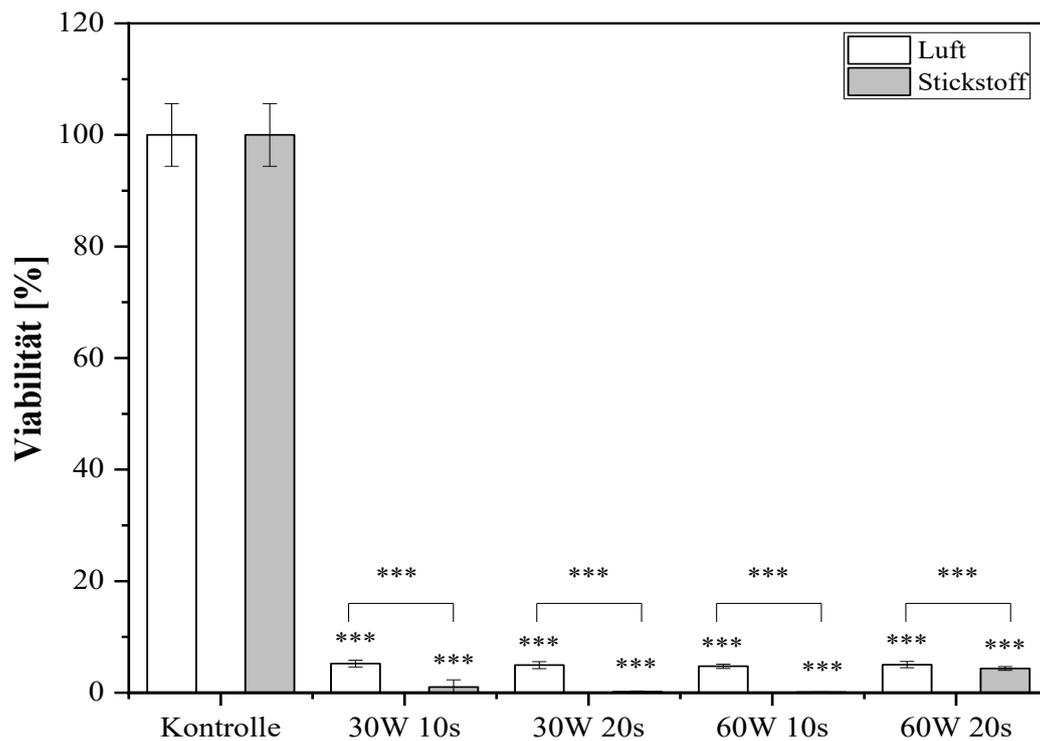


Abbildung 10: Viabilität von Keratinozyten 24h nach Plasmabehandlung. HaCaT-Keratinozyten wurden mit dem Plasmajet behandelt und die Viabilität mittels MTT-Test untersucht. Als Arbeitsgase wurden Luft und Stickstoff verglichen. Die Viabilität [%] ergibt sich aus dem Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich mit der Kontrolle wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.

4.1.2.2. 3D-Versuche am humanen Vollhautmodell

Aufgrund der stark schädigenden Wirkung des Plasmas in 2D-Kultur wurden alle folgenden Untersuchungen auf das 3D-Hautmodell übertragen. Da sich Stickstoff als Arbeitsgas als effektiverer antimikrobieller Parameter erwiesen hatte, wurden die nachfolgenden Versuche auf Stickstoff als Arbeitsgas konzentriert. Für die Darstellung der Biokompatibilität wurden die Behandlungsparameter anhand ihrer Schädigungseigenschaft in verschiedene Kategorien eingeteilt (0-IV). Die Abbildung 11 zeigt die HE-Färbung der histologischen Schnitte der kollagenbasierten Hautmodelle. Die Kategorien I+II unterscheiden sich in der eingesetzten Leistung sowie Behandlungszeit. Dabei ist entweder die Leistung niedrig (Kat. I: 30W 10s) oder die Behandlungszeit kurz (Kat. II: 60W 2s). Beide Parameter zeigen, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kategorie 0), keine morphologischen Auffälligkeiten. Hingegen ist bei Kategorie III, 48h und 72h nach Plasmabehandlung, eine leichte epidermale Schädigung ersichtlich. Eine deutlich massivere Beeinträchtigung ist bei Kategorie IV erkennbar. Diese manifestiert sich bereits 1h nach Plasmabehandlung, dringt bis in tiefe Schichten der Dermis hinein und ist durch eine Dunkelfärbung der Dermis charakterisiert. Durch die Schädigung wird der Zellinhalt nach außen abgegeben und durch die HE-Färbung entsprechend angefärbt.

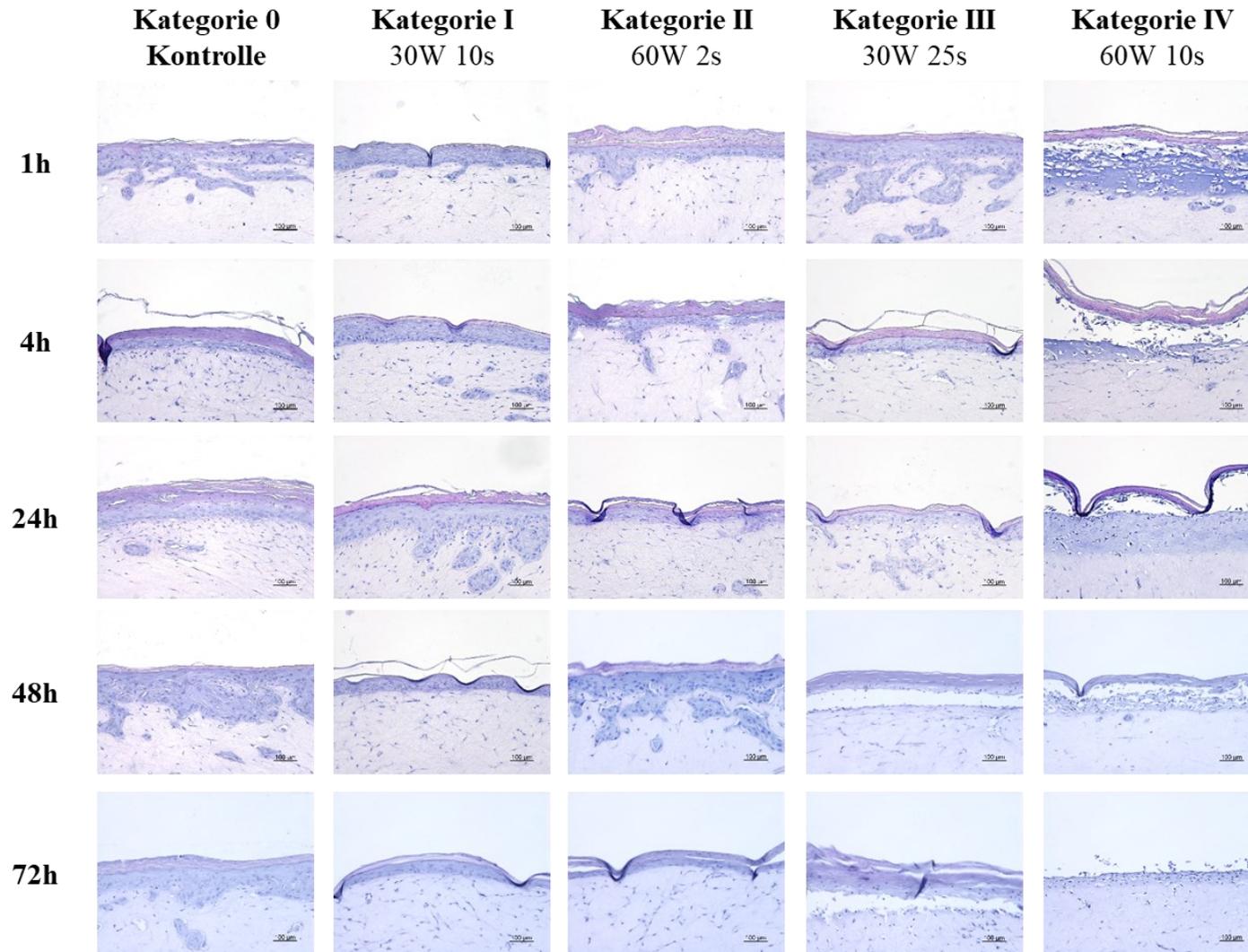


Abbildung 11: Histologische Betrachtung des Plasmaeffektes. 3D-Hautmodelle wurden mit dem Plasmajet behandelt und darauffolgend bis zu 72h beobachtet. Die histologischen Schnitte wurde für die Übersichtsfärbung mittels Hämatoxylin & Eosin gefärbt. Die Einteilung der Kategorien erfolgte anhand des Schädigungsgrades. Die Balkenlänge entspricht 100 µm

Mittels immunhistochemischer Färbung von Ki67 kann das Proliferationsverhalten der Zellen im Hautmodell erfasst werden (Abb. 12). Ki67 ist ein gängiger Proliferationsmarker, welcher sich während der Zellteilung im Zellkern befindet.

Bei histologisch unauffälligen Behandlungsparametern (Kategorie 0-II) lässt sich keine gesteigerte Proliferation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erkennen. Die proliferierenden Zellen befinden sich größtenteils in der Basalmembran der Hautmodelle. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei schädlichen Parametern ein deutlicher Anstieg der Proliferation, welcher mit der Stärke der Schädigung einhergeht. Dieser beschränkt sich auf den dermalen Bereich des Hautmodells. Bereits bei Kategorie III ist ab 48h nach Plasmabehandlung eine gesteigerte Proliferationsaktivität der Fibroblasten erkennbar. Eine leicht stärkere proliferative Wirkung ist bei Kategorie IV festzustellen.

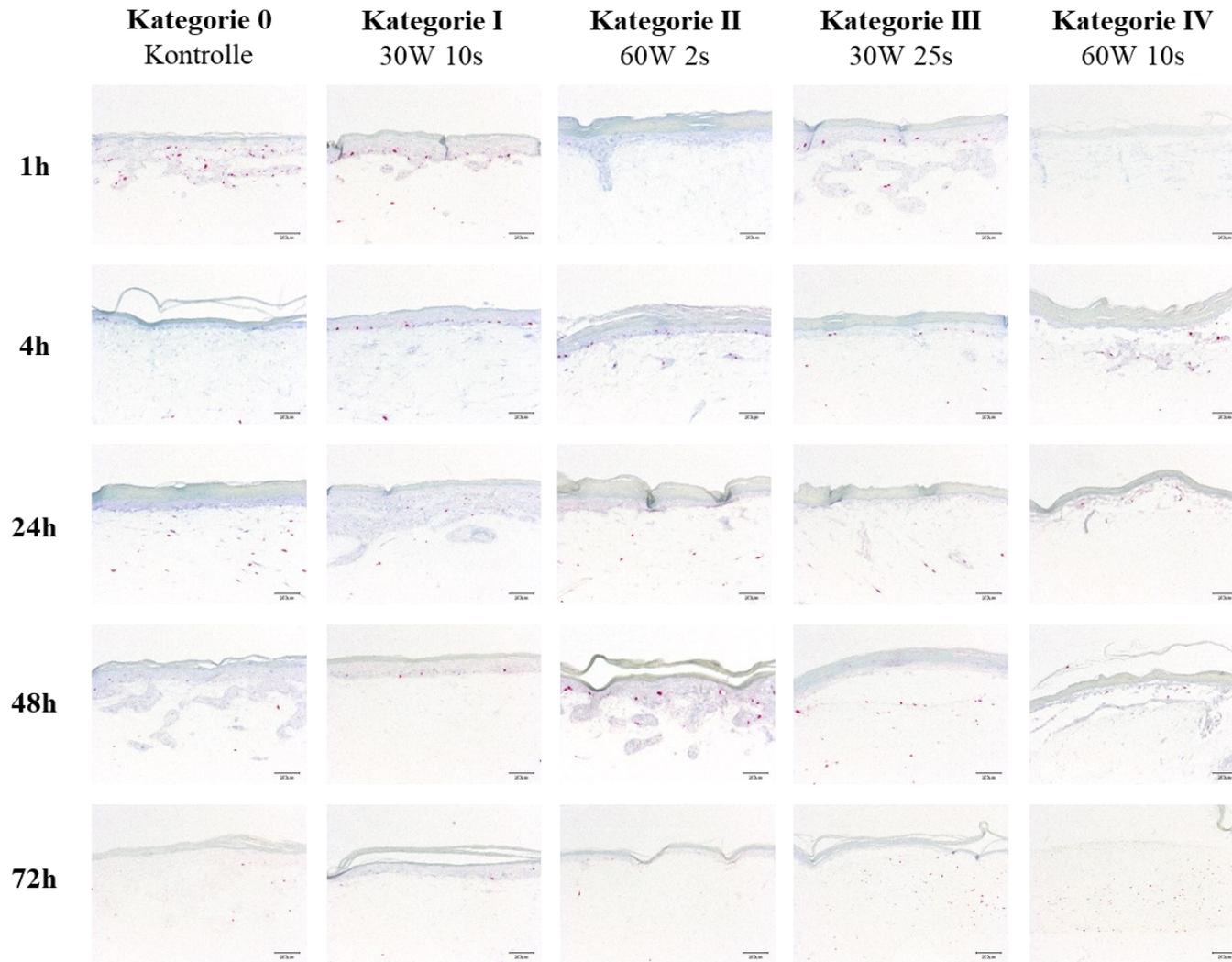


Abbildung 12: Histologische Untersuchung der Proliferation am 3D-Hautmodell. Die Hautmodelle wurden mit dem Plasmajet behandelt und bis zu 72h beobachtet. Die histologischen Schnitte wurden mit einem Antikörper gegen Ki67 immunhistochemisch angefärbt. Proliferierende Zellen sind als rote Punkte dargestellt. Die Balkenlänge entspricht 100 µm

Die Analyse der Zytotoxizität erfolgte mittels eines quantitativen Testes zur Bestimmung des Enzyms Laktatdehydrogenase. Dieses wird in Folge von Membranschädigung aus dem Zytosol in den Überstand der Hautmodelle freigesetzt.

Im Beobachtungszeitraum steigt die LDH-Ausschüttung auch für die unbehandelte Kontrolle stetig an (Abb. 13). Es zeigt sich, dass die LDH-Freisetzung bei den plasmabehandelten Modellen (Kategorien I-IV) bereits 1h nach Behandlung stark signifikant erhöht ist und mit der Zeit die Zytotoxizität weiter ansteigt. Für die höheren Kategorien (III und IV) ist zudem eine gesteigerte LDH-Ausschüttung im Vergleich zu den Kategorien I und II zu beobachten.

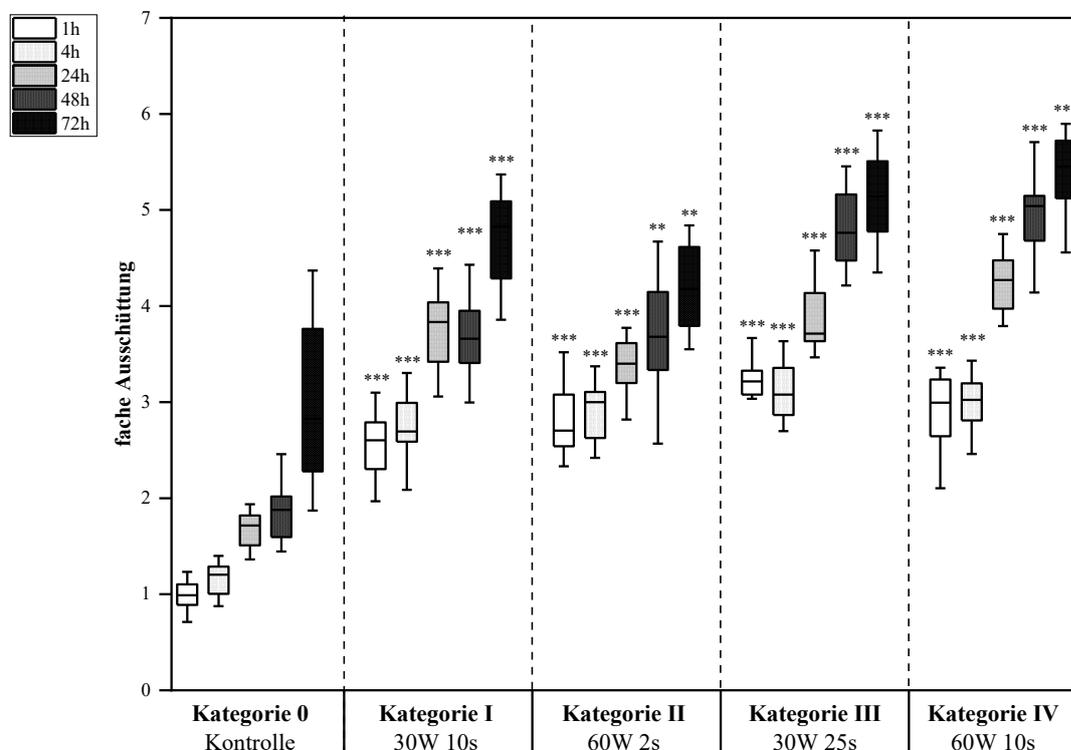


Abbildung 13: Untersuchung der Zytotoxizität nach Plasmabehandlung. Die Hautmodelle wurden mit dem Plasmajet behandelt und der Gehalt an Laktat-Dehydrogenase im Überstand bis 72h nach Behandlung bestimmt. Die fache Ausschüttung ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.

4.1.2.2.1. Genexpressionsanalyse

Die Analyse der Expression wurde mittels quantitativer Realtime PCR (RT-qPCR) durchgeführt. Die Bestimmung der relativen Expression erfolgte mittels $\Delta\Delta\text{CT}$ -Berechnung. Die relative Expression ergibt sich aus dem Vergleich der erhaltenen Werte mit den 1h Wert der unbehandelten Kontrolle.

4.1.2.2.1.1. Analyse pro-inflammatorischer Zytokine

In Abbildung 14 ist die Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine dargestellt. Die Expressionen der Interleukine *IL6* (Abb. 14A) und *IL8* (Abb. 14B) ist im Vergleich zu der Kontrolle signifikant gesteigert. Beide Zytokine weisen nach Plasmabehandlung eine ähnliche Tendenz auf. Dabei zeigt sich, dass die Expressionsstärke unabhängig vom Schädigungsgrad der Hautmodelle ist. Im Gegensatz dazu sind die Expressionsraten von *IL1A* (Abb. 14C) nach Plasmabehandlung kaum beeinflusst. Für *TNF* (Abb. 14D) zeigt sich nach Plasmabehandlung kaum eine Steigerung der Genexpression. Lediglich Kategorie II weist 72h nach Plasmabehandlung eine stark signifikante Expressionssteigerung auf.

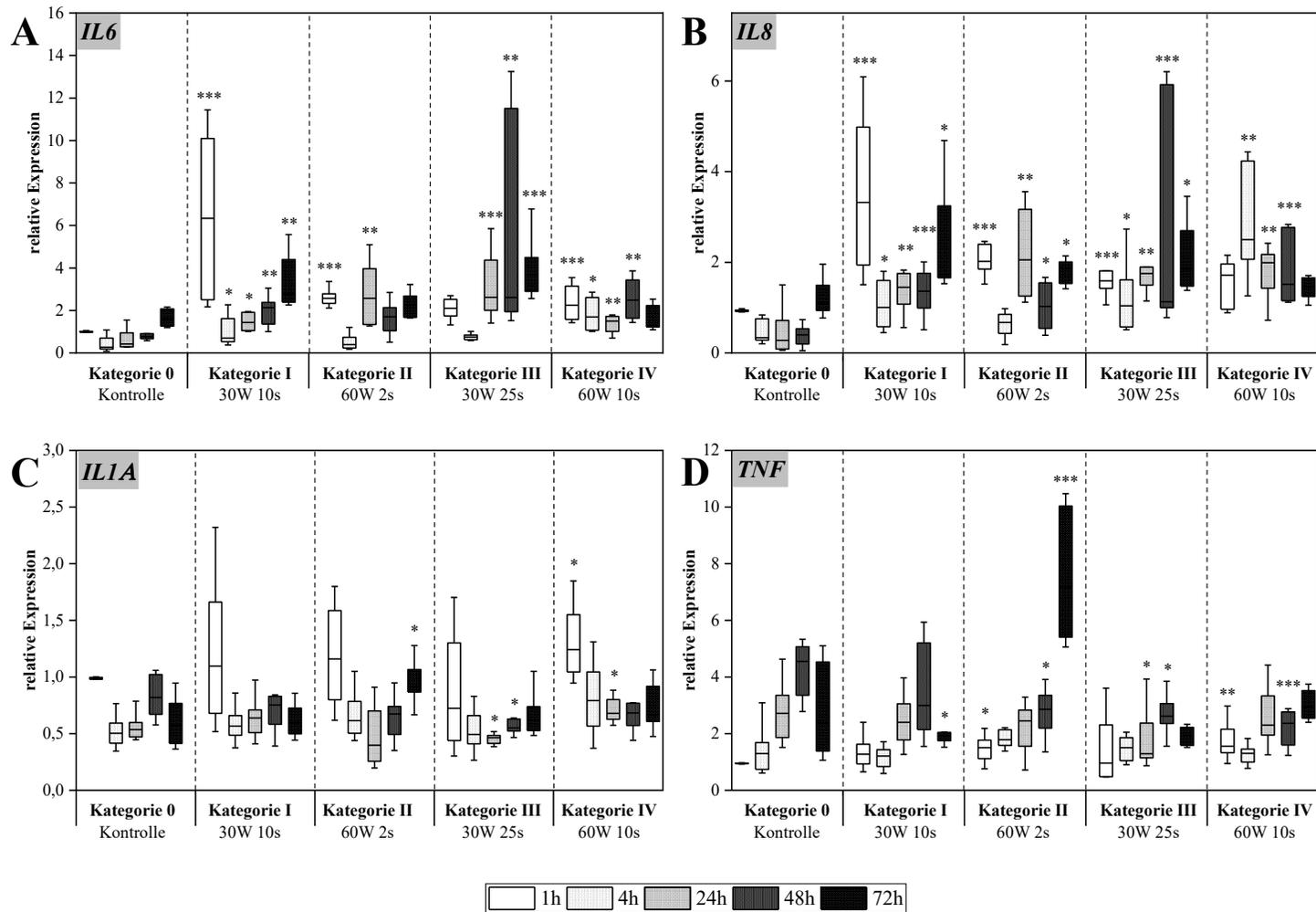


Abbildung 14: Genexpressionsanalyse von Entzündungsmediatoren. Mittels RT-qPCR wurde die relative Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine von plasmabehandelten 3D-Hautmodellen ermittelt. Die relative Expression der Zytokine *IL6* (A), *IL8* (B), *IL1A* (C) sowie *TNF* (D) ergeben sich aus dem Vergleich mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p -Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.

4.1.2.2.1.2. Untersuchung des Regenerationspotentials

Die Analyse des Regenerationspotentials fand mittels verschiedener Marker statt (Abb. 15.). Dabei wurden Gene gewählt, welche charakteristisch für die Gewebsregeneration sind, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren und Proliferationsmarker. Es zeigt sich, dass die Expression von *FGF2* (Abb. 15A) für alle Plasmaparameter signifikant erhöht ist. Für schädliche Plasmaparameter (Kategorie III und IV) ist eine höhere Expression im Vergleich zu verträglichen Parametern (Kategorie I und II) ersichtlich. Im Gegensatz dazu ist die Expression von *FGF7* (Abb. 15B) in allen Fällen nur gering erhöht. Eine leicht signifikante Expressionssteigerung für *KI67* (Abb. 15C) ist ebenfalls für die verträglichen Plasma-Parameter (Kategorie I+II) gegeben. Im Vergleich dazu weisen die schädlichen Plasmaparameter der Kategorien III und IV eine höhere Expression auf. Eine gesteigerte Expression ist bei *TGF* (Abb. 15D) für fast alle Plasmaparameter (Kategorie I bis IV) bereits 1h nach Behandlung ersichtlich. Im späteren zeitlichen Verlauf ergibt sich jedoch keine Änderung zur unbehandelten Kontrolle.

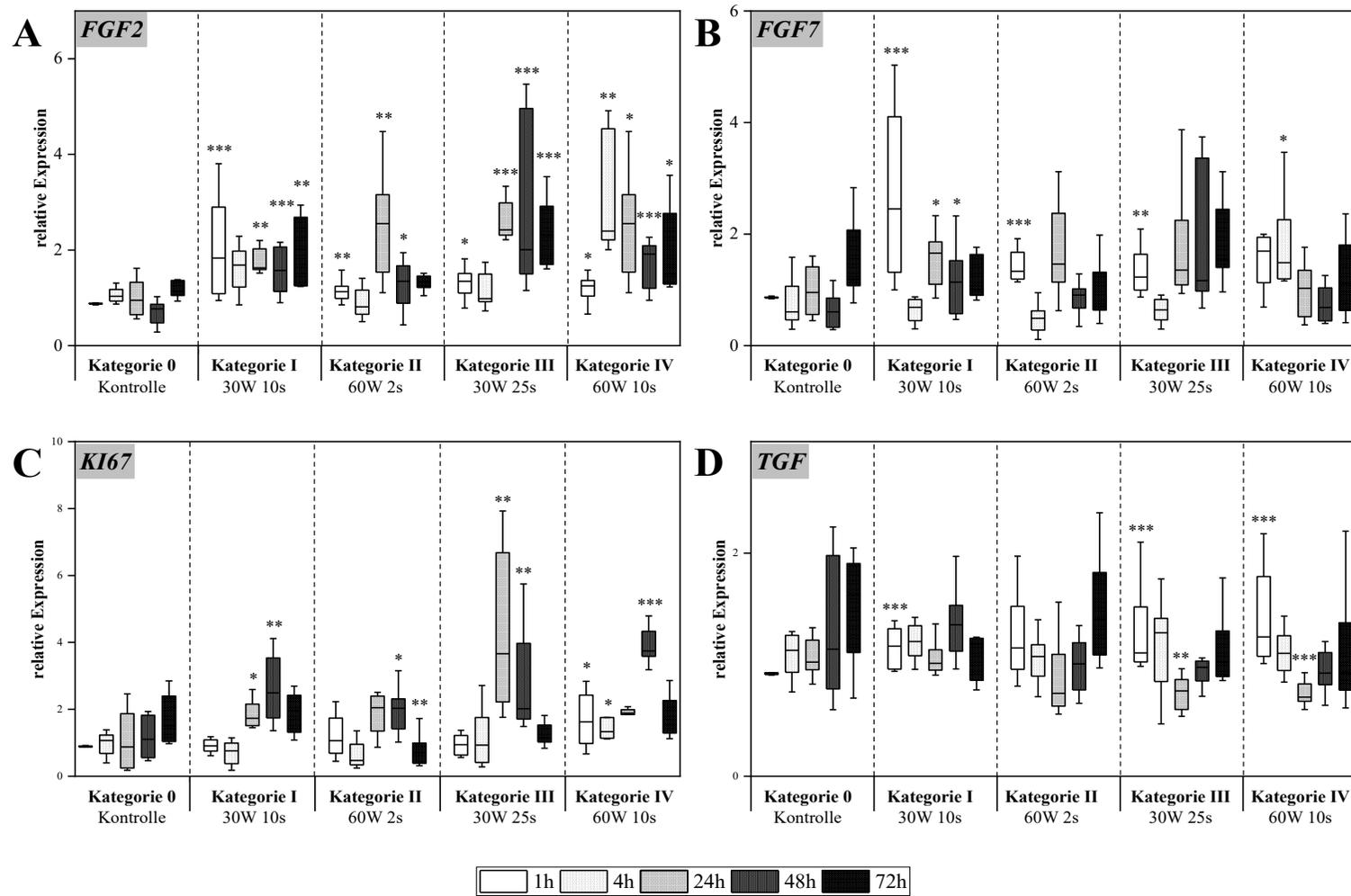


Abbildung 15: Expressionsanalyse des Regenerationspotentials. Die relative Expression der Gene *FGF2* (A), *FGF7* (B), *KI67* (C) und *TGF* (D) wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Die relative Expression ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „****“, für $p \leq 0,01$ „***“ und für $p \leq 0,05$ „**“ stehen.

4.1.2.2.2. Untersuchung der Sekretion

Parallel zur Expression der pro-inflammatorischen Zytokingene von IL-6; IL-8 und IL-1 α wurde die Sekretion dieser Marker im Überstand der Hautmodelle untersucht (Abb. 16).

Im Fall von IL-6 (Abb. 16A) ist bis zu 24h nach Plasma-Behandlung der Hautmodelle lediglich eine leicht signifikante Steigerung der Sekretion ersichtlich. Erst 48h nach Behandlung zeigt sich eine signifikant erhöhte Sekretion des Zytokins, unabhängig vom Behandlungsparameter. Eine vergleichbare Tendenz der Sekretion ist auch bei IL-8 ersichtlich (Abb. 16B). Hier erfolgt eine starke Ausschüttung bereits 24h nach Plasmabehandlung. Auch hier ist die Freisetzung unabhängig vom Behandlungs-Parameter. Für IL-1 α (Abb. 16C) ist eine gesteigerte Sekretion bereits 1h nach Plasmabehandlung zu beobachten (Kategorie I-IV), welche mit der Zeit weiter ansteigt. Die Sekretion von FGF-2 der plasmabehandelten Hautmodelle (Abb. 16D) ist im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bereits 1h nach Behandlung deutlich erhöht. Die Stärke der Sekretion ist auch hier unabhängig von den Plasma-Parametern.

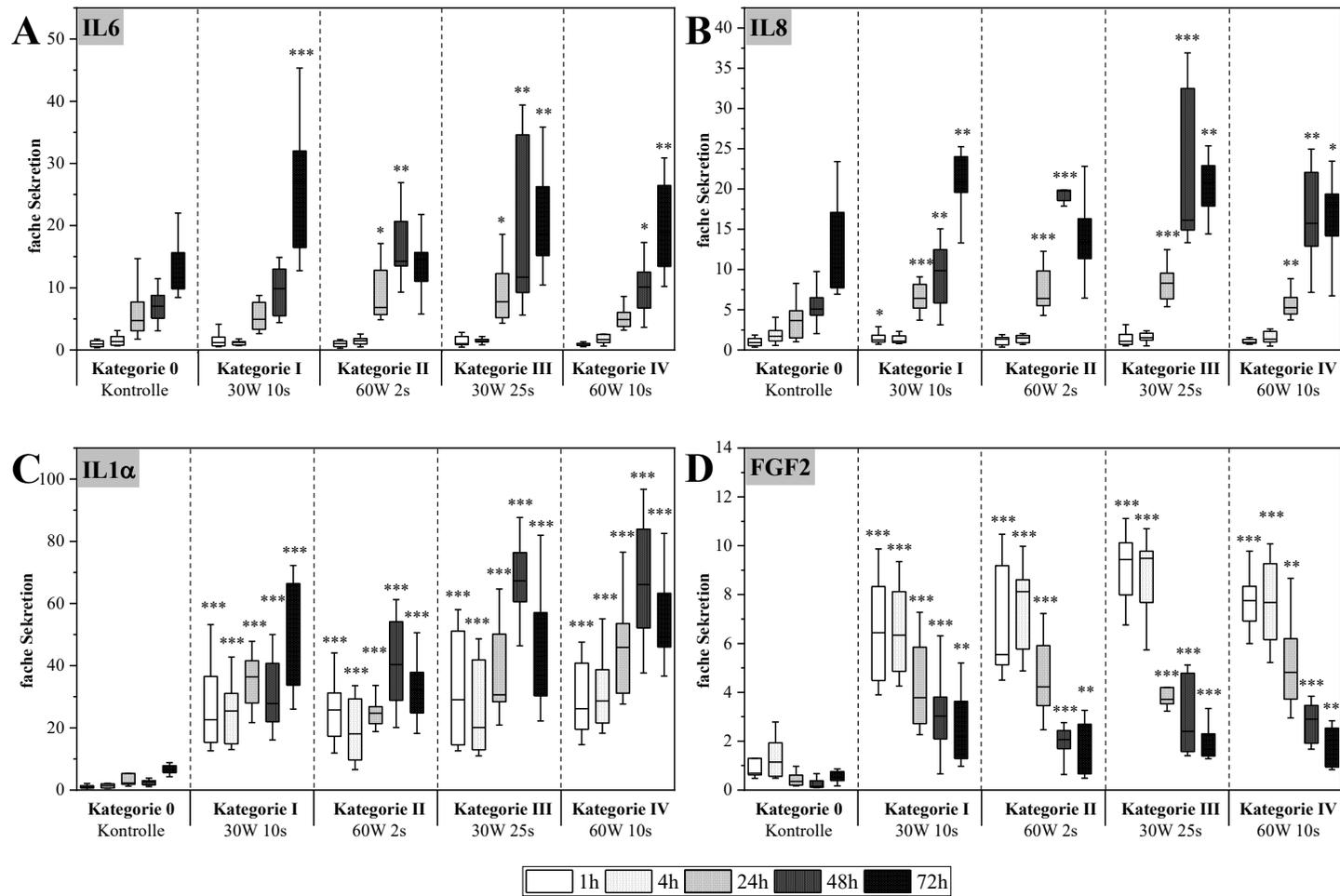


Abbildung 16: Sekretionsanalyse. 3D-Hautmodelle wurden mit Plasma des Plasmajets behandelt und der Überstand nach bestimmten Zeitpunkten entnommen. Die Bestimmung der Freisetzung von IL-6 (A), IL-8 (B), IL-1α (C) sowie FGF-2 (D) aus dem Überstand erfolgte mittels ELISA. Die fache Sekretion ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.

4.2. Einfluss des Arbeitsgases

Diese Versuche wurden durchgeführt, um die Wirkung des Arbeitsgases und dessen Druck zu untersuchen. Dafür wurden die Hautmodelle mit dem Arbeitsgas, ohne Zünden des Plasmas, behandelt. Die Zeitdauer entsprach den vorher untersuchten Behandlungszeiten.

4.2.1. Biokompatibilität und Zytotoxizität

Anhand histologischer Untersuchungen können keine deutlichen Schäden durch die Behandlung mit dem Arbeitsgas festgestellt werden (Abb. 17). Lediglich eine Auflockerung der Hornschicht ist in einigen Fällen ersichtlich.

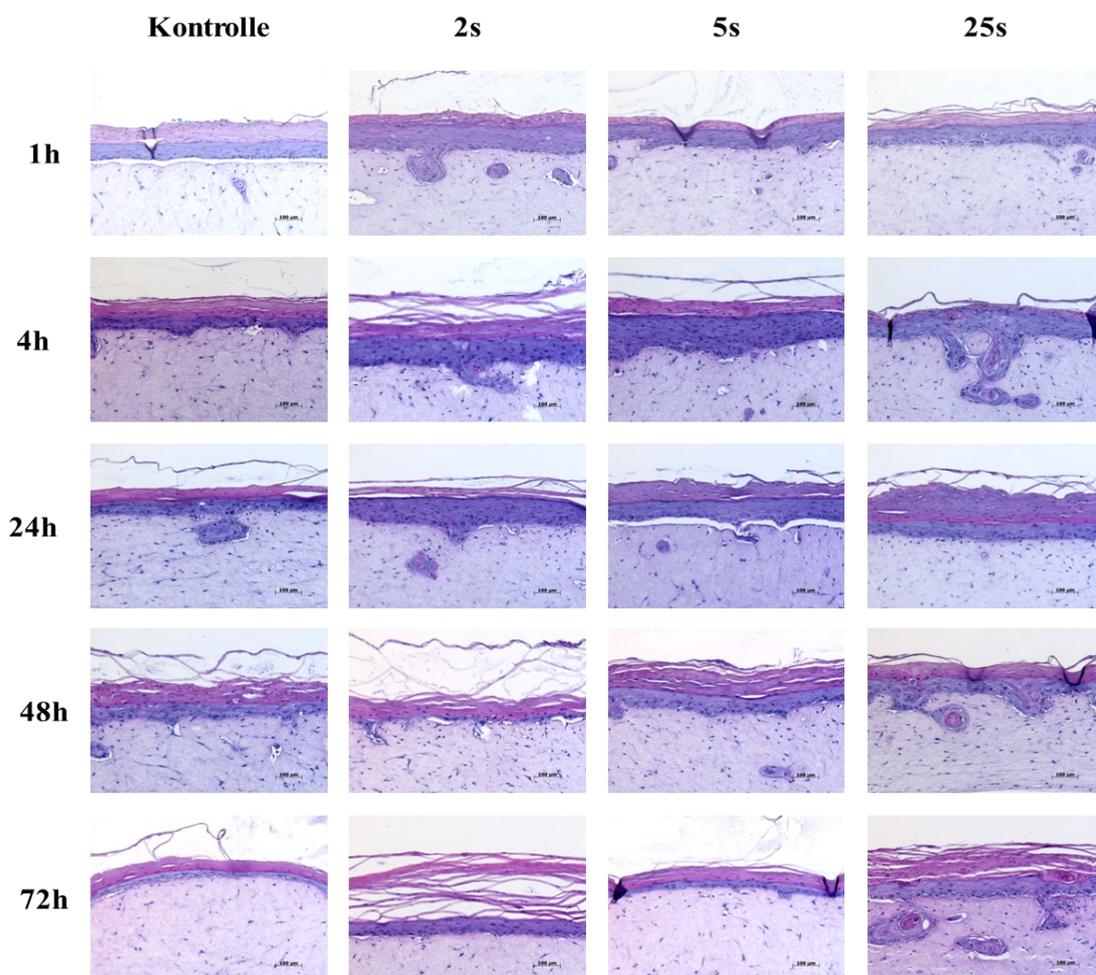


Abbildung 17: Histologische Analyse. Die Hautmodelle wurden mit dem Arbeitsgas behandelt, ohne das Plasma zu zünden um histologische Änderungen zu untersuchen. Für die Übersichtsfärbung wurden die Paraffin-Schnitte mittels Hämatoxylin & Eosin angefärbt. Die Balkenlänge entspricht 100 μm .

Die Behandlung der Hautmodelle mit dem Arbeitsgas, ohne Zünden des Plasmas, hat kein gesteigertes Proliferationsverhalten zur Folge (Abb. 18). Der, durch den Gasstrom entstehende, Druck hat keinen Einfluss auf die proliferative Reaktion des Hautmodells.

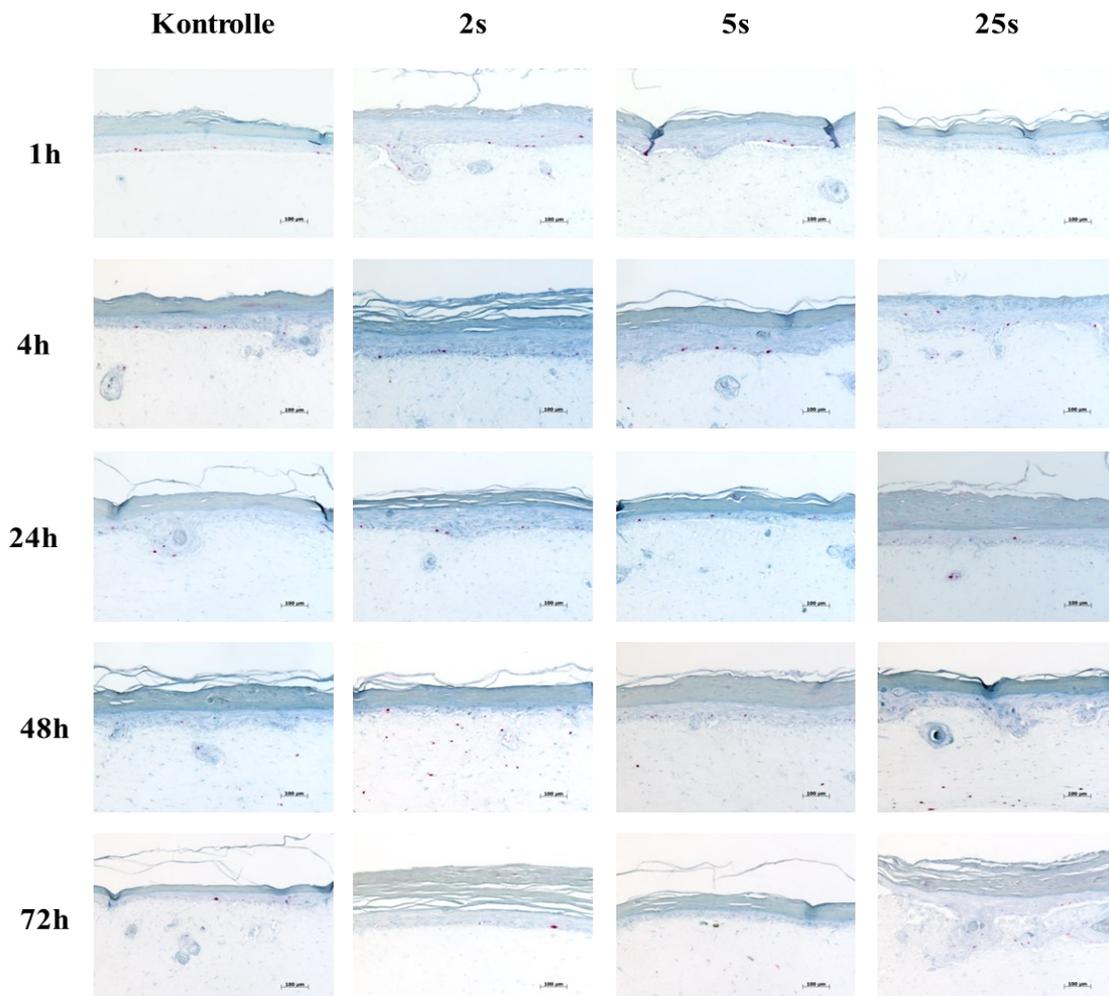


Abbildung 18: Histologische Untersuchung der Proliferation am 3D-Hautmodell. Die Hautmodelle wurden mit dem Arbeitsgas, ohne Zünden des Plasmas, behandelt und bis zu 72h nach Behandlung beobachtet. Die histologischen Schnitte wurden mit einem Antikörper gegen Ki67 immunhistochemisch angefärbt. Proliferierende Zellen sind als rote Punkte dargestellt. Die Balkenlänge entspricht 100 µm

Die Freisetzung von LDH findet bei den behandelten Hautmodellen frühzeitig statt, vergleichbar mit den Ergebnissen der Plasmabehandlung (Abb. 19).

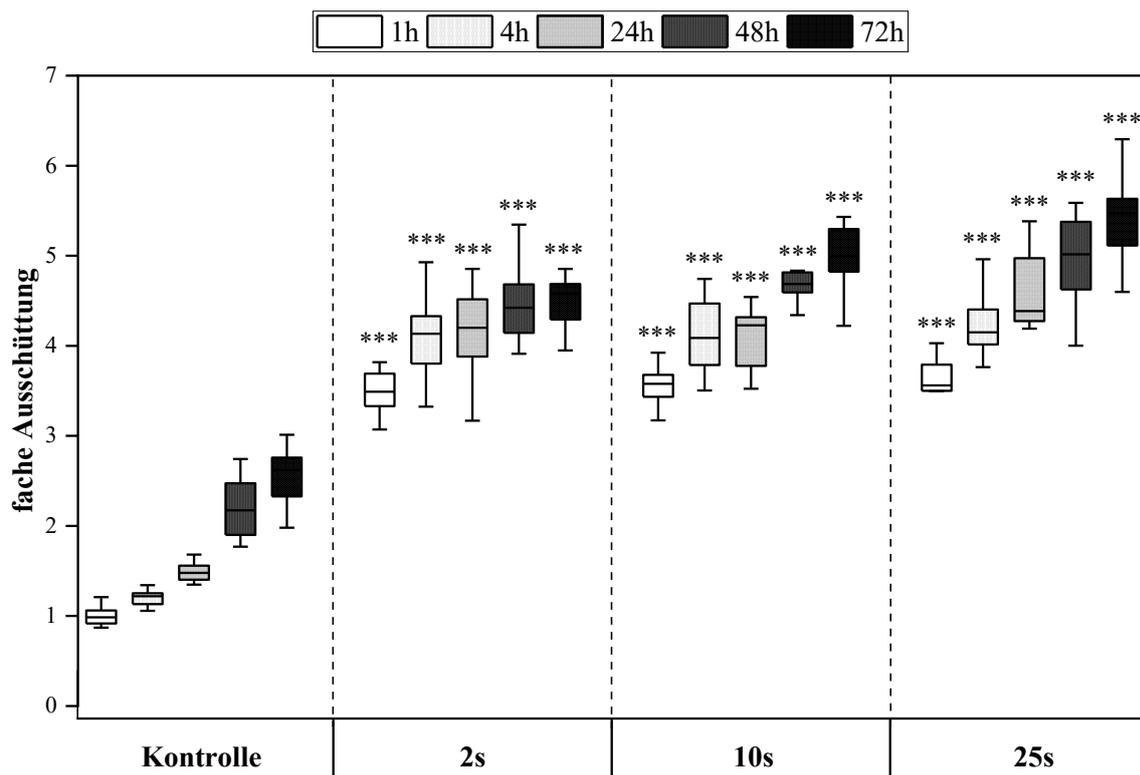


Abbildung 19: Untersuchung der Zytotoxizität. Die Hautmodelle wurden mit dem Arbeitsgas, ohne Zünden des Plasmas, behandelt und der Gehalt an Laktat-Dehydrogenase wurde im Überstand bis 72h nach Behandlung bestimmt. Die fache Ausschüttung ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p -Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.

4.2.2. Genexpressionsanalyse

4.2.2.1. Pro-inflammatorische Zytokine

Im Gegensatz zur Plasmabehandlung wurde bei der Behandlung dem Arbeitsgas allein bereits nach 1h eine gesteigerte Expression von *IL6* beobachtet (Abb. 20A). Zu späteren Zeitpunkten ist die Expression dieses Gens kaum erhöht. Die Expressionsraten von *IL8* (Abb. 20B) zeigen eine signifikante Steigerung bei allen Behandlungszeiten. Vergleichbar mit *IL6* ist auch die Expression von *IL1A* (Abb. 20C) nach der Behandlung frühzeitig erhöht. Die Expression des Gens fällt jedoch bereits 4h nach Behandlung auf ein mit der Kontrolle vergleichbares Niveau ab. Bei *TNF* (Abb. 20D) ist eine Reduktion der Expression 24h nach der Behandlung zu beobachten.

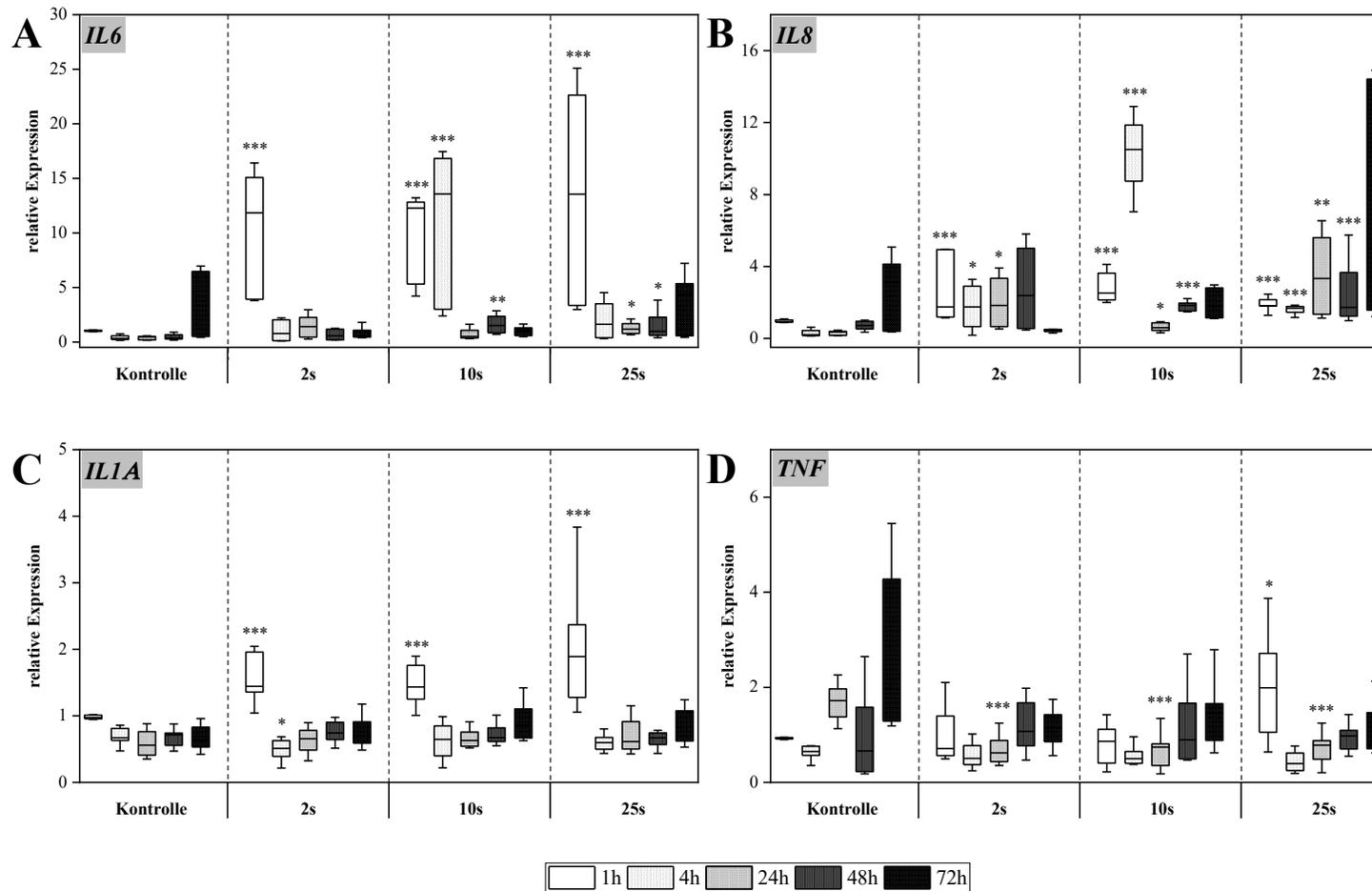


Abbildung 20: Genexpressionsanalyse verschiedener pro-Inflammatorischer Zytokine. Die relative Expression der Zytokine *IL6* (A), *IL8* (B), *IL1A* (C) und *TNF* (D) wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Die relative Expression ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p -Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.

4.2.2.2. Marker des Regenerationspotentials

Die Expression regenerationsrelevanter Gene nach Behandlung mit dem Arbeitsgas ist in Abbildung 21 dargestellt. Im Vergleich zur Plasmabehandlung ist hier kaum eine Steigerung der *FGF2*-Expression (Abb. 21A) ersichtlich. Lediglich bei 10s Behandlungszeit ist nach 4h eine signifikant erhöhte Expression zu beobachten. Auch die Expression von *FGF7* (Abb. 21B) ist nur nach 10s Behandlungszeit signifikant erhöht. Eine Expressionssteigerung von *KI67* (Abb. 21C) ist im Vergleich zur Plasmabehandlung nur in wenigen Fällen zu beobachten. Dies ist lediglich bei 25s Behandlungszeit ersichtlich. Weiterhin ist bei *TGF* (Abb. 21D) keine signifikante Expressionserhöhung ersichtlich.

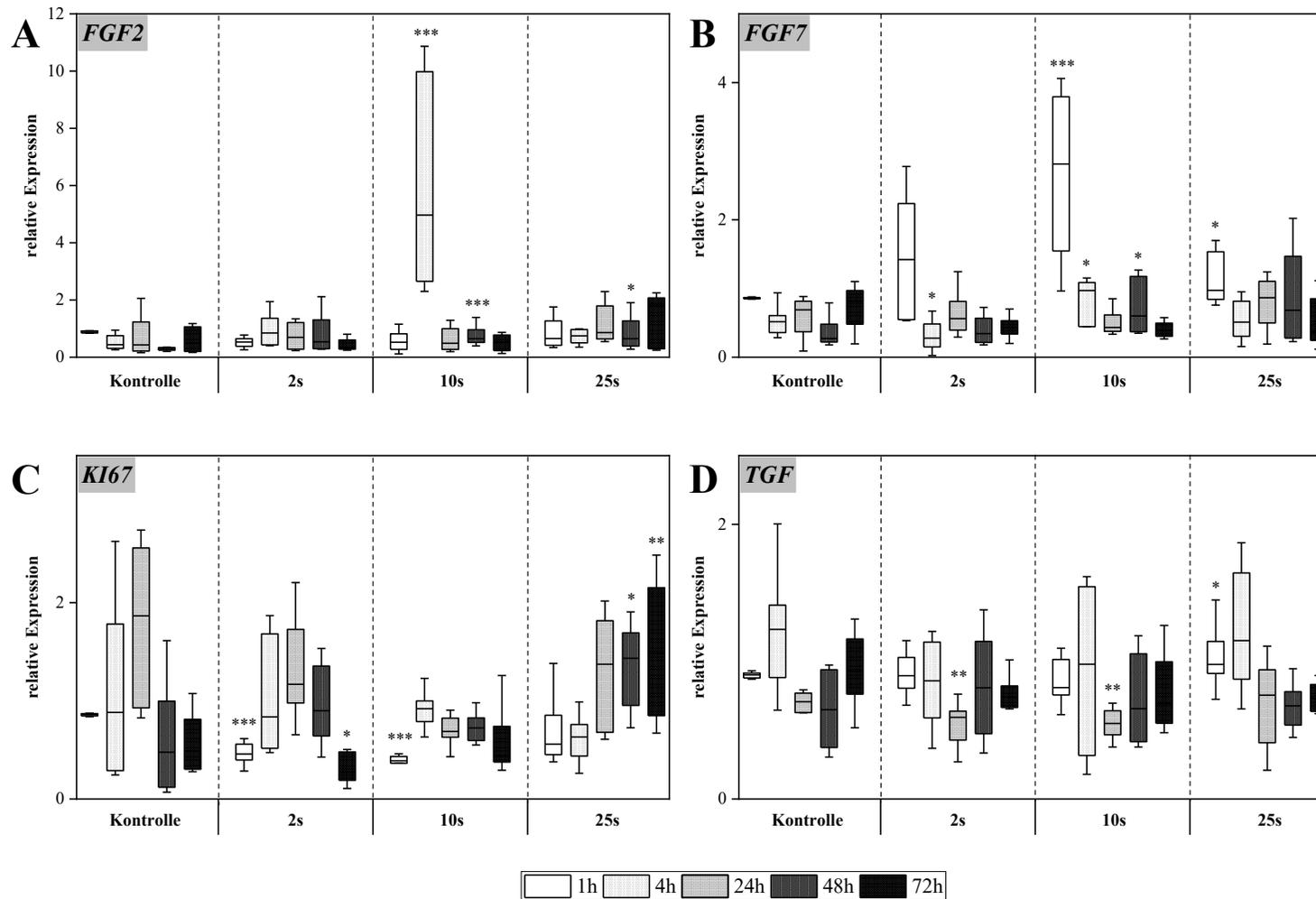


Abbildung 21: Genexpressionsanalyse des Regenerationspotentials. Die Expression der Gene *FGF2* (A), *FGF7* (B), *KI67* (C) sowie *TGF* (D) wurden nach Behandlung mit dem Arbeitsgas mittels RT-qPCR untersucht. Die relative Expression ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „****“, für $p \leq 0,01$ „***“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.

4.2.3 Sekretionsanalyse

Im Überstand der Hautmodelle wurde die Sekretion verschiedener Zytokine nach Behandlung mit dem Arbeitsgas ermittelt (Abb. 22).

Die Sekretion von IL-6 (Abb. 22A) ist nach der Behandlung nicht gesteigert. In einigen Fällen ist hier die Ausschüttung niedriger als bei der unbehandelten Kontrolle. Das Zytokin IL-8 (Abb. 22B) weist bei nahezu allen Parametern eine signifikant erhöhte Sekretion auf. Das Sekretionsmuster ist vergleichbar mit den Ergebnissen der Plasmabehandlung. Bei der Betrachtung der Resultate für die IL-1 α -Sekretion (Abb. 22C) zeigt sich eine stark signifikante erhöhte Ausschüttung, welche bereits 1h nach Behandlung erfolgt. Das Sekretionsmuster weist dabei einen vergleichbaren Verlauf wie bei den plasmabehandelten Hautmodellen auf. Eine stark signifikante gesteigerte Ausschüttung ist auch bei dem Wachstumsfaktor FGF-2 (Abb. 22D) zu beobachten. Das Sekretionsmuster ist mit dem Verlauf der Sekretion der plasmabehandelten Hautmodelle vergleichbar. Die Freisetzung von IL-1 α sowie FGF-2 ist dabei unabhängig von der Behandlungsdauer.

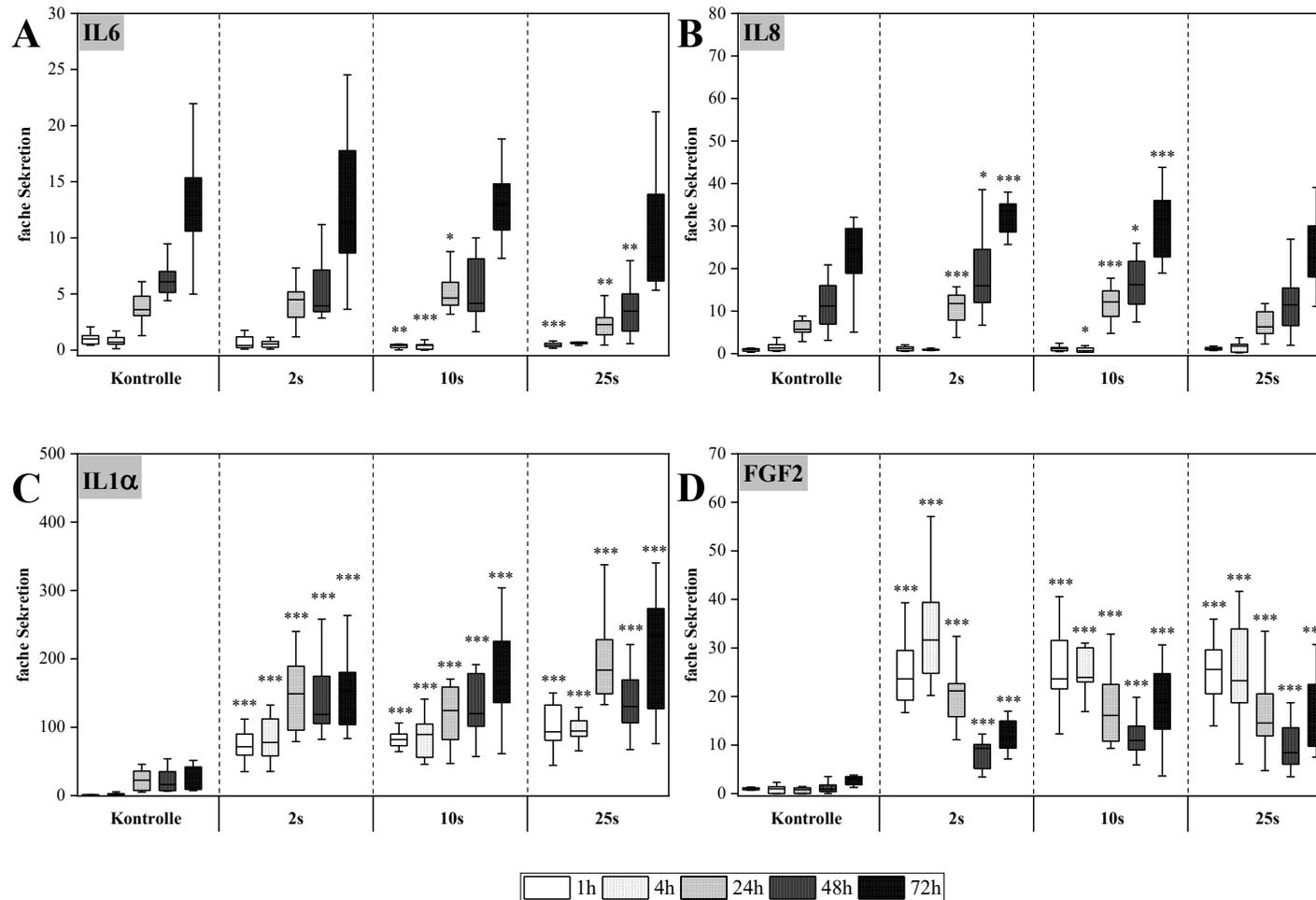


Abbildung 22: Untersuchung der Sekretion. Nach der Behandlung der Hautmodelle mit dem Arbeitsgas, ohne zünden des Plasmas, wurde der Überstand nach bestimmten Zeitpunkten entnommen. Die Bestimmung der Freisetzung von IL-6 (A), IL-8 (B), IL-1 α (C) sowie FGF-2 (D) erfolgte mittels ELISA. Die fache Sekretion ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „****“, für $p \leq 0,01$ „***“ und für $p \leq 0,05$ „**“ stehen.

4.3. Untersuchungen zur DBD-Plasmaquelle

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur DBD-Quelle wurden teilweise wie folgt vorab publiziert:

- Workshop Plasmamedizin des ak-adp; Therapeutischer Einsatz von physikalischen Plasmen und plasmabehandelten Medien; 11.-12.09.2019 in Erfurt.
- Workshop Plasmamedizin des ak-adp; Physikalische Plasmen und plasmabehandelte Medien für die klinische Praxis; 22.-23.09.2021 in Magdeburg.
- Thementage Grenz- und Oberflächentechnik Zeulenroda 2022

4.3.1. Antimikrobielle Wirkung

4.3.1.1. Agar-Test

Die antimikrobielle Wirkung der DBD-Plasmaquelle gegen klinisch relevante Mikroorganismen wurde mittels Agar-Test durchgeführt. Vergleichbar mit den Versuchen des Plasmajets erfolgte auch hier die Auswertung anhand des entstandenen Hemmhofes. Aufgrund der technischen Eigenschaften des Gerätes fand keine Variation der eingesetzten Leistung statt. Weiterhin konnte bei diesem Prototyp das verwendete Arbeitsgas nicht variiert werden. Das Gerät nutzt zur Plasmaerzeugung die Umgebungsluft.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 19 und Abb. 23 zusammengefasst. Gegen die untersuchten Bakterien weist das Plasma bereits nach wenigen Sekunden eine gute antimikrobielle Wirkung auf. Ein leichter Unterschied in der antimikrobiellen Wirkung zwischen den Bakterienspezies ist ersichtlich. Gegen die Hefe *C. albicans* zeigt sich ein deutlich schwächerer antimikrobieller Effekt. Generell ist die antimikrobielle Wirkung abhängig von der eingesetzten Behandlungszeit.

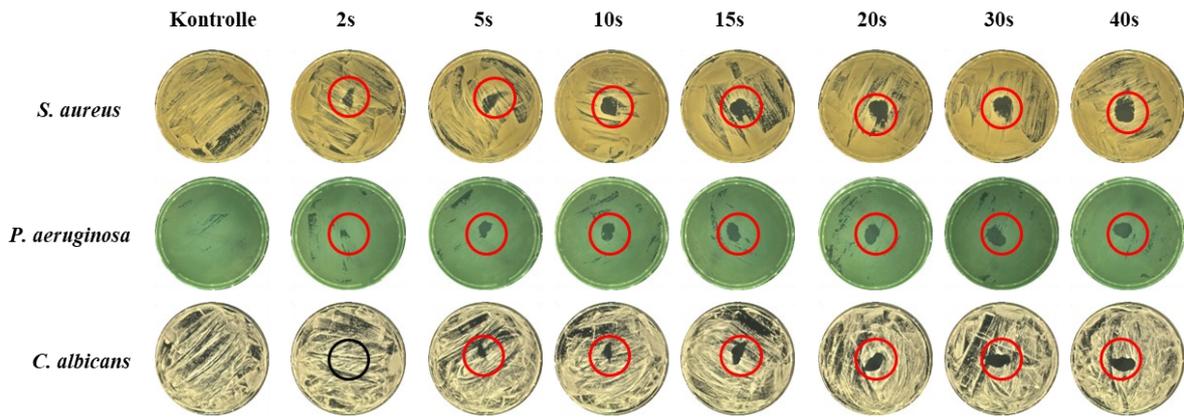


Abbildung 23: Antimikrobielle Wirkung der DBD-Quelle. Verschiedene klinisch relevante Mikroorganismen wurden auf Agarplatten ausplattiert und mit Plasma behandelt. Nach 24h Inkubationszeit wurde der entstandene Hemmhof bewertet. Die Behandlungsfläche ist mit einem Ring gekennzeichnet: rot=Effekt, schwarz=kein Effekt.

Behandlungszeit [s]	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
2	-/+	-/+	-
5	+	+	-/+
10	+	+	+
15	++	+	+
20	++	+	++
30	++	++	++
40	++	++	++

Tabelle 19: Zusammenfassung der antimikrobiellen Wirkung der DBD-Quelle:

- kein antimikrobieller Effekt

-/+ leichte antimikrobielle Wirkung

+ antimikrobieller Effekt, auf Behandlungsfeld beschränkt, Wachstum von Kolonien möglich

++ deutlicher antimikrobieller Effekt

+++ starker antimikrobieller Effekt, Effekt geht über Behandlungsfeld hinaus kein Wachstum von Kolonien im Behandlungsfeld

4.3.1.2. Antimikrobieller Effekt gegen Biofilme

Die Wirkung der DBD-Plasmaquelle auf verschiedene Biofilmbildner ist in Abb. 24 dargestellt. Die Behandlungszeit betrug dabei bis zu 120s. Die Viabilität der Mikroorganismen im Biofilm wurde mittels CelltiterBlue[®]-Assay ermittelt sowie die Biomasse anhand von Kristallviolett-Färbung bestimmt.

Plasma-Behandlung des *S. aureus*-Biofilm (Abb. 24A) hat nur einen geringen Einfluss auf die Viabilität der Mikroorganismen. Diese unterschreitet bei keiner Behandlungszeit den Wert von 80%. Mittels Kristallviolett wurde zusätzlich die Biomasse des Biofilms bestimmt, um ein Ablösen der Mikroorganismen aufgrund der Plasmabehandlung auszuschließen (Abb. 25). Diese zeigt bei *S. aureus* (Abb. 25A) keine signifikante Abnahme nach der Behandlung. Die Viabilität von *C. albicans* (Abb. 24B) konnte durch die Plasmabehandlung nicht reduziert werden und auch die Biomasse blieb unverändert (Abb. 25B). Im Gegensatz dazu führt die Plasmabehandlung bei *P. aeruginosa* (Abb. 24C) zu einem starken Viabilitätsverlust. Ein signifikanter antimikrobieller Effekt ist bereits nach 10s Behandlungszeit ersichtlich. Die Reduktion der Biomasse (Abb. 25C) erweist sich dabei aber als vergleichsweise gering. Die Biofilme von *E. coli* (Abb. 24D) und *A. baumannii* (Abb. 24E) weisen eine vergleichbare Reaktion auf. Der Einfluss der Plasmabehandlung auf die Viabilität ist gering und unterschreitet die 80%-Grenze nicht. Auch ein Verlust der Biofilmmatrix ist in beiden Fällen nicht ersichtlich (Abb. 25 D+E).

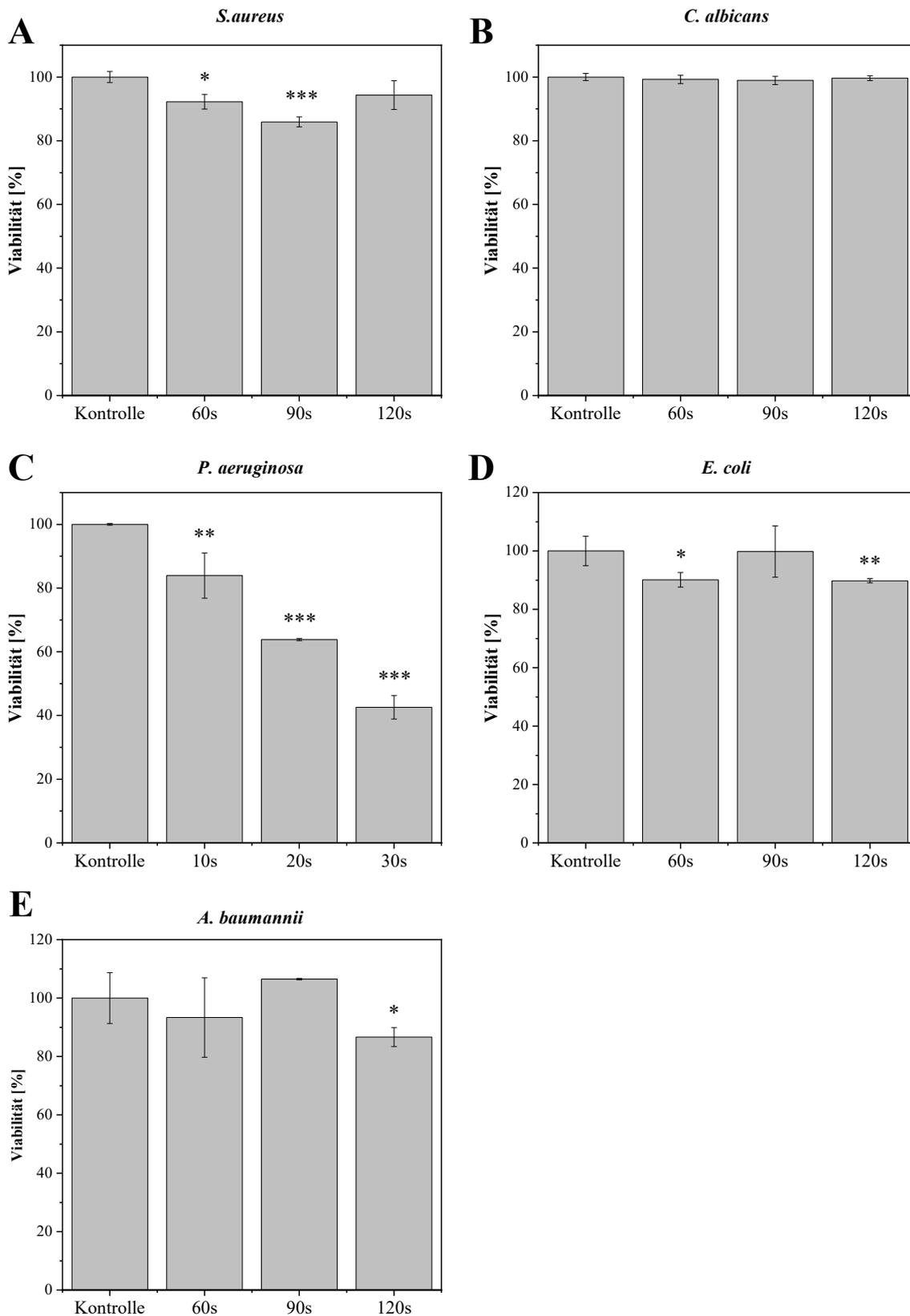


Abbildung 24: Plasmabehandlung von Biofilmen -Viabilität-. Die Viabilität verschiedener Biofilmbildner wurde mittels CelltiterBlue®-Assay ermittelt. Die prozentuale Viabilität ergibt sich aus dem Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit der behandelten Probe wobei für p -Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.

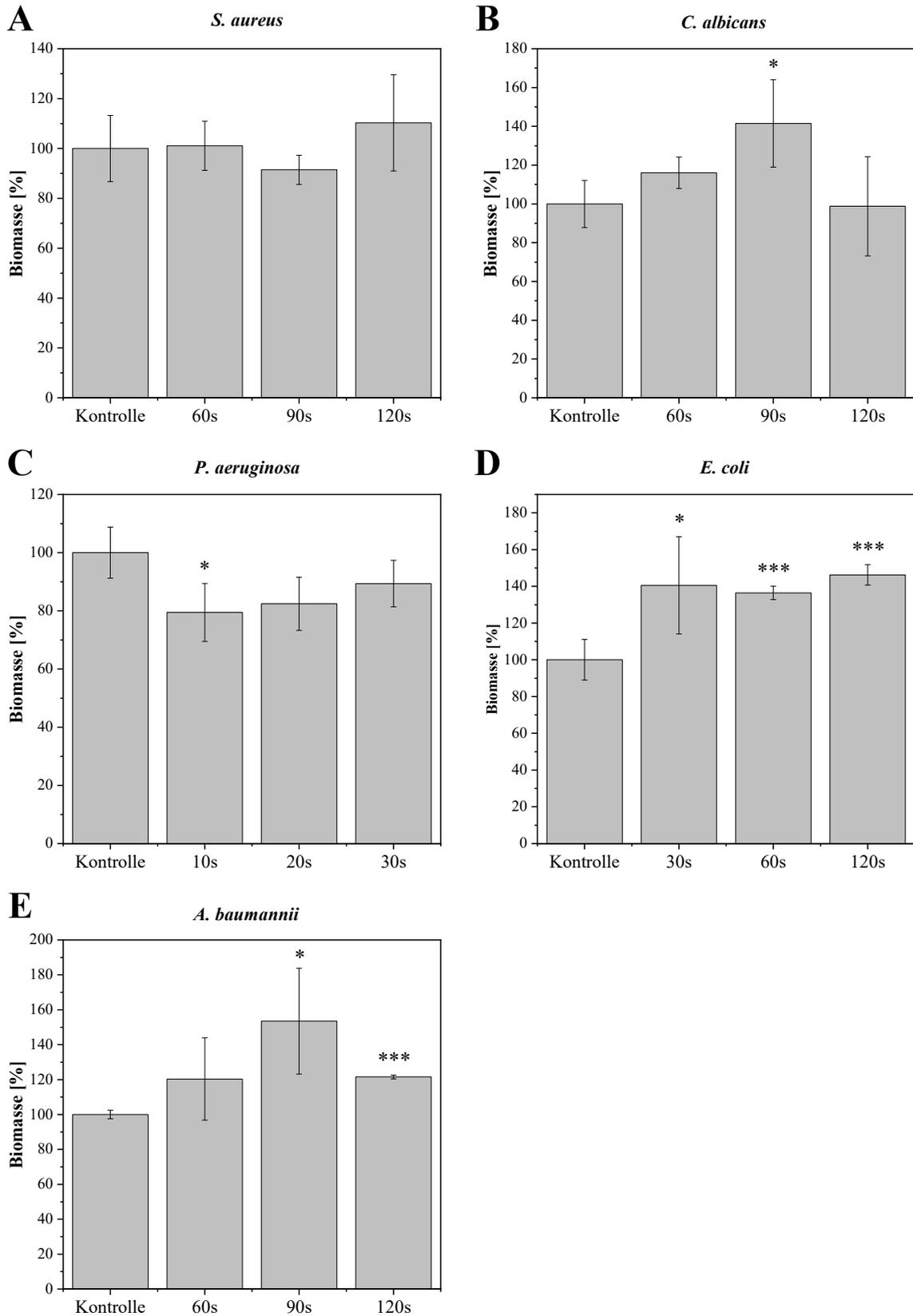


Abbildung 25: Plasmabehandlung von Biofilmen -Biomasse-. Um die Ablösung des Biofilms nach Plasmabehandlung auszuschließen, wurde dieser mittels Kristallviolett angefärbt. Die prozentuale Biomasse ergibt sich aus dem Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit der behandelten Probe wobei für p -Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.

4.3.2. Biokompatibilität und Zytotoxizität

4.3.2.1. Untersuchung der Viabilität mittels 2D-Kultur

Für eine erste Einschätzung der Plasmawirkung der DBD-Quelle wurde die Viabilität an 2D-Kultur durchgeführt. Dafür wurden die HaCaT-Keratinocyten mit der Plasmaquelle behandelt und verschiedene Behandlungszeiten gewählt. Die Bestimmung der Viabilität erfolgte 24h nach Plasma-Behandlung mittels MTT-Tests.

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 26 dargestellt. Die Viabilität der Zellen ist dabei stark abhängig von der Behandlungsdauer. Bereits bei einer Behandlungszeit von 5s sinkt die Viabilität unter 60% im Vergleich zur Kontrolle.

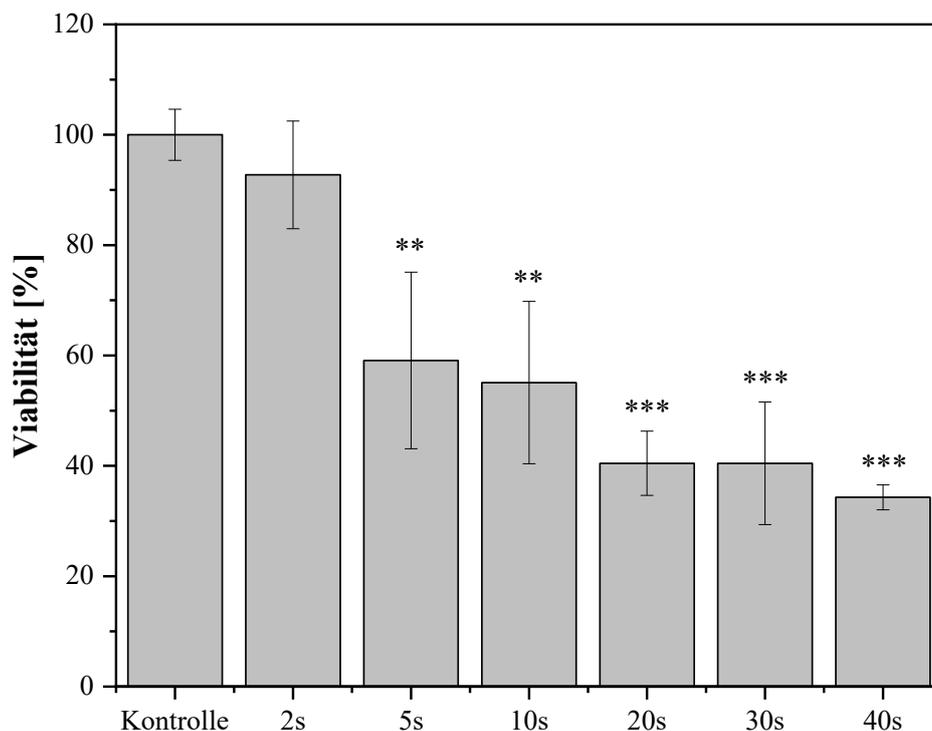


Abbildung 26: Viabilität von Keratinocyten nach Plasmabehandlung. HaCaT-Keratinocyten wurden mit der DBD-Plasmaquelle bis zu 40s behandelt und die Viabilität nach 24h untersucht. Die Viabilität [%] ergibt sich aus dem Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich mit der Kontrolle wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „****“, für $p \leq 0,01$ „***“ und für $p \leq 0,05$ „**“ stehen.

4.3.2.2. 3D-Versuche mittels humanen Vollhautmodellen

Aufgrund der Ergebnisse der 2D-Versuche wurden alle künftigen Versuche auf das humane 3D-Hautmodell übertragen.

Mittels HE-Färbung wurden die, mit der DBD-Quelle behandelten, Hautmodelle auf morphologische Veränderungen untersucht (Abb. 27). Dabei wurde die Reaktion der Modelle bis zu 72h nach Behandlung beobachtet. Vergleichbar mit der unbehandelten Kontrolle weisen die plasmabehandelten Hautmodelle keine Schäden oder morphologische Veränderungen auf.

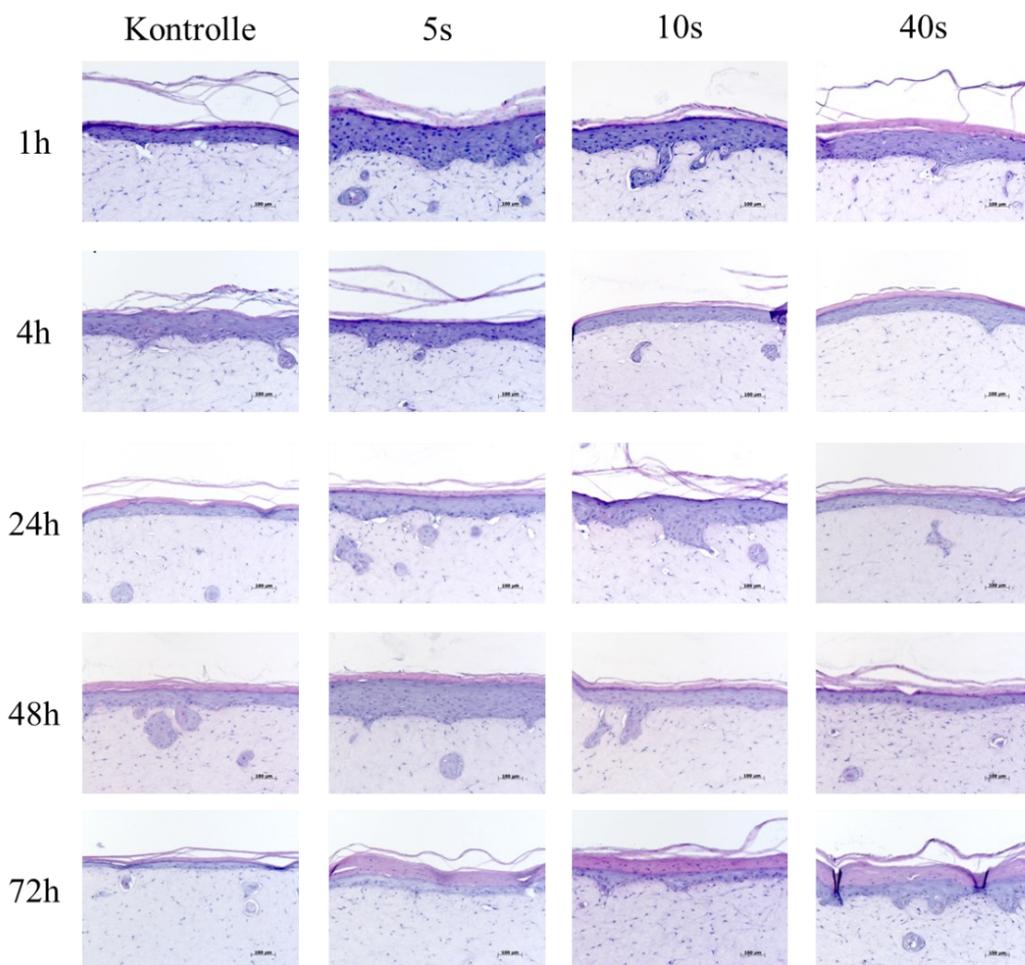


Abbildung 27: Histologische Analyse nach Plasma-Behandlung mittels DBD-Quelle. Zu bestimmten Zeitpunkten nach Plasmabehandlung wurden Proben entnommen und histologisch analysiert. Die Übersichtsfärbung der Paraffinschnitte erfolgte mittels Hämatoxylin & Eosin. Die Balkenlänge entspricht 100 μm.

Die Zytotoxizität nach Behandlung mit der DBD-Quelle wurde zusätzlich anhand der LDH-Ausschüttung der Zellen im Überstand untersucht (Abb. 28). Die Freisetzung des Schädigungsmarkers ist für geringe Behandlungszeiten kaum erhöht. Mit steigender Behandlungsdauer findet eine zunehmende LDH-Ausschüttung statt.

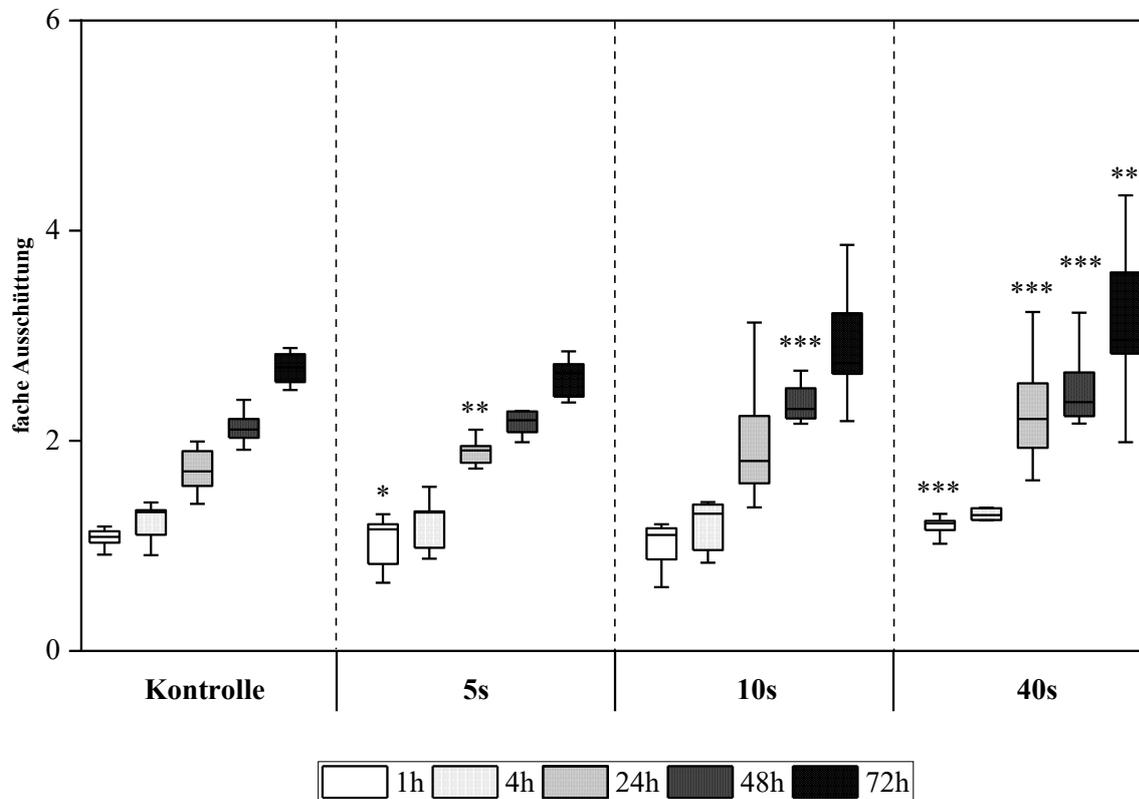


Abbildung 28: Analyse der Zytotoxizität nach Plasmabehandlung mit der DBD-Quelle. Der Gehalt an Laktat-Dehydrogenase wurde im Überstand bestimmt. Die fache Ausschüttung ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.

Mittels immunhistochemischer Färbung von Ki67 sollte das Proliferationsverhalten der Zellen im Hautmodell nach Plasmabehandlung untersucht werden (Abb. 29).

Im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle weisen die plasmabehandelten Hautmodelle keine gesteigerte Zellproliferation auf.

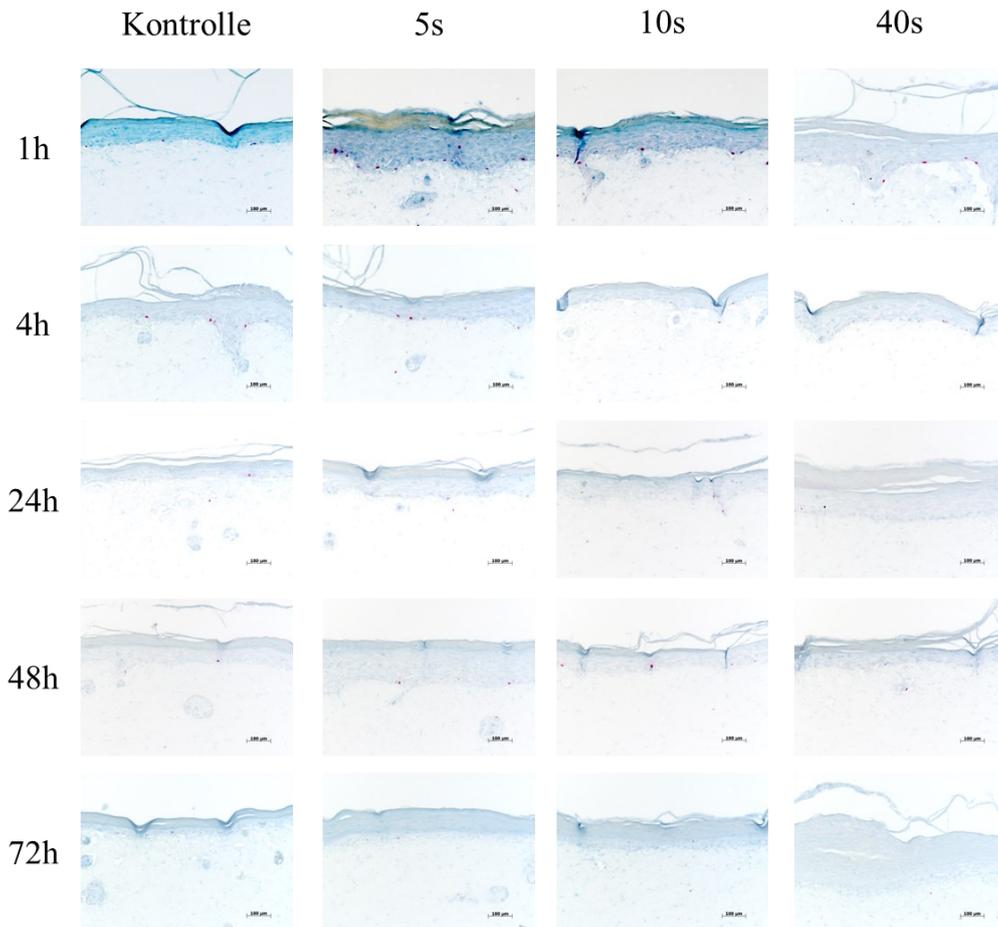


Abbildung 29: Histologische Untersuchung der Proliferation am 3D-Hautmodell nach Behandlung mit der DBD-Quelle. Die histologischen Schnitte wurden mit einem Antikörper gegen Ki67 immunhistochemisch angefärbt. Proliferierende Zellen sind als rote Punkte dargestellt. Die Balkenlänge entspricht 100 µm

4.3.2.2.1. Genexpressionsanalyse

4.3.2.2.1.1. Expressionsanalyse pro-inflammatorischer Zytokine

Mittels RT-qPCR sollte die Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine untersucht werden (Abb. 30). Da IL-23 bei den zukünftigen Untersuchungen der Infektion von Hautmodellen eine Rolle spielt, wurde dieses Zytokin zusätzlich untersucht. Für *IL6* (Abb. 30A) eine geringe Expression nach Plasmabehandlung ersichtlich. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ist 72h nach Behandlung ein Rückgang der Expression zu beobachten. Auch die Genexpression von *IL8* (Abb. 30B) und *IL1A* (Abb. 30C) wird durch die Plasmabehandlung kaum beeinflusst. Eine Verringerung der Genexpression ist für *TNF* (Abb. 30D) sowie *IL23* (Abb. 30E) nachweisbar.

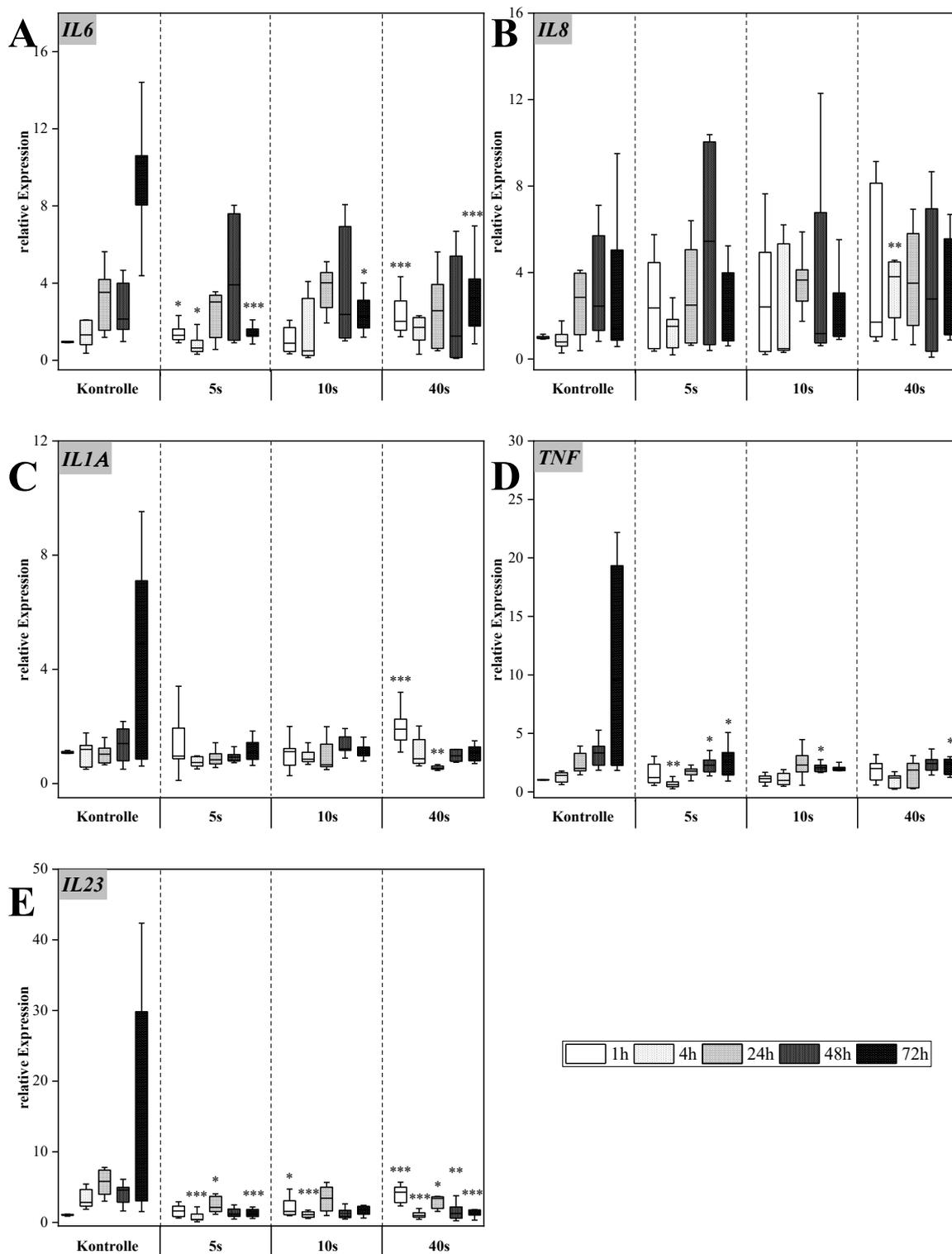


Abbildung 30: Analyse der Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine. Die relative Expression der Zytokine *IL6* (A), *IL8* (B), *IL1A* (C), *TNF* (D) und *IL23* (E) wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Die relative Expression ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p -Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.

4.3.2.2.1.2. Expression von Markern des Regenerationspotentials

Um die Reaktion unterschiedlicher Regenerationsmarker nach Plasmabehandlung am Hautmodell zu untersuchen, wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt (Abb. 31).

Bei *FGF2* (Abb. 31A) wurde eine signifikante Steigerung der Genexpression unter allen getesteten Plasmaparametern bereits 1h nach Behandlung beobachtet. Dagegen zeigt sich 72h nach Plasmabehandlung eine signifikante Reduktion der Expression des Gens im Vergleich zu der Kontrolle. Dieser Effekt ist auch bei der Genexpression von *FGF7* (Abb. 31B) zu beobachten. Eine Verminderung der Genexpression tritt auch bei anderen Markern wie *KI67* (Abb. 31C) und *TGF* (Abb. 31D) auf. Während die Expression von *KI67* nur wenig beeinflusst ist, zeigt sich bei *TGF* eine deutliche Reduktion der Expression 72h nach Plasmabehandlung.

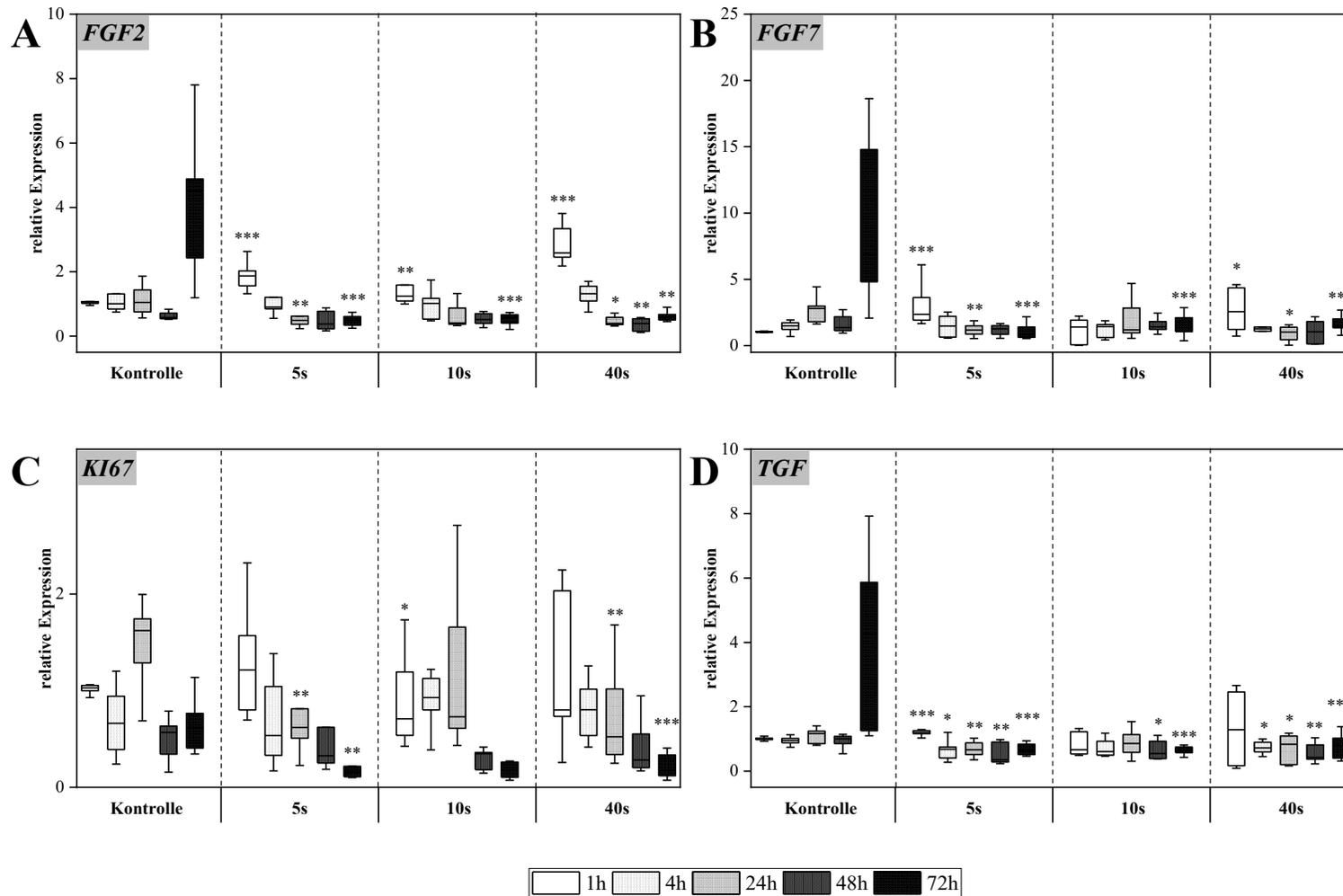


Abbildung 31: Expressionsanalyse verschiedener Marker des Regenerationspotentials. Die Expression der Gene *FGF2* (A), *FGF7* (B), *KI67* (C) sowie *TGF* (D) wurden nach Plasmabehandlung mittels RT-qPCR untersucht. Die relative Expression ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.

4.3.2.2.1.3. Genexpression antimikrobieller Peptide

Antimikrobielle Peptide haben für die folgende Untersuchung von infizierten Hautmodellen eine Bedeutung und wurden daher zusätzlich analysiert.

Wie aus Abb. 32 zu entnehmen ist, führt eine Kurzzeitbehandlung von 5s Plasma verglichen mit der Kontrolle zu einer signifikanten Reduktion der *HBD2*-Expression (Abb. 32A). Im Gegensatz dazu zeigt eine 40s Plasmabehandlung zunächst eine gesteigerte Expression nach 1h und 4h, jedoch eine Verringerung nach 72h. Für die Gene von *SI00A7* (Abb. 32B) sowie *RNASE7* (Abb. 32C) findet nach Plasmabehandlung für alle Plasmaparameter eine Reduktion der Genexpression statt.

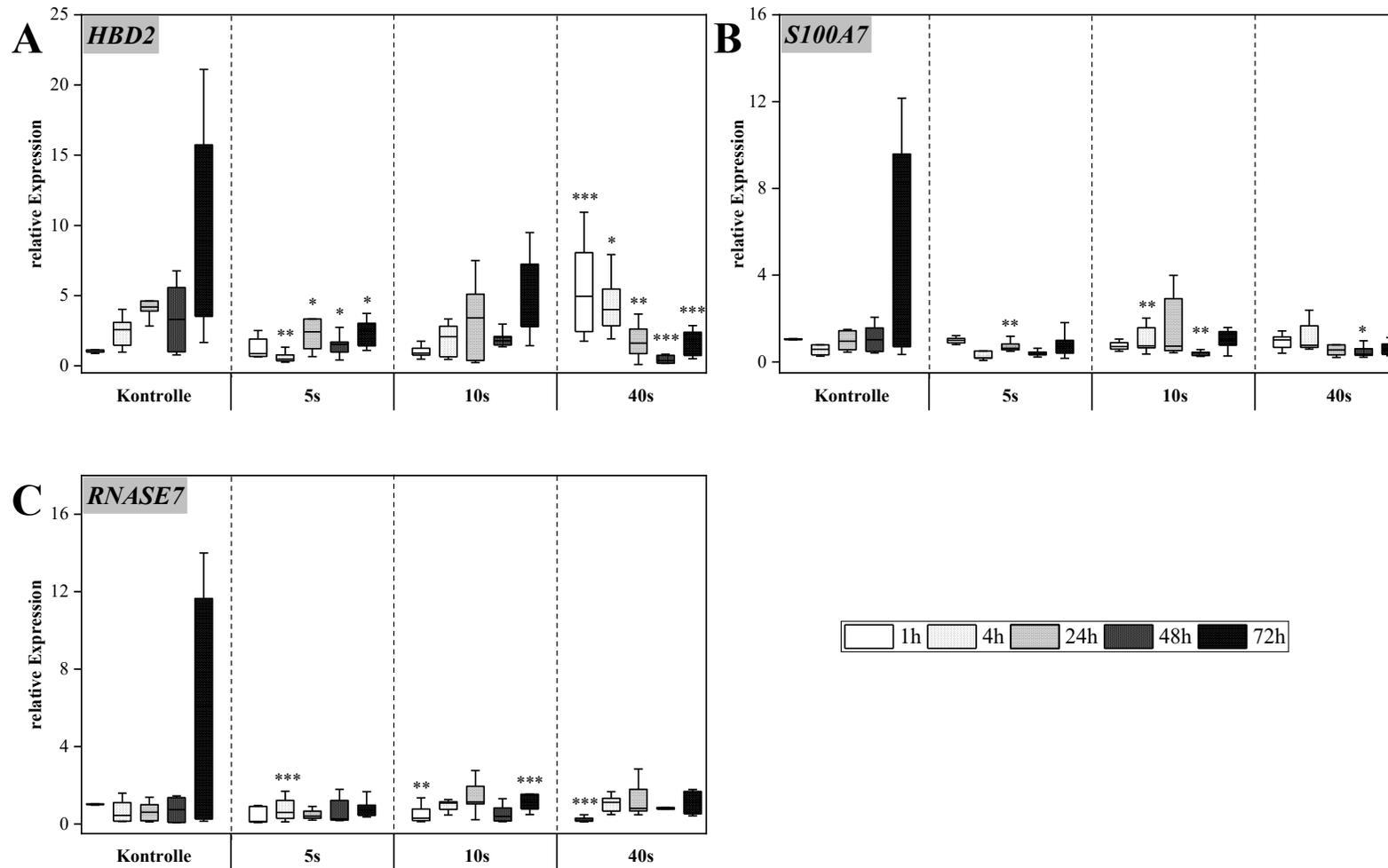


Abbildung 32: Expression antimikrobieller Peptide. Nach Plasmabehandlung erfolgte die Analyse der antimikrobiellen Peptide *HBD2* (A), *S100A7* (B) sowie *RNASE7* (C). Die relative Expression ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.

4.3.2.2.2. Sekretionsanalyse

Anhand der Überstände der Hautmodelle erfolgte die Sekretionsanalyse verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine sowie FGF-2.

Abb. 33 zeigt, dass lediglich für IL-6 (Abb. 33A) bei hoher Behandlungszeit eine signifikante Steigerung der Sekretion ersichtlich ist. Eine vergleichbare Reaktion ist auch für IL-8 (Abb. 33B) zu beobachten. Dagegen weist die IL-1 α -Sekretion (Abb. 33C) eine leicht signifikante Steigerung für alle plasmabehandelten Hautmodelle auf. Die Sekretion des Wachstumsfaktors FGF-2 (Abb. 33D) wird durch die Plasmabehandlung kaum beeinflusst.

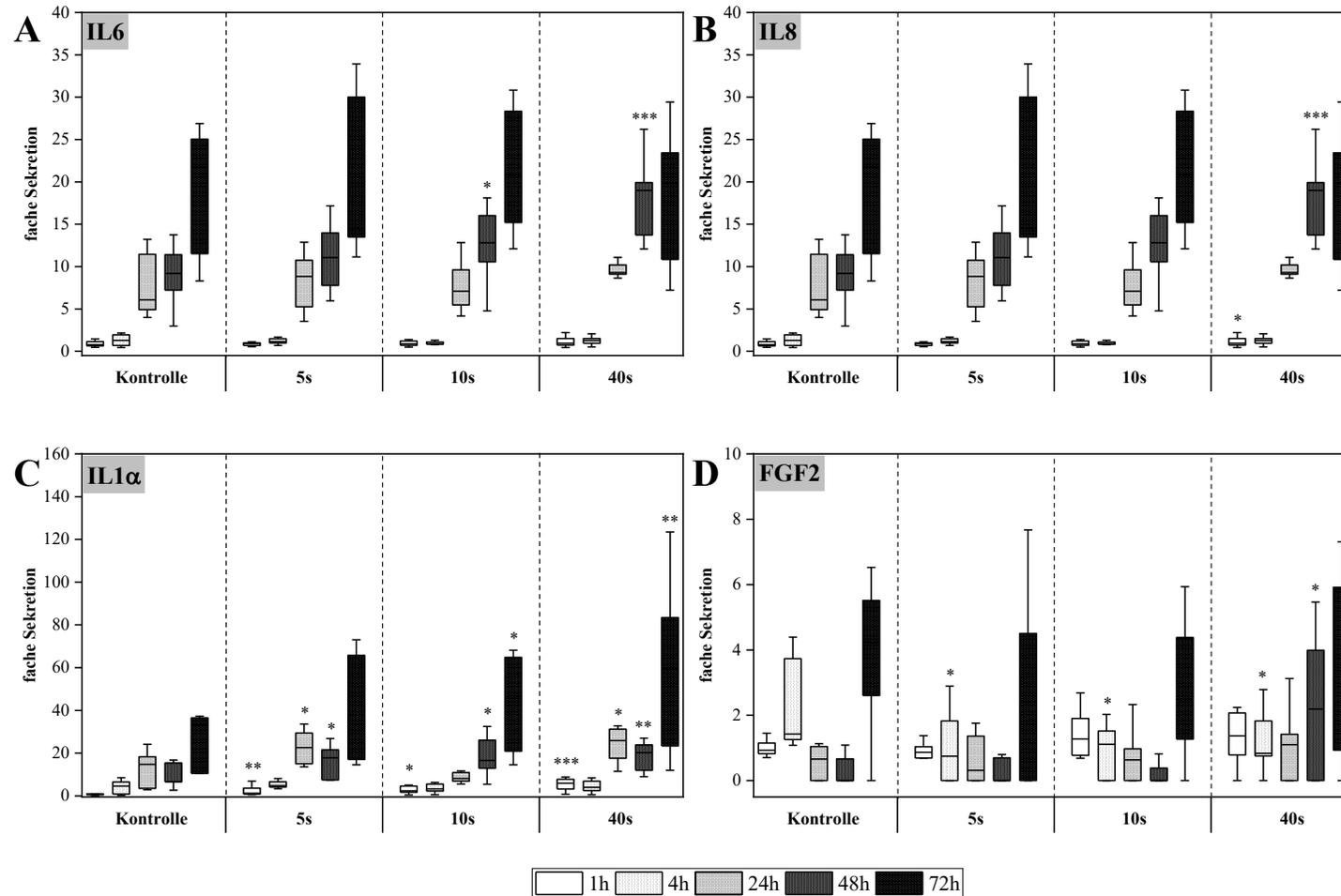


Abbildung 33: Sekretionsanalyse. Nach der Behandlung der Hautmodelle mit Plasma der DBD-Quelle wurde der Überstand nach bestimmten Zeitpunkten entnommen. Die Bestimmung der Freisetzung von IL-6 (A), IL-8 (B), IL-1α (C) sowie FGF-2 (D) aus dem Überstand erfolgte mittels ELISA. Die fache Sekretion ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p -Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.

4.4. Wirkung von Plasma am 3D-Modell für kutane Candidose

Für diese Untersuchungen wurden FDM-basierte Hautmodelle verwendet. Bei dieser Form der 3D-Hautmodelle werden die Fibroblasten dazu stimuliert, selbstständig Matrixbestandteile zu produzieren. Daher ist hier die Dermis weniger stark ausgeprägt im Vergleich zur Epidermis. Aufgrund der technischen Einschränkungen wurden die Versuche ausschließlich mit der DBD-Plasmaquelle durchgeführt.

4.4.1. Analyse der Autofluoreszenz

Anhand der Autofluoreszenz von *C. albicans* kann dessen Infektion auf Hautmodellen durch das Moleculight i:X™ sichtbar gemacht werden (Abb. 34). Das Hautmodell besitzt dabei eine grüne Eigenfluoreszenz, *C. albicans* dagegen wird rötlich-orange dargestellt. Innerhalb des ersten Tages nach der Infektion ist noch keine Veränderungen der Fluoreszenz auf den Hautmodellen ersichtlich, die Infektionslast ist noch gering. Erst 48h nach Infektion zeigt sich bei der Infektionskontrolle eine orange-rötliche Fluoreszenz auf den Hautmodellen. Bei einer Plasmabehandlungszeit von 5s ist diese Fluoreszenz ebenfalls noch nachweisbar. Ab einer Behandlungszeit von 10s nimmt die rötliche Fluoreszenz deutlich ab und ist bei 40s nicht mehr nachweisbar.

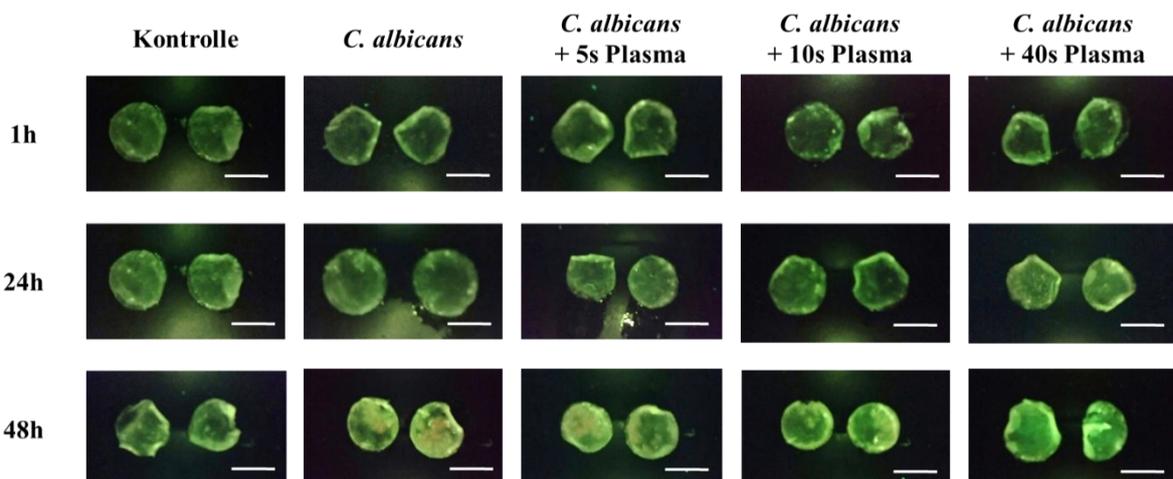


Abbildung 34: Analyse der Autofluoreszenz. Nach Infektion der 3D-Hautmodelle und Plasmabehandlung wurde *C. albicans* mittels Autofluoreszenz sichtbar gemacht. Die Hautmodelle besitzen eine grüne Fluoreszenz, während *C. albicans* orange-rötlich erscheint. Die Balkenlänge entspricht 1 cm.

4.4.2. Histologische Untersuchungen und Analyse der Viabilität

Mittels der PAS-Färbung (periodic acid–Schiff reaction) ist es möglich, Zellwandbestandteile wie Glykoproteine und Proteoglykane von *C. albicans* anzufärben und so sichtbar zu machen. Bereits 48h nach Infektion sind die Hautmodelle ohne Behandlung komplett mit *Candida*-Hyphen durchwachsen (Abb. 35). Eine Plasmabehandlungszeit von 5s führt zu keiner Reduktion des invasiven Wachstums der Hefe. Erst ab einer Plasmabehandlungszeit von 10s zeigt sich ein sichtbarer Rückgang der Infektion. Bei der Dauer von 40s ist im Behandlungsbereich kein Hyphenwachstum mehr ersichtlich. Dieser Effekt wird auch durch die graphische Auswertung der histologischen Schnitte bestätigt (Abb. 36)

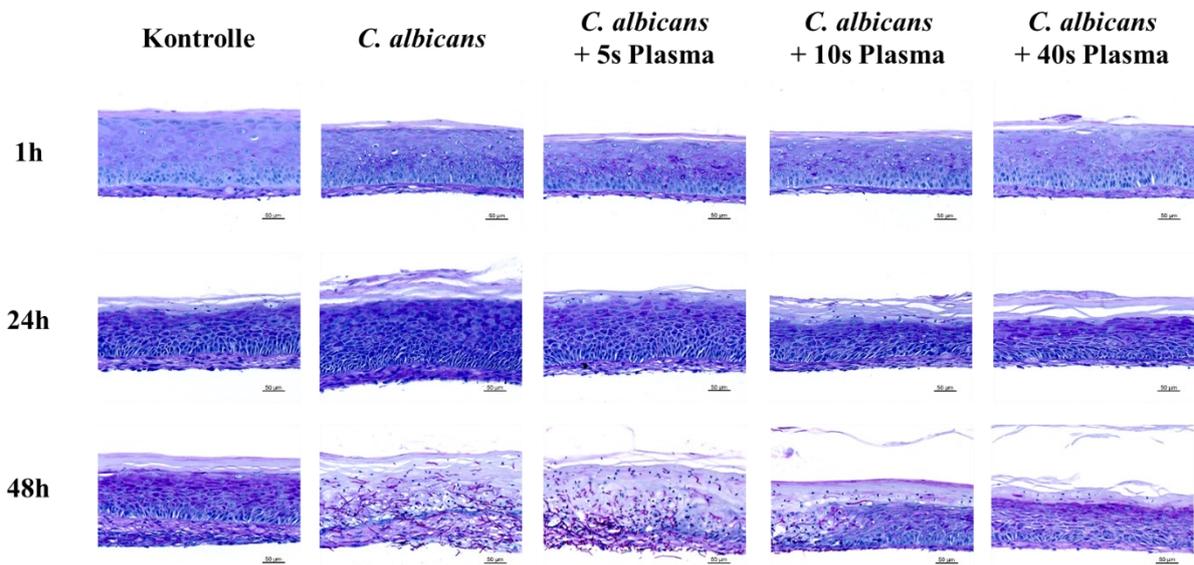


Abbildung 35: Histologische Analyse nach Infektion. 3D-Hautmodelle wurden mit *C. albicans* infiziert und mit Plasma behandelt. Mittels PAS-Färbung wurde das Hyphenwachstum von *C. albicans* sichtbar gemacht. Die Balkenlänge entspricht 50 μm .

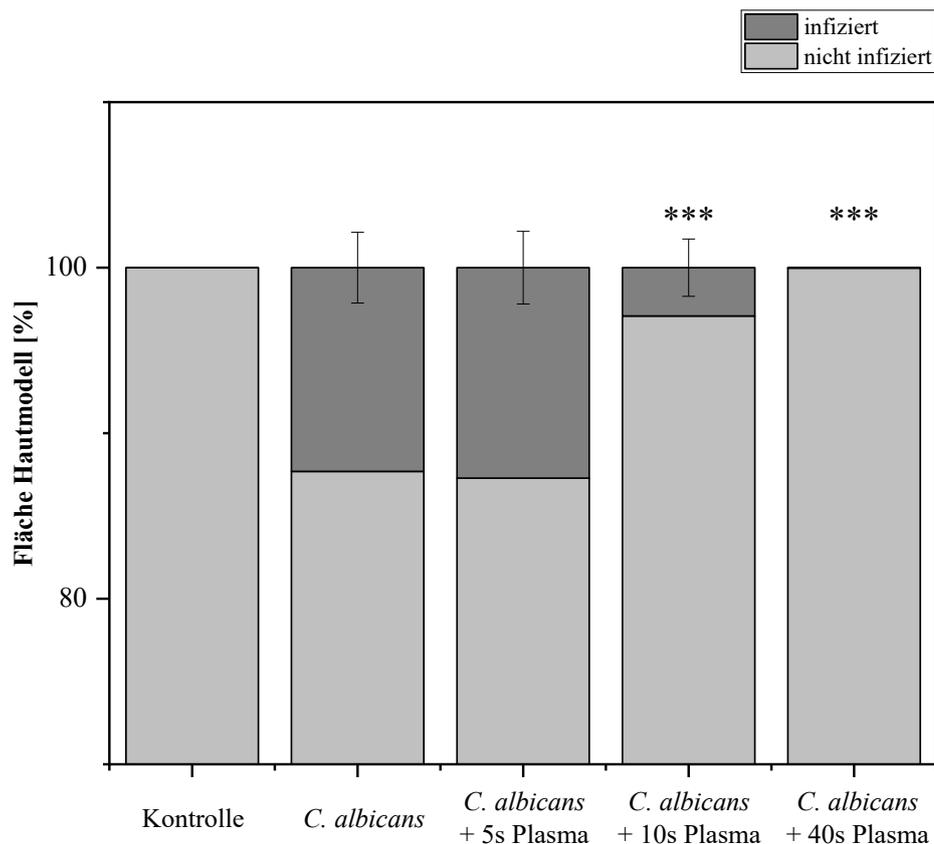


Abbildung 36: Graphische Auswertung der *Candida*-Infektion nach 48h. Mittels der PAS-gefärbten histologischen Schnitte wurde die infizierte Fläche prozentual zur Gesamtfläche des Hautmodells ermittelt. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Infektionskontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.

Mittels HE-Färbung (Abb. 37) lassen sich strukturelle Veränderungen oder Schädigung durch *C. albicans* am Hautmodell nachweisen. Es zeigen sich 1h sowie 24h nach der Infektion noch keine histologischen Veränderungen oder eine Schädigung der Modelle. Die Infektion mit *C. albicans* für 48h führt ohne Behandlung zu einer deutlichen Schädigung, was durch die Abrundung der Zellen sowie der Auflockerung des Zellverbandes charakterisiert ist. Mit steigender Plasma-Behandlungszeit ist eine Verringerung der Schädigung zu beobachten. Dies geht mit dem verminderten Hyphenwachstum von *C. albicans* einher. Bei langer Behandlungszeit (40s) ist keine Beeinträchtigung durch *Candida* mehr erkennbar.

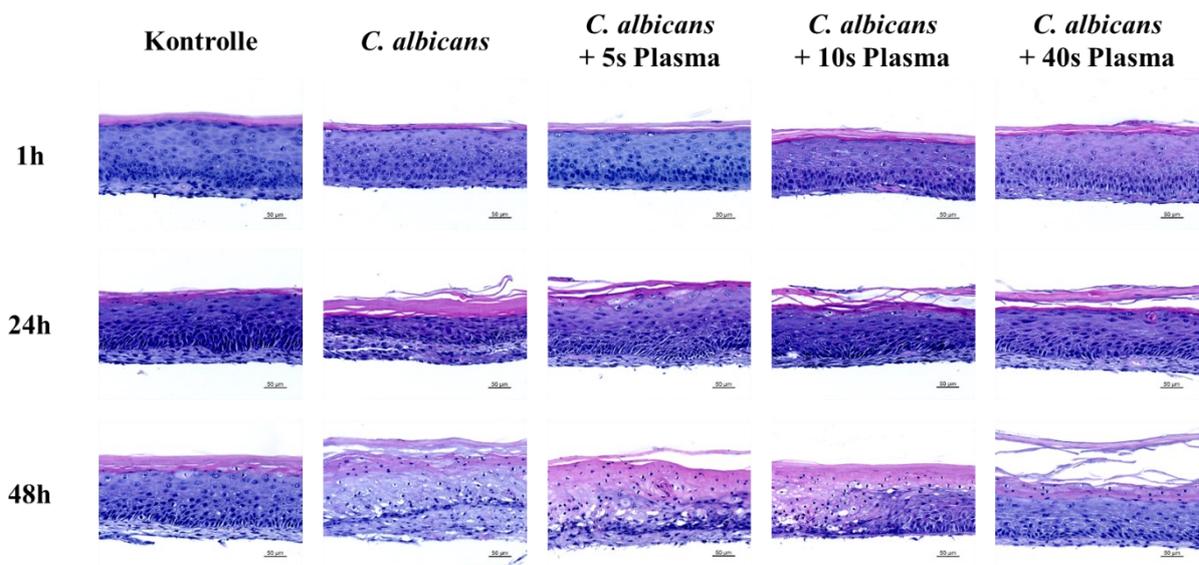


Abbildung 37: Histologische Analyse. Mittels HE-Übersichtsfärbung wurden nach Infektion der Hautmodelle histologische Veränderungen sichtbar gemacht. Die Balkenlänge entspricht 50 µm.

Die Ausschüttung von LDH (Abb. 38) spiegelt die histologischen Ergebnisse wider. Während die Freisetzung von LDH nach 1h und 24h noch gering ist, findet ein deutlicher Anstieg der Zytotoxizität 48h nach Infektion statt. Eine stark signifikante Reduktion der LDH-Ausschüttung ist erst bei 40s Plasma-Behandlungszeit ersichtlich.

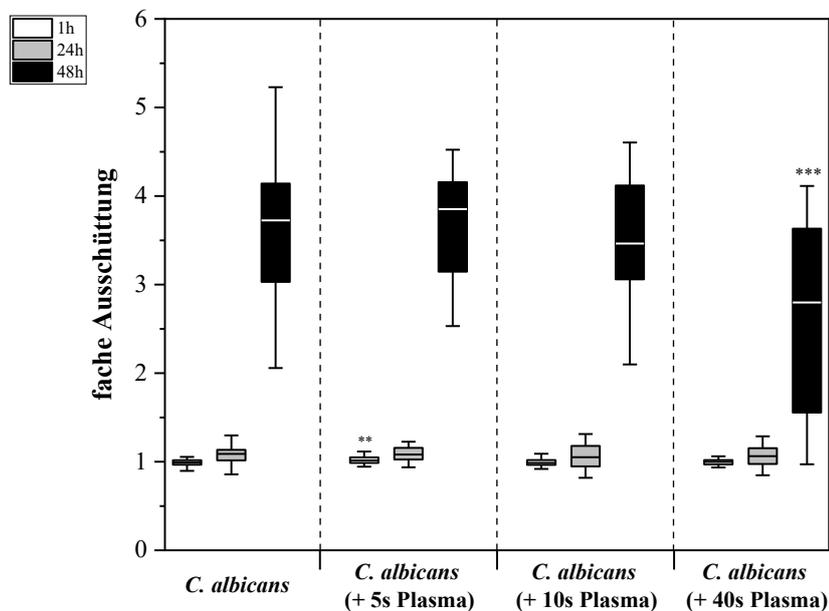


Abbildung 38: Analyse der Zytotoxizität nach Infektion. Nach Infektion und Plasmabehandlung der Hautmodelle wurde mittels LDH-Assay die Ausschüttung von LDH im Überstand bestimmt. Die fache Ausschüttung ergibt sich aus dem Vergleich mit der unbehandelten, nicht infizierten Kontrolle des gleichen Zeitpunktes. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Infektionskontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.

4.4.3. Expressionsanalyse pro-inflammatorischer Zytokine

Für die Regulierung der Immunantwort bei einer Infektion spielen Zytokine eine entscheidende Rolle. Sie werden als erste Reaktion auf die Erkennung von Mikroorganismen sekretiert und führen beispielsweise zur Rekrutierung von Immunzellen (van der Meide und Schellekens 1996). Anhand der RT-qPCR wurde nach Infektion und anschließender Plasmabehandlung der Hautmodelle die Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine untersucht, um eine mögliche Reduktion der Infektion zu analysieren (Abb. 39).

Die Infektion der Hautmodelle ohne Plasmabehandlung führt in allen Fällen zu einer deutlich gesteigerten Expression pro-inflammatorischer Zytokine. Die Plasmabehandlung der infizierten Modelle führt bei *IL6* (Abb. 39A) bereits 24h nach Behandlung zu einer deutlich geringeren Expression des Genes im Vergleich zur Infektionskontrolle. Bei einer Behandlungszeit von 40s ist eine Verminderung der *IL6*-Expression am deutlichsten erkennbar. Für *IL8* (Abb. 39B) zeigt sich 48h nach Behandlung mit Plasma eine Abnahme der Genexpression. Ein signifikanter Unterschied bei der *IL1A*-Expression (Abb. 39C) ist 48h nach Behandlung zu beobachten und zeigt sich unabhängig von der Behandlungsdauer. Die Plasmabehandlung der infizierten Hautmodelle führt zu einer signifikanten Senkung der *TNF*-Expression (Abb. 39D) bis zu 24h nach Behandlung. Danach ist kein signifikanter Unterschied zwischen Infektionskontrolle und der Plasmabehandlung mehr ersichtlich. Für *IL23* (Abb. 39E) zeigt sich eine vergleichbare Reaktion.

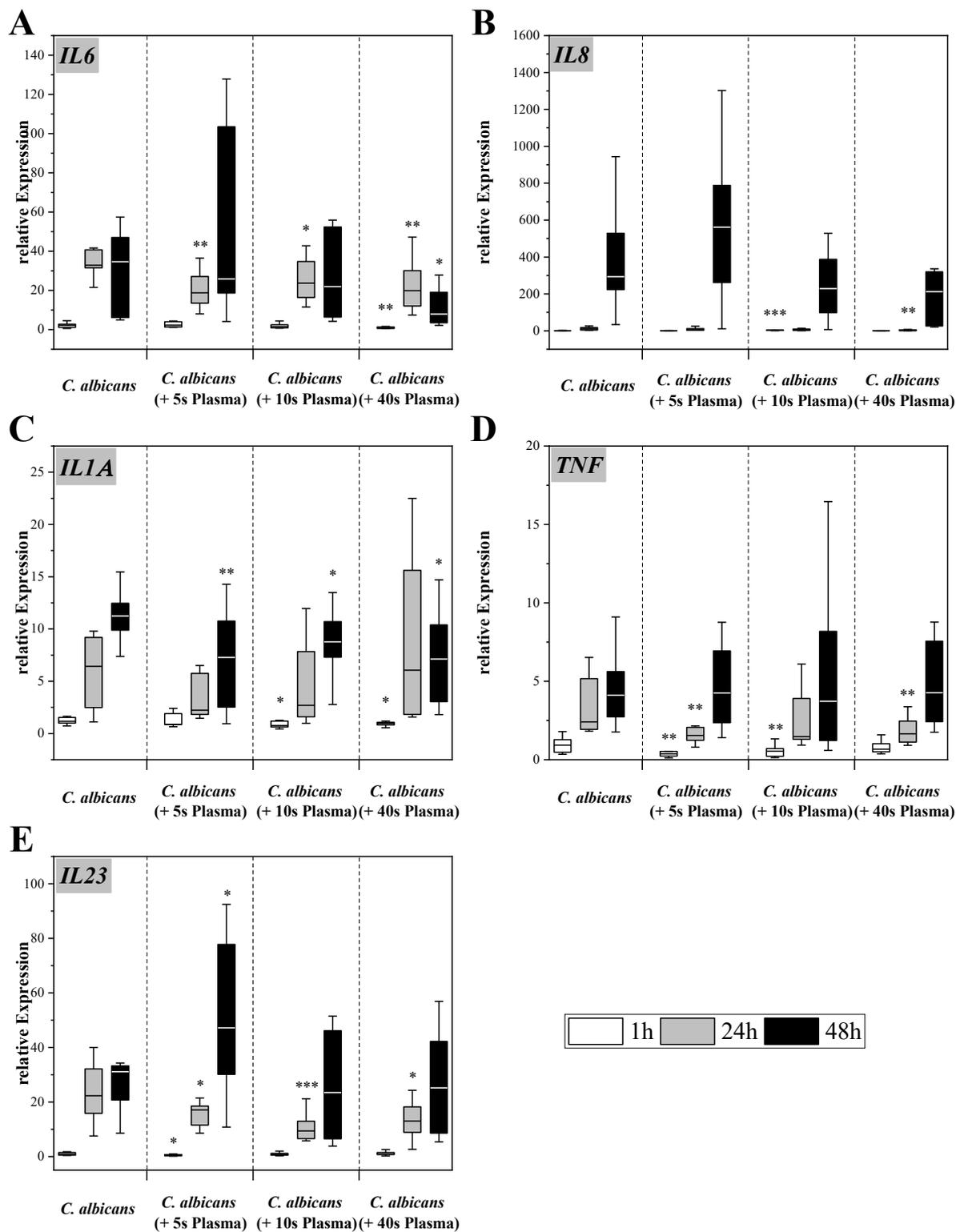


Abbildung 39: Expression pro-inflammatorischer Zytokine nach Infektion. Die Expression der Zytokine *IL6* (A), *IL8* (B), *IL1A* (C), *TNF* (D) sowie *IL23* (E) wurden mittels RT-qPCR bestimmt. Die relative Expression ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten, nicht infizierten Kontrolle des gleichen Zeitpunktes. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Infektionskontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p -Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.

4.4.4. Expression antimikrobieller Peptide

Eine gesteigerte Expression von allen untersuchten antimikrobiellen Peptiden ist bei den infizierten Hautmodellen ohne Behandlung zu finden (Abb. 40). Bei *HBD2* (Abb. 40A) erfolgt die Expression sehr früh und wird durch Plasmabehandlung signifikant reduziert. Für *S100A7* (Abb. 40B) ist eine Reduktion der Expression 24h nach Plasmabehandlung ersichtlich und zeigt sich unabhängig von der Behandlungszeit. Eine Reduktion der Infektion ist anhand der *RNASE7*-Expression ersichtlich (Abb. 40C). Generell ist nach Plasmabehandlung der Infektionsmodelle eine signifikante Reduktion der Genexpression der antimikrobiellen Peptide zu beobachten, welche mit der Reduktion des Hyphenwachstums assoziiert ist.

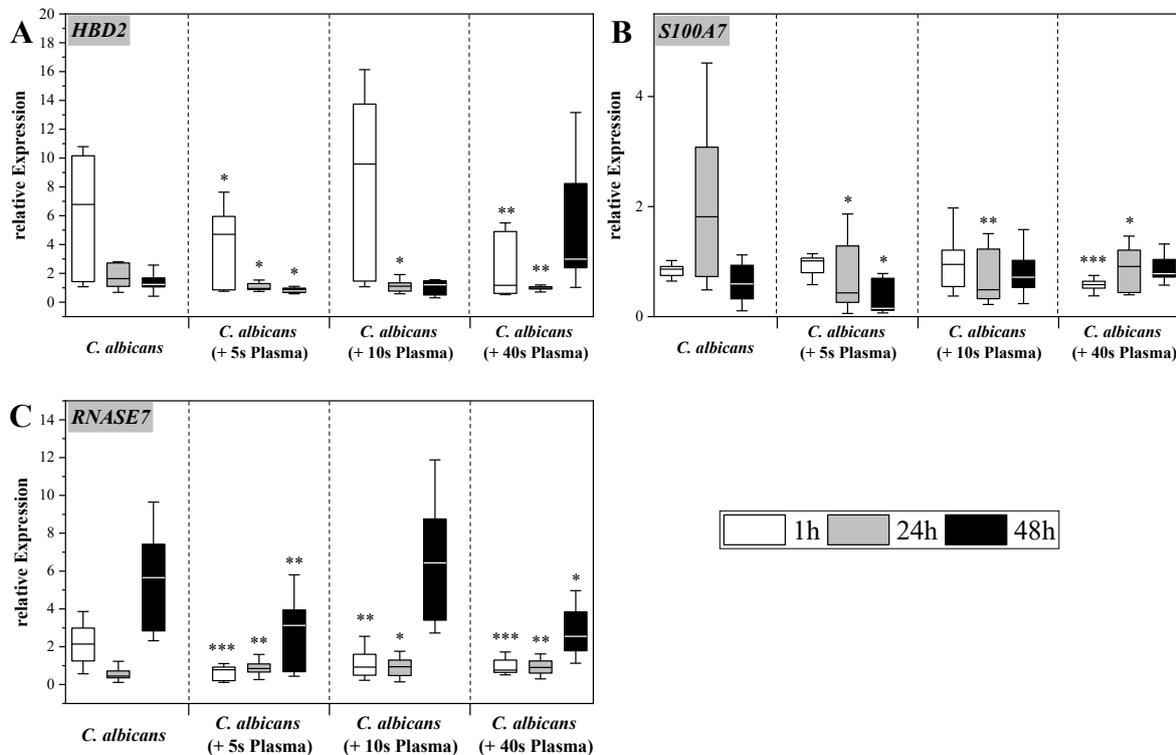


Abbildung 40: Expression antimikrobieller Peptide. Nach Infektion der Hautmodelle wurde die Expression von *HBD2* (A), *S100A7* (B) und *RNASE7* (C) mittels RT-qPCR bestimmt. Die relative Expression ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten, nicht infizierten Kontrolle des gleichen Zeitpunktes. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Infektionskontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p -Werte $\leq 0,001$ „****“, für $p \leq 0,01$ „***“ und für $p \leq 0,05$ „**“ stehen.

4.4.5. Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine

Die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine der Infektionsmodelle nach Plasmabehandlung ist in Abbildung 41 gezeigt. Die Infektion der Hautmodelle mit *C. albicans* führt zu einer stetigen Sekretion der Zytokine mit einem Maximum bei 48h. Ein signifikanter Rückgang der Ausschüttung von IL-6 (Abb. 41A) ist bei einer Plasma-Behandlungszeit von 40s ersichtlich. Im Gegensatz dazu führt bereits eine kurze Plasmabehandlungszeit von 5s zu einer signifikant verminderten IL-8-Ausschüttung (Abb. 41B). Ein vergleichbarer Effekt ist auch bei der Sekretion von IL-1 α zu beobachten (Abb. 41C).

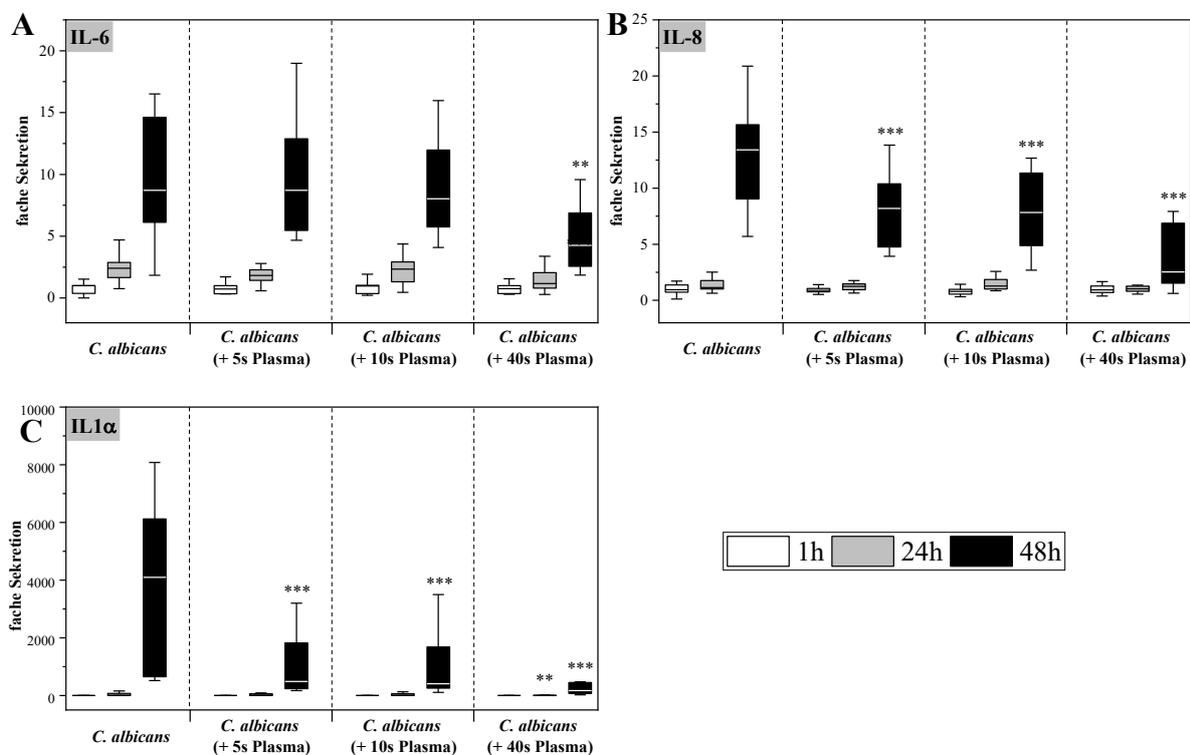


Abbildung 41: Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine. Nach Infektion der Hautmodelle und Behandlung mit Plasma der DBD-Quelle wurde anhand des Überstandes die Freisetzung von IL-6 (A), IL-8 (B), IL-1 α (C) mittels ELISA bestimmt. Die fache Sekretion ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten, nicht infizierten Kontrolle des gleichen Zeitpunktes. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Infektionskontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.

5. Diskussion

Kaltes Plasma hat in den letzten Jahren in der Medizin immer mehr an Bedeutung gewonnen. Die größten Anwendungspotentiale liegen bei der Behandlung von Infektionen, chronischen Wunden sowie in der Krebstherapie. Für die Behandlung von Wunden gibt es auf dem Markt bereits einige zugelassene Plasmaquellen wie beispielsweise der kINPen[®]MED von Neoplas, PlasmaDerm[®] der Firma Cinogy oder das plasma care[®] von Terraplasma. Bei der Etablierung von neuen Plasmaquellen ist die genaue Untersuchung der Wirksamkeit und Verträglichkeit von besonderer Bedeutung, da die Plasmabestandteile nicht nur Mikroorganismen effektiv abtöten, sondern auch gesunde humane Zellen schädigen können. Die DIN SPEC 91315 regelt die allgemeinen Anforderungen an medizinische Plasmaquellen. Dabei wird die Untersuchung der Verträglichkeit lediglich an 2D-Kultur gefordert. Für eine realitätsnahe Erforschung ist jedoch eine komplexe Umgebung notwendig, die auch strukturelle Komponenten miteinschließt. Daher wurde in dieser Arbeit die Biokompatibilität sowie antimikrobielle Wirkung von zwei verschiedenen Plasmaquellen an 3D-Hautmodellen vergleichend untersucht und die Ergebnisse in ein Infektionsmodell übertragen.

5.1. Antimikrobielle Untersuchungen

5.1.1. Agar-Test

Bei den durchgeführten Versuchen wurde mittels Agar-Test zunächst die antimikrobielle Wirkung des Plasmajets untersucht. Dabei erfolgte die Untersuchung der Sensitivität verschiedener klinisch relevanter Mikroorganismen gegen das Plasma.

S. aureus ist ein grampositiver, fakultativ anaerober Kokkus. Die Zellen sind nicht beweglich und bilden keine Sporen. Als Kommensale kommt er beim Menschen im oberen Respirations-trakt, im Magen, Darm sowie Urogenitaltrakt vor. Dennoch kann es unter bestimmten Bedingungen zu lebensgefährlichen Erkrankungen wie Endokarditis, nekrotisierende Lungenentzündung oder zum toxischen-Schock-Syndrom führen (Gulzar und Zehra 2018). *P. aeruginosa* dagegen ist ein stäbchenförmiges, gramnegatives Bakterium, welches ein Flagellum zur Fortbewegung besitzt. Es ist auf der Epidermis von Menschen, im Wasser oder im Boden angesiedelt. Als opportunistisches Pathogen kann es zu schweren Erkrankungen wie Sepsis führen (Jenny 2018). *C. albicans* als Hefe ist Bestandteil des Mikrobioms der Haut, kann sich aber durch

Veränderung des Mikrobioms z.B. durch Antibiotika ausbreiten und Infektionen auslösen. Häufig kommt es zu oberflächlichen Haut- und Schleimhautinfektionen, jedoch sind auch schwere systemische Infektionen möglich (Nobile und Johnson 2015).

Bei den Versuchen mit dem Plasmajet zeigte sich, dass der antimikrobielle Effekt deutlich von Arbeitsgas, Leistung sowie der Behandlungszeit abhängig ist. Stickstoff als Arbeitsgas wies dabei eine deutlich bessere Wirkung auf als Luft.

KAP bestehen aus einem komplexen Gemisch von verschiedenen reaktiven Spezies (Sauerstoff- und Stickstoffspezies), UV-Strahlung, angeregten Molekülen etc. welche zu Schädigung der Mikroorganismen führen können. Besonders die reaktiven Spezies gelten als effektiv für die Inaktivierung (Bourke et al. 2017). Dabei ist die Plasma-Zusammensetzung abhängig vom eingesetzten Arbeitsgas. Für Luft können beim Plasmajet sowohl reaktive Sauerstoffspezies als auch Stickstoffspezies detektiert werden, während für Stickstoff als Arbeitsgas ausschließlich reaktive Stickstoffspezies gemessen werden können (Horn et al. 2017, Wiegand et al. 2014). Der Wirkmechanismus des Plasmas ist in diesem Fall noch unbekannt, jedoch scheint der Stickstoffgehalt einen Einfluss auf die bessere Wirksamkeit des Plasmas gegenüber den Mikroorganismen zu besitzen. Positiv geladener Stickstoff ist in der Lage, sich an die negativ geladene Zellwand von Mikroorganismen anzulagern und so die Zellwandintegrität zu stören, was zum Zelltod führt (Bourke et al. 2017, Wiegand et al. 2014). Es ist ebenfalls nicht auszuschließen, dass die entstandenen Stickstoffspezies mit der Umgebungsluft reagieren und weitere reaktive Spezies gebildet werden, welche den antimikrobiellen Effekt herbeiführen. Ein Vertreter reaktiver Spezies ist beispielsweise das Peroxinitrit (OONO^-), dessen antimikrobielle Wirkung bereits nachgewiesen ist und das einen stärkeren toxischen Effekt besitzt als Stickstoffmonoxid (NO) oder das Hydroperoxydion (O_2^-) allein (Schairer et al. 2012).

Bei den hier erhaltenen Ergebnissen zeigte sich eine verbesserte antimikrobielle Wirkung bei höherer Leistung sowie steigender Behandlungszeit. Song et. al konnten eine vergleichbare Abhängigkeit von eingesetzter Leistung und Behandlungszeit nachweisen. Dabei war der Effekt für die Erhöhung der Leistung größer als bei der Steigerung der Behandlungszeit bei gleichem Leistungseinsatz. Dies kann mit der Änderung der Plasmazusammensetzung bei Variation der Parameter erklärt werden (Song et al. 2009). Bei niedriger Behandlungszeit oder geringer Leistungseinbringung kann die entstehende geringere Konzentration von Plasma-Spezies ein Grund für die verminderte antimikrobielle Wirkung sein (Wiegand et al. 2014).

Der Einfluss der reinen Arbeitsgase auf den antimikrobiellen Effekt kann in dieser Arbeit ausgeschlossen werden. Die Versuche haben gezeigt, dass Luft sowie Stickstoff, ohne Zündung des Plasmas, keinen antimikrobiellen Einfluss haben. Auch die Temperatur als Einflussfaktor

kann in diesem Fall vernachlässigt werden, da diese im Agar bei den verwendeten Parametern die Temperatur von 40°C nicht überschreitet (Horn et al. 2017). Lediglich der Austrocknungseffekt könnte hier eine Rolle spielen. Aufgrund von Messungen bei Projektpartnern kann davon ausgegangen werden, dass die emittierte UV-Strahlung bei dem Plasmaeffekt eine untergeordnete Rolle spielt (Daten nicht gezeigt).

Neben dem Plasmajet wurde in dieser Arbeit die DBD-Plasmaquelle hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Wirkung untersucht. Da technisch bedingt bei diesem Prototyp kein externes Arbeitsgas hinzugefügt werden konnte, erfolgte die Generierung des Plasmas nur mit der Umgebungsluft. Die Ergebnisse zeigten bereits nach kurzer Behandlungszeit eine sehr gute antimikrobielle Wirkung. Ein Temperatureffekt des Plasmas kann auch hier ausgeschlossen werden, da die vom Plasma ausgehende Temperatur für die verwendeten Behandlungszeiten 36°C nicht übersteigt. Mit hoher Wahrscheinlichkeit hat das entstandene Ozon einen Einfluss auf den antimikrobiellen Effekt (Fischer et al. 2017). Ozon ist ein starkes Oxidationsmittel, was zur Schädigung von Enzymen oder DNA führen kann. Oxidativer Stress durch Ozon initiiert redox-sensitive Signalwege, welche Inflammation sowie Zelltod aktivieren (Lunov et al. 2014). Weiterhin greift Ozon die Glycolipide der mikrobiellen Zellwand an und sorgt für eine Störung der Zellintegrität (Megahed et al. 2018). Elektronische Entladungen im Plasma führen zur Freisetzung von UV-Strahlung. Die Dosis ist dabei abhängig von Behandlungszeit oder Gaszusammensetzung. Die Schädigung kann direkt über die Absorption der Energie durch zelluläre Makromoleküle erfolgen oder indirekt über die Initiation von oxidativem Stress (Heinlin et al. 2011). Wie auch beim Menschen kann UV-Strahlung bei Mikroorganismen zur Bildung von Pyrimidin-Dimeren und somit zur DNA-Schädigung und zum Zelltod führen (Hijnen et al. 2006). Aufgrund vorangegangener Untersuchungen wird vermutet, dass UVB-Strahlung bei dem Plasmaeffekt eine untergeordnete Rolle spielt (Hinkelmann 2018).

Einige Arbeitsgruppen konnten Unterschiede in der Wirksamkeit der Plasmabehandlung verschiedener Mikroorganismen feststellen. Dabei war die Sensitivität gegenüber der Plasmabehandlung abhängig von Zellwandaufbau oder Grameigenschaften (Mai-Prochnow et al. 2016, Han et al. 2016). In den hier durchgeführten Versuchen für beide Plasmaquellen zeigte sich *C. albicans* als Hefe resistenter gegenüber der Plasmabehandlung als die eingesetzten Bakterien. Die Plasmamembran von *C. albicans* ist durch eine mehrschichtige Zellwand geschützt. Diese besteht aus einer inneren Schicht aus β -Glucan und Chitin sowie einer äußeren Schicht aus Mannoproteinen, welche die Zelle vor schädlichen Einflüssen schützen (Ruiz-Herrera et al. 2006). Die Hülle gramnegativer Bakterien besteht dagegen aus einer äußeren und inneren

Membran, welche durch eine dünne Peptidoglycan-Schicht getrennt ist. Grampositiven Bakterien fehlt im Gegensatz dazu die äußere Membran, sie besitzen jedoch dafür eine deutlich dickere Peptidoglycan-Schicht (Silhavy et al. 2010). Weiterhin haben die reaktiven Spezies des Plasmas unterschiedliche Wirkorte bei den Bakterienarten. Während bei gramnegativen Bakterien eher die Wirkung durch die Störung der Zellhülle erfolgt, sind diese bei grampositiven Bakterien auf intrazelluläre Schädigung von DNA und Proteinen zurückzuführen (Han et al. 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit ist kein eindeutiger Unterschied in der antimikrobiellen Wirkung des Plasmas zwischen den unterschiedlichen Bakterienarten zu erkennen, weder bei Anwendung des Plasmajets noch bei der DBD-Quelle.

Diese Ergebnisse konnten in einer Dissertation über die DBD-Quelle anhand verschiedener Bakterienarten bestätigt werden (Hinkelmann 2018). Auch Nishime et. al sowie Takamatsu et al. sind bei ihren Untersuchungen zu diesem Ergebnis gekommen (Nishime et al. 2017, Takamatsu et al. 2015). Daher ist es nicht möglich, eine generelle Abhängigkeit von den Gram-Eigenschaften der Bakterien zur Plasmaresistenz zu bilden, sondern dies scheint für jedes Bakterium individuell zu sein (Lopez et al. 2019).

Obwohl bei beiden Plasmageräten Luft als Arbeitsgas verwendet wurde, zeigten sich in der Wirksamkeit untereinander deutliche Unterschiede. Dabei wies die DBD-Plasmaquelle eine bessere antimikrobielle Wirkung im Vergleich zum Plasmajet auf. Dies hat ihre Ursache in den Eigenschaften der verschiedenen Plasmaquellen. Generell ist die Wirkungsweise der Plasmabehandlung abhängig von vielen Faktoren, wie Bauart (Jet oder DBD-Quelle), der Leistungseinbringung oder dem Behandlungsabstand. DBD-Plasmaquellen sorgen für eine hohe Plasmaidichte an der Probe im Gegensatz zu Plasmajets. Auch die emittierte UV-Strahlung unterscheidet sich bei den jeweiligen Geräten (Wiegand und Elsner 2017). Dies hat einen Einfluss auf die Plasmazusammensetzung und den damit verbundenen antimikrobiellen Effekt (Boehm und Bourke 2019).

5.1.2. Biofilminaktivierung

Als Biofilm bezeichnet man die Lebensgemeinschaft von Mikroorganismen, welche in einer selbst produzierten Matrix aus polymeren Substanzen vorkommen und sich so an Oberflächen anhaften können (Flemming et al. 2016). Die Biofilm-Matrix besteht aus 97% Wasser sowie Polysacchariden, Proteinen und extrazellulärer DNA. Die Biofilm-Bildung wird nach Anheftung einiger planktonischer Zellen an das Substrat initiiert. Darauf folgend werden durch Zell-

teilung Mikrokolonien gebildet und die Generierung von polymeren Substanzen beginnt. Ausgereifte Biofilme sind weitgehend resistent gegenüber Antibiotika. Die extrazelluläre Matrix bildet dabei eine Barriere, die den Transport von Chemikalien behindert. Nährstoffmangel oder andere Stressoren führen zur Auflösung des Biofilms was zur Zerstreuung in andere Areale führt. Ein wichtiges kommunikatives System des Biofilmes ist das „*Quorum sensing*“, welches das Wachstum, Überleben oder die Kolonisierung im Biofilm erleichtert. Beispielsweise wird so die Konzentration von anderen Bakterienarten im Biofilm durch Produktion von Enzymen oder Toxinen gesteuert (Satpathy et al. 2016). Biofilme stellen im klinischen Alltag eine große Herausforderung dar, da sie medizinische Geräte oder Implantate besiedeln und so Infektionen auslösen. Traditionelle Desinfektionsmittel verändern oder schädigen empfindliche Oberflächen von Medizinprodukten. Aufgrund seiner antimikrobiellen Eigenschaften hat Plasma das Potential für die Inaktivierung von Biofilmen (Gilmore et al. 2018).

In dieser Arbeit wurde die Plasma-Inaktivierung verschiedener klinisch relevanter Biofilmbildner untersucht. Aufgrund der technischen Einschränkungen wurde nur die DBD-Quelle geprüft. Bei Anwendung des Plasmajets wurde der Biofilm aufgrund des hohen Gasdruckes von 6 bar bei der Anwendung aus der Platte gespült und das Ergebnis verfälscht bzw. Kreuzkontaminationen hervorgerufen, wodurch eine Auswertung der Ergebnisse nicht möglich war.

S. aureus gehört zu den ESKAPE-Pathogenen, welche durch Multiresistenzen und Virulenz gekennzeichnet sind (Mulani et al. 2019). Diese grampositiven Bakterien können chronische Infektionen durch die Besiedlung von Medizinprodukten, wie beispielsweise künstlichen Herzklappen oder Katheter hervorrufen (Moormeier und Bayles 2017). Im Gegensatz zum planktonisch wachsenden *S. aureus* zeigte der biofilmbildende *S. aureus* in dieser Arbeit eine deutlich höhere Resistenz gegenüber der Plasmabehandlung. Die Ursache liegt hierbei generell in der Bildung einer extrazellulären Matrix (ECM), welche eine Barriere für die Plasmabestandteile bildet (Gupta und Ayan 2019). Diese schützt die Mikroorganismen beispielsweise vor der im Plasma enthaltenen UV-Strahlung und reaktiven Spezies durch die Bindung an ECM-Moleküle. Weiterhin befinden sich in Biofilmen persistente Zellen, welche metabolisch inaktiv und somit resistenter gegenüber äußeren Einflüssen sind (Yin et al. 2019). Auch Fahmide et. al benötigten bei Versuchen mit einem Plasmajet Behandlungszeiten von mehr als 2 min, um die Inaktivierung von *S. aureus* im Biofilm zu erzielen (Fahmide et al. 2021). Eine weitere Arbeitsgruppe stellte fest, dass die Zusammensetzung des Arbeitsgases einen Einfluss auf die Inaktivierung des *S. aureus* Biofilms hat (Xu et al. 2017).

Als ein Vertreter der gramnegativen Biofilm-Bildner wurde in dieser Arbeit *P. aeruginosa* als ein Modellorganismus gewählt. Dieses Bakterium ist ein weiterer Vertreter der nosokomialen

Krankheitserreger, die unter bestimmten Bedingungen zu schweren Infektionen führen können. In dieser Arbeit wies der *P. aeruginosa*-Biofilm eine starke Sensitivität gegenüber der Plasmabehandlung im Vergleich zu den anderen Mikroorganismen auf. Bereits nach wenigen Sekunden Plasmabehandlung konnten signifikante Effekte nachgewiesen werden. Da die Biomasse kaum beeinträchtigt wurde, kann ein Ablösen des Biofilms nach Plasmabehandlung ausgeschlossen werden. In der Literatur gibt es einige Arbeitsgruppen, welche sich mit der Inaktivierung von *Pseudomonas*-Biofilmen beschäftigen. Ziuzina et. al konnten mittels DBD-Quelle jedoch erst nach 60s Plasmabehandlung einen antimikrobiellen Effekt erzielen. Auch war nach 5 min Plasmabehandlung nicht der komplette Biofilm abgetötet (Ziuzina et al. 2014). Mittels eines Plasmajets konnten Mai-Prochnow et. al dagegen nach 10 min Plasmabehandlung den kompletten Biofilm inaktivieren (Mai-Prochnow et al. 2015). Die Unterschiede in der Reaktion der Biofilme sind nicht nur durch die unterschiedlichen Plasmagerätearten zu erklären. *Pseudomonas*-Biofilme sind bei Plasmen, wo reaktive Sauerstoffspezies dominieren, weniger anfällig. Im Gegensatz dazu sind diese für reaktive Stickstoffspezies deutlich sensibler, wobei die Effekte schon nach wenigen Sekunden erzielbar sind. Es wird angenommen, dass die RNS die Struktur des Biofilms zerstören und das Eindringen weiterer reaktiver Spezies erleichtern (Modic et al. 2017). Dieser Effekt erklärt die Sensitivität des Biofilms gegenüber der DBD-Quelle, da diese nachweisbar RNS produziert (Hinkelmann 2018).

Um zu überprüfen, ob dieser Sensitivitätseffekt ein Merkmal der Gram-Eigenschaften ist, wurden zwei weitere gramnegative Biofilmbildner untersucht. *E. coli*-Biofilme sind durch die Kolonisierung von Kathetern eine der Hauptursachen von nosokomialen Infektionen. Zudem sind sie gegen viele bekannte Antibiotika resistent (Sharma et al. 2016). *A. baumannii* ist ein weiterer Vertreter der sogenannten ESKAPE-Pathogene, welche durch ihre Multiresistenz für schwere nosokomiale Infektionen verantwortlich sind (Mulani et al. 2019). Durch diesen Keim ausgelöste Erkrankungen sind beispielsweise Lungenentzündung, Haut- und Weichteilinfektionen oder Meningitis (Eze et al. 2018).

Im Gegensatz zu *P. aeruginosa* zeigte die Plasmabehandlung gegen *E. coli* sowie *A. baumannii* nur eine geringe antimikrobielle Reaktion. Vergleichbare Ergebnisse berichteten auch andere Arbeitsgruppen. Ziuzina et. al konnten mittels DBD-Quelle erst nach 300s Plasmabehandlung gegen *E. coli* einen antimikrobiellen Effekt erwirken (Ziuzina et al. 2015). Auch bei *A. baumannii* sind laut Flynn et. al mehrere Minuten Plasmabehandlung für eine antimikrobielle Wirkung notwendig. Jedoch konnte der Biofilm auch nach 9 min Plasmabehandlung nicht komplett inaktiviert werden (Flynn et al. 2019).

Als Vertreter der biofilmbildenden Hefen wurde für diese Arbeit *C. albicans* gewählt. Besonders die Biofilmbildung ist bei *C. albicans* ein bedeutendes Virulenzmerkmal. Diese Biofilme sind intrinsisch resistent gegen konventionelle antimykotische Therapien, das Immunsystem des Wirtes sowie andere Umweltfaktoren. Die Biofilmstruktur ist dabei hochkomplex mit verschiedenen Zelltypen wie Hefezellen, Pseudohyphen und Hyphen, welche in eine Matrix eingebettet sind. Neben medizinischen Produkten können sie auch Schleimhautoberflächen besiedeln und somit schwere Infektionen auslösen (Gulati und Nobile 2016).

Die Plasmabehandlung von *C. albicans* führte bei diesen Untersuchungen zu keiner Reduktion der Viabilität. Auch nach 2 min Behandlungszeit zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. In einer *in vitro* und *in vivo* Studie von He et. al führte erst eine Plasmabehandlungszeit von 4 min zu einer signifikanten antimikrobiellen Reaktion (He et al. 2020). Maisch et. al erlangten vergleichbare Ergebnisse. Hier waren erste Effekte ab einer Behandlungszeit von 5 min ersichtlich (Maisch et al. 2012b). In einer Untersuchung von Koban et. al wurden verschiedene Plasmaquellen hinsichtlich ihrer Wirkung gegen *Candida*-Biofilme im Vergleich zu herkömmlichen Behandlungsmethoden erforscht. Hier war der antimikrobielle Effekt bereits nach 1 min Plasmabehandlungszeit ersichtlich. Dabei wies die DBD-Plasmaquelle eine bessere Wirkung im Vergleich zum Plasmajet auf, was eine Abhängigkeit der Gerätebauart bei der Biofilmbehandlung aufzeigt (Koban et al. 2010). Der *C. albicans*-Biofilm besitzt Schutzmechanismen, die ihn gegen Plasmabehandlung resistenter machen. Zum einen weist der Biofilm eine strukturierte und kompakte Ausbildung auf, was die Penetration von Plasmabestandteilen erschwert. Zum anderen besitzt auch der *Candida*-Biofilm metabolisch inaktive Persisterzellen, die deutlich resistenter sind (Gulati und Nobile 2016). Weiterhin exprimieren besonders diese Persisterzellen die Superoxid-Dismutase, welche die reaktiven Spezies des Plasmas inaktivieren kann (Bink et al. 2011).

Aus den Ergebnissen der hier durchgeführten Versuche lässt sich somit schließen, dass die Gram-Eigenschaften allein nicht unbedingt eine Aussage über die Sensitivität gegenüber KAP treffen lassen. Zusammengefasst ist die antimikrobielle Wirkung nicht nur abhängig von den Geräteeigenschaften, Behandlungsabstand oder dem Gasgemisch, sondern auch von den Eigenschaften des Biofilms. Die extrazelluläre Matrix von Biofilmen besteht aus einer komplexen Zusammensetzung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS). Die Bestandteile der EPS sowie die gesamte Zusammensetzung ist für jede Bakterienart individuell und dienen der Adhäsion, Stabilisation, dem Schutz vor Antibiotika (Karygianni et al. 2020) oder reaktiven Spezies (Gambino und Cappitelli 2016). Ein wichtiger Bestandteil der Matrix von *S. aureus* ist das

Polysaccharid poly- β (1-6)-N-acetylglucosamin (PNAG), welches neben Stabilität und Adhäsion auch einen Schutz gegen Antibiotika bietet (Lister und Horswill 2014). Die Matrix von *P. aeruginosa* enthält vor allem die Polysaccharide Psl, Pel und Alginat, die neben Stabilität und Bindung ebenfalls Antibiotikaresistenz vermitteln (Mann und Wozniak 2012). Die Hauptbestandteile der Matrix von *E. coli* sind dagegen Polysaccharid-Zellulose, proteinhaltige Fasern (curli fibres) und Flagellen. Auch PNAG ist bei diesem gramnegativen Bakterium ein wichtiger Matrixbestandteil (Hobley et al. 2015). Dieses Polysaccharid vermittelt auch bei *A. baumannii* wichtige Schutzfunktionen (Colquhoun und Rather 2020). Bei der Hefe *C. albicans* dagegen sind α -Mannane sowie β -Glucane als Gerüstsubstanzen zusätzlich für den Schutz vor Antibiotika verantwortlich (Pierce et al. 2017). Nukleinsäuren wie extrazelluläre DNA (eDNA) sind allgemein unter Bakterien und Pilzen verbreitet und verhindern die Diffusion von antimikrobiellen Substanzen durch elektrostatische Interaktion (Karygianni et al. 2020). Ein wichtiger Faktor, welcher die Resistenz gegenüber dem Plasma vermittelt ist die Dicke der extrazellulären Matrix, da die Diffusion der Plasma-Bestandteile dadurch begrenzt wird (Kumar und Anand 1998). Die Matrix-Dicke und Architektur sind sowohl vom Mikroorganismus selbst abhängig als auch von Umwelteinflüssen, Stress oder dem Medium und können sich auch zwischen den einzelnen Stämmen unterscheiden (Karygianni et al. 2020). Murga et. al kultivierten beispielweise *P. aeruginosa* und *K. pneumoniae* unter gleichen Bedingungen und konnten dabei deutliche Unterschiede in der Dicke des Biofilmes feststellen. Hierbei zeigte sich die Biofilm-Matrix von *P. aeruginosa* weniger ausgeprägt im Vergleich zu *K. pneumoniae* (Murga et al. 1995). Einen Einfluss der Matrix-Zusammensetzung auf den antimikrobiellen Effekt von Plasma konnten Labadie et. al beobachten. Die Untersuchungen erfolgten anhand gleicher Bakterienstämme mit unterschiedlicher Zusammensetzung des Biofilms. Es zeigte sich, dass dies einen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber der Plasmabehandlung hat. Dieser Effekt ist auf die Polysaccharide im Biofilm zurückzuführen, welches die reaktive Spezies des Plasmas abfangen können und so die Bakterienzellen schützen (Labadie et al. 2021). Der unterschiedliche Plasma-Effekt auf die Biofilmbildner in dieser Arbeit kann daher vermutlich ebenfalls auf die Biofilm-matrix-Heterogenität zurückgeführt werden.

5.2. Biokompatibilität und Zytotoxizität

Um eine erste Übersicht der Plasmawirkung zu erhalten, wurden die Untersuchungen zunächst mittels 2D-Kultur durchgeführt. Als 2D-Kultur wird hier die Kultivierung von Zellen auf ebenen Oberflächen in Zellkulturflaschen oder Petrischalen definiert. Die Plasmabehandlung von

HaCaT-Keratinocyten mit dem Plasmajet in dieser Arbeit führte zu einer starken Schädigung der Zellen. Dies war für alle eingesetzten Plasmaparameter der Fall. Versuche mit dem Arbeitsgas, ohne zünden des Plasmas haben gezeigt, dass vor allem der vorhandene Druck zu dem Viabilitätsverlust führt (Daten nicht gezeigt). Auch bei der DBD-Quelle führten bereits niedrige Behandlungszeiten zu einer deutlich verminderten Zellviabilität. Hier kann jedoch der Einfluss des Arbeitsgases und dessen Druck ausgeschlossen werden, da aufgrund der Bauweise der Plasmaquelle kein Gasdruck vorhanden ist.

Die Verwendung von unterschiedlichen Zell-Monolayern ist auch in der Plasmaforschung eine gängige Methode. Härtel et al. untersuchten beispielsweise die Wirkung von DBD-Plasma auf eine Monolayerkultur von HaCaT-Keratinocyten. Es zeigte sich, dass die zytotoxische Wirkung vom eingesetzten Arbeitsgas sowie der Behandlungszeit abhängig ist (Haertel et al. 2013). Auch Virard et al. konnten an Fibroblasten die nekrotische Wirkung einer Plasmabehandlung nachweisen (Virard et al. 2015).

Bevor Tierversuche oder klinische Studien durchgeführt werden, geben 2D-Versuche einen ersten Einblick in die Toxizität oder Wirkungsweise einer Substanz oder Behandlung. Trotz der kostengünstigen Durchführung geben diese lediglich ungenaue Daten für die Bewertung von *in vivo* Reaktionen. 2D-Kulturen beinhalten meist nur eine Zellart und können die natürlichen Bedingungen wie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen nicht imitieren. Daraus resultiert eine veränderte Differenzierung, Morphologie und Proliferation sowie Expression von Genen und Proteinen im Vergleich zum Ursprungsgewebe. Ein Intermediat zwischen 2D-Kultur und *in vivo*-Versuchen stellen 3D-Modelle dar (Kapalczynska et al. 2018). Hierbei werden mehrere Zellarten in Kombination mit einer Matrix kultiviert, was unter anderem eine natürliche Kommunikation, Differenzierung sowie Interaktion untereinander erlaubt (Randall et al. 2018). Ein vergleichender Versuch zwischen 2D-Kultur und 3-Hautmodellen wurde von Sun et al. durchgeführt. Hier wurde die Reaktion auf zytotoxische Substanzen untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass 3D-Hautmodelle die physiologische Reaktion der Haut auf Stimuli besser nachstellen, da sie die epidermalen Schichten der Haut inklusive einer Hornschicht aufweisen (Sun et al. 2006). Generell bestehen 3D-Hautmodelle meist nur aus einer Dermis sowie Epidermis ohne Immunzellen oder Hautanhangsorganen, welche einen Einfluss auf die Gesamtreaktion haben können. Somit sind sie in der Komplexität limitiert. Das Einbringen weiterer Zellarten ist möglich, jedoch erschwert sich die Herstellung mit steigender Komplexität deutlich (van den Broek et al. 2017).

Aufgrund der besseren natürlichen Nachstellung der humanen Haut sowie der Ergebnisse der 2D-Kultur wurden die folgenden Untersuchungen der Plasmaquellen auf ein 3D-Hautmodell

übertragen. Im Vergleich zu den 2D-Versuchen zeigte sich bei den 3D-Versuchen eine deutlich höhere Toleranz gegenüber dem Plasma beider Plasmaquellen. Die geringe Schädigung kann mit der Schutzfunktion des Stratum corneum erklärt werden, welche in 2D-Kultur nicht vorhanden sind.

Die Haut stellt eine wichtige Barriere zur Außenwelt dar, welche vor schädlichen Einflüssen schützen soll. Die Hornschicht als äußerste Barriere bildet dabei den wichtigsten Schutz, um das Eindringen von Substanzen zu verhindern (Del Rosso und Levin 2011). Kleine Moleküle können jedoch die Haut über zwei verschiedene Wege passieren, dem transzellulären Weg oder dem parazellulären Weg. Bei der transzellulären Penetration gelangen Wirkstoffe direkt durch die Zellmembran. Beim parazellulären Weg diffundieren die Moleküle zwischen den Zellen hindurch (Laksitorini et al. 2014). Die Penetration durch das Stratum corneum wurde auch für reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies als Haupt-Wirkstoffe des Plasmas beschrieben (Duan et al. 2020). Jedoch befinden sich in der Haut diverse antioxidative Systeme wie Vitamin E sowie die Enzyme Katalase und Glutathion-Peroxidase, welche die reaktiven Spezies in harmlose Verbindungen umwandeln (Thiele et al. 2001). Weiterhin sind reaktive Spezies nicht grundlegend als schädlich anzusehen, sondern haben auch einen physiologischen Effekt. Sofern die Redox-Balance durch antioxidative Systeme erhalten werden kann, fungieren reaktive Spezies beispielsweise als Signalmoleküle für Proliferation, Differenzierung oder zur Immunabwehr. Ist die Konzentration reaktiver Spezies jedoch zu hoch, um vom anti-oxidativen System ausgeglichen zu werden, kommt es zum oxidativen Stress, was zur Oxidation von DNA, Proteinen und Lipiden und somit zur Zellschädigung, Tumorgenese oder Autoimmunität führen kann (Schieber und Chandel 2014).

Bei dem Plasmajet kam es bei den Hautmodellen bei hohem Leistungseinsatz oder gesteigerten Behandlungszeiten zu einer histologisch-bemerkbaren Schädigung, gekennzeichnet durch Abrundung der Zellen sowie einer Dunkelfärbung im dermalen Bereich. Hierbei handelt es sich nachweislich um Nekrose. Mittels HE-Färbung werden für die Übersichtsfärbung Zellbestandteile angefärbt. Diese werden bei Nekrose in den extrazellulären Raum abgegeben und durch die histologische Färbung erfasst (Fischer et al. 2008). Da ein Temperatureinfluss ausgeschlossen werden kann, ist die schädigende Wirkung den Plasmabestandteilen zuzuschreiben. Abhängig von unterschiedlichen Einflussfaktoren ist KAP auf zellulärer Ebene in der Lage, Seneszenz, Apoptose oder Nekrose auszulösen (Semmler et al. 2020). Bei hohen Leistungen oder Behandlungszeiten führt die gesteigerte Konzentration an reaktiven Spezies schließlich zum oxidativen Stress (Boeckmann et al. 2020). Im Fall des Plasmajets handelt es sich primär um

Nekrose, was durch die erhöhte LDH-Ausschüttung verdeutlicht und durch die histologischen Befunde belegt wird. Im Gegensatz zur Apoptose, wo es zu keiner spontanen Freisetzung des Zellinhaltes kommt, werden die Zellbestandteile bei Nekrose nach außen abgegeben und initiieren eine Entzündungsreaktion (D'Arcy 2019). Die Dunkelfärbung der Dermis bei geschädigten Hautmodellen ergibt sich somit durch die Färbung der Zellinhalte nekrotischer Zellen. Eine vergleichbare Schädigung der Hautmodelle wurde bereits an Hautmodellen bei hohem Leistungseinsatz beobachtet (Wiegand et al. 2016). Ein analoger Effekt auf Fibroblasten wurde durch Virard et. al anhand 2D-Kultur beschrieben. Hier erfolgte der Zelltod der eingesetzten Fibroblasten vorrangig durch Nekrose, hervorgerufen durch oxidativen Stress (Virard et al. 2015).

Eine gesteigerte Proliferation nach Plasmabehandlung konnte bei den schädlichen Parametern beobachtet werden. Ein Grund dafür könnte die Nekrose-bedingte pro-inflammatorische Reaktion sein, welche möglicherweise Regenerationsprozesse einschließlich der Proliferation von Zellen initiiert (Iyer et al. 2018).

Die Behandlung der Hautmodelle mit reinem Arbeitsgas zeigte beim Plasmajet histologisch keine Auffälligkeiten sowie keine Steigerung der Zellproliferation. Da bei der Behandlung mit dem Arbeitsgas, ohne Zündung des Plasmas, ebenfalls eine pro-inflammatorische Reaktion erfolgte, kann davon ausgegangen werden, dass die gesteigerte Proliferation der plasmabehandelten Hautmodelle vorrangig durch das Plasma und weniger durch die Nekrose-bedingte pro-inflammatorische Reaktion resultiert. Bei der Behandlung mit dem Arbeitsgas, ohne zünden des Plasmas, war die LDH-Ausschüttung ebenfalls stark erhöht. Es ist bekannt, dass lokalisierte Druckbehandlung zu Zellschädigung führen kann (Husain 1953). Die Laktatdehydrogenase, welche mittels LDH-Test nachgewiesen werden kann, wird auch in der Haut exprimiert. Besonders in der Epidermis ist die Konzentration im Vergleich zur Dermis erhöht (Uitto et al. 1972). Es kann daher angenommen werden, dass nur die oberen Schichten der Epidermis durch den Druck zur LDH-Ausschüttung aktiviert wurden.

Plasmabehandlung der 3D-Hautmodelle mit der DBD-Quelle führte zu keiner sichtbaren Schädigung der Hautmodelle. Lediglich eine erhöhte LDH-Ausschüttung konnte bei hoher Behandlungszeit verzeichnet werden.

Der Einfluss von KAP auf die Proliferation wurde in dieser Arbeit ebenfalls untersucht. Bei der DBD-Quelle war keine gesteigerte Proliferation bei intakter Hautbarriere ersichtlich. Die unterschiedliche Reaktion der Hautmodelle auf die beiden Plasmaquellen ist mit der Heterogenität der Geräte zu begründen. Generell ist die Wirkung des Plasmas stark abhängig von Gerätetyp,

Arbeitsgas, Behandlungsdauer, Leistung und Behandlungsabstand was insgesamt zu unterschiedlicher Zusammensetzung des Plasmas führen kann sowie der Konzentration der Plasmabestandteile (von Woedtke et al. 2019). Auch Xu et. al konnten Unterschied in der Wirkung von zwei verschiedenen Geräten feststellen. Hier zeigte sich, dass der Plasmajet toxischer auf die Zellen wirkte als das Oberflächen-Plasmagerät (Xu et al. 2021).

5.3. Expression und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine

Eine Entzündung entsteht häufig als Reaktion von Geweben auf schädliche Stimuli wie Krankheitserreger, Reizstoffe oder toxische Zellkomponenten. Dabei handelt es sich um ein komplexes Netzwerk von Wechselwirkungen, was zur Aktivierung von Immunzellen führt. Wichtige pro-inflammatorische Zytokine, die von Keratinozyten gebildet werden, sind unter anderem IL-1; IL-6, IL-8 sowie TNF α (Grone 2002). Zu der IL-1-Familie gehört IL-1 α , welches konstitutiv in der Haut exprimiert wird. Bindung von IL-1 α an den entsprechenden Rezeptor führt zur Signaltransduktion und Aktivierung der mitogen-aktivierten-Proteine-Kinase (MAPK) sowie des Transkriptionsfaktors NF κ B, was zur Expression von weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen führt (Turner et al. 2014). Eines dieser aktivierten Zytokine ist IL-6 (Boxman et al. 1996). Dieses pleiotrope Zytokin ist nicht nur an der Entzündung beteiligt, sondern auch an Hämatopoese, Differenzierung sowie Proliferation. Ein weiteres, von IL-1 α aktiviertes Chemokin ist IL-8. Dieses Interleukin ist ein kritischer Entzündungsmediator und ist für die Rekrutierung von Neutrophilen verantwortlich. TNF α spielt eine weitere zentrale Rolle bei der Entzündungsreaktion, indem es beispielsweise die Produktion anderer Zytokine bewirkt oder die Proliferation von Zellen anregt (Turner et al. 2014). Generell ist die Aktivierung von pro-inflammatorischen Zytokinen für eine Immunreaktion notwendig, eine dauerhafte Expressierung kann jedoch zur Gewebsschädigung führen (Harada et al. 1994). Dennoch spielen pro-inflammatorische Zytokine auch bei der Regeneration eine entscheidende Rolle (Barrientos et al. 2008).

Plasmabehandlung mit dem Plasmajet führte zur Sekretion sowie Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, unabhängig von dem Schädigungsgrad der Hautmodelle. Bei den Behandlungsparametern, welche histologische Veränderungen zeigten, ist die inflammatorische Reaktion auf die Schädigung der Zellen zurückzuführen, wobei der freigesetzte Zellinhalt eine pro-inflammatorische Reaktion hervorruft. Dadurch sollen beispielsweise Phagozyten rekrutiert werden, um Zelltrümmer zu entfernen und die Regeneration zu initiieren (Rock und Kono 2008). Die gesteigerte Proliferation bei den entsprechenden Parametern unterstützt diese Vermutung. Behandlung der Hautmodelle mit verträglichen Plasma-Parametern führte jedoch ebenfalls zur gesteigerten Expression und Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen,

aber keiner gesteigerten Proliferation, sodass davon auszugehen ist, dass es sich hierbei um einen stimulatorischen Effekt des Plasmas handeln könnte.

Inflammatorische Reaktionen von Zellen auf Plasmabehandlung sind in 2D-Kultur gut erforscht. Arndt et al. konnten zeigen, dass die Plasmabehandlung von Keratinozyten keinen negativen Einfluss auf die Viabilität hat, jedoch eine gesteigerte Expression von *IL8* zu beobachten ist (Arndt et al. 2015). Schmidt et al. wiederum konnten die Sekretion von IL-6 und IL-8 im Zusammenhang mit Apoptose beobachten (Schmidt et al. 2019). Auch bei Fibroblasten führt Plasmabehandlung zur Produktion von IL-6 sowie IL-8, ohne zum Zelltod zu führen (Bourdens et al. 2019). Eine Ursache für die pro-inflammatorische Reaktion auf die Plasmabehandlung sind die dort enthaltenen reaktiven Spezies. Diese haben nicht nur schädigende Wirkungen, sondern dienen unter bestimmten physiologischen Bedingungen als wichtige Signalmoleküle, beispielsweise für Zellwachstum oder Differenzierung (Sauer et al. 2001). Als Reaktion auf gesteigerte ROS-Konzentrationen erfolgt die Aktivierung des Inflammasoms, ein Multiprotein-komplex der Entzündungsreaktion. Dafür liegt als ROS-Sensor das Protein TXNIP und ein assoziiertes Protein im Zytosol gebunden vor. Durch eine erhöhte Konzentration an freien Radikalen dissoziiert der Proteinkomplex. Dies führt zur Bindung von TXNIP mit NLRP3. Dadurch werden die Pro-Caspase 1/12 sowie Asc rekrutiert und bilden das aktive Inflammasom. Daraus folgt die Spaltung von Pro-Interleukin-1 β und IL-18 durch das Inflammasom und deren anschließende Sekretion (Mittal et al. 2014).

Eine vergleichbare inflammatorische Reaktion der Hautmodelle auf die Plasmabehandlung bzw. ROS des Plasmas wäre auch bei dem Plasmajet im Falle der histologisch unauffälligen Parameter denkbar. Jedoch hatte sich hier eine deutlich erhöhte LDH-Freisetzung gezeigt. Daher wurde hier zusätzlich die Behandlung mit dem Arbeitsgas der Hautmodelle untersucht, ohne das Plasma zu zünden. Besonders die erhöhte Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine sowie die LDH-Freisetzung wies hier ein analoges Muster mit der Plasmabehandlung auf. Die Sekretion von IL-1 α war ebenfalls stark erhöht. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Expression und Sekretion der Zytokine vorrangig durch den Gasdruck des Arbeitsgases stimuliert werden. IL-1 α ist ein frühes Zytokin der Inflammation und wird in der Hornschicht gelagert, um bei Störung der Hautbarriere eine Entzündungsreaktion auszulösen (Hirao et al. 1996, Falcone et al. 2017). Es ist denkbar, dass durch den Druck die Integrität der Hornschicht gestört wird, sodass es zur Ausschüttung von IL-1 α kommt und weitere inflammatorische Reaktionen ausgelöst werden, da dieses Zytokin auch die Expression und Sekretion anderer Zytokine wie IL-6 und IL-8 stimulieren kann (Di Paolo und Shayakhmetov 2016).

Im Gegensatz zum Plasmajet führte die Plasmabehandlung mit der DBD-Quelle nur bei einer hohen Behandlungszeit zu einer leichten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine. Dies ist vorrangig auf den stimulatorischen Effekt des Plasmas zurückzuführen, da histologisch keine Schädigung ersichtlich war. Bei der Expression pro-inflammatorischer Zytokine sowie weiterer Gene war andererseits eine Beeinflussung der Genexpression zu beobachten. Dies kann auf die Plasmabestandteile zurückgeführt werden.

Der Einfluss von KAP auf Proteine ist in der Literatur bereits beschrieben. Besonders die im Plasma enthaltenen reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies können auf unterschiedliche Weise Proteinen beeinflussen. Dabei können reaktive Spezies die Aminosäuren der Proteine oxidieren und so deren Sekundär- und Tertiärstruktur ändern. Daraus können Funktionsverlust, Aggregation, aber auch eine Funktionssteigerung folgen (Tolouie et al. 2018, Takai et al. 2012, Takai et al. 2014, Lackmann et al. 2015). Zhang et. al konnten für die Laktat Dehydrogenase (LDH) einen vergleichbaren Effekt beschreiben. Durch langlebige Plasmabestandteile wie Ozon, Wasserstoffperoxid und Nitrat kommt es zur Oxidation von LDH und darauffolgend zur Aggregation, was durch die Abschirmung des aktiven Zentrums zum Funktionsverlust führt (Zhang et al. 2015). In der Literatur ist die Beeinflussung der Expression nach Plasmabehandlung vielfach gezeigt. Das gilt vor allem für die Plasmabehandlung von Tumorzellen. Hier werden häufig Gene für Überlebenssignale negativ reguliert, sodass Apoptose eintritt (Tabuchi et al. 2016, Ji et al. 2020). Für nicht tumorigene-Zellen wird beispielsweise eine Abnahme von Zelladhäsionsproteinen oder Matrixproteinen beschrieben (Shome 2020). Aufgrund dieser Beobachtungen der Literatur kann davon ausgegangen werden, dass das hier eingesetzte Plasma auch eine Reduktion der Genexpression herbeiführen kann. Dies scheint jedoch abhängig von der eingesetzten Plasmaquelle zu sein, da eine Beeinflussung nur deutlich bei der DBD-Quelle beobachtet wurde. Auf die Sekretion hatte dies keinen Einfluss. Dies kann verschiedene Gründe haben. Zum einen führt die Expression eines Genes nicht automatisch zu einer anschließenden Sekretion dieses Proteins. Bereits im mRNA-Stadium können beispielsweise microRNA zum Abbau von RNA führen (O'Brien et al. 2018). Auch Proteinmodifikationen wie Phosphorylierung oder Ubiquitinierung können das Schicksal von Proteinen verändern (Millar et al. 2019). Bei einigen Zytokinen ist für die Sekretion eine proteolytische Spaltung oder ein Signal notwendig (Nickel und Rabouille 2009). Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass der Einfluss auf die Sekretion zeitlich nicht mehr erfasst wurde, da die Reduktion der Genexpression meist 72h nach Behandlung stattfand.

5.4. Untersuchung des Regenerationspotentials

Die Regeneration ist der gezielte Ersatz eines Gewebes wie beispielsweise der oberflächlichen Epidermis oder Schleimhaut. An der Regeneration sind unterschiedliche Wachstumsfaktoren und Zytokine beteiligt (Reinke und Sorg 2012). FGF-2 ist bei dabei zuständig für die Re-epithelialisierung, Anregung der Migration und Proliferation von Zellen sowie der Stimulation von Fibroblasten. Während FGF-2 von Fibroblasten und Keratinozyten gebildet wird, wird FGF-7 nur in Keratinozyten produziert. Dieser Wachstumsfaktor ist für die Proliferation und Migration von Keratinozyten verantwortlich (Grazul-Bilska et al. 2003). Ein weiteres wichtiges Zytokin ist TGF β , welches die Funktionen von Keratinozyten, Fibroblasten, und Makrophagen reguliert und zur Initiation der Inflammation führt (Ramirez et al. 2014). Ki67 ist ein Protein, welches mit proliferierenden Zellen assoziiert ist. Es wird nur während der Zellteilung im Zellkern nachgewiesen und ist auch in der Diagnostik ein Marker für die Proliferation von Zellen, was für die Regeneration essentiell ist (Scholzen und Gerdes 2000).

Anhand von 2D-Zellkulturen konnten einige Arbeitsgruppen relevante Nachweise für den positiven Einfluss von KAP auf die Regeneration erbringen. Arndt et. al wiesen nach Plasmabehandlung die Expression sowie Sekretion regenerationsrelevanter Gene nach, darunter *IL8* und *FGF2* (Arndt et al. 2018b). Zudem wurde dieser Effekt anhand eines *in vivo* Mausmodells belegt (Arndt et al. 2013). Vergleichbare Ergebnisse erhielten auch Schmidt et. al anhand von Mausversuchen (Schmidt et al. 2017a). Auch mittels 2D-Migrationsassay konnte die verbesserte Migration und Proliferation von Zellen nach Plasmabehandlung gezeigt werden. Die Ursache dafür war der Einfluss des Plasmas auf die Proliferations-Signalwege (Lou et al. 2020). Schmidt et. al konnten zudem anhand von verschiedenen Plasmazusammensetzungen an Keratinozyten einen Einfluss auf Migration, Proliferation sowie Immunmodulation feststellen, was einen Einfluss auf die Regeneration haben kann (Schmidt et al. 2017b). Mittels humaner Hautbiopsien konnten Hasse et. al nach Plasmabehandlung histologisch eine gesteigerte Proliferation von basalen Keratinozyten zeigen (Hasse et al. 2016a). Zusammengefasst kann KAP unter bestimmten Bedingungen unterschiedliche Punkte der Regeneration unterstützen. Zum einen führt Plasmabehandlung zur Rekrutierung von Immunzellen. Zum anderen wird die Reepithelialisierung durch Ausschüttung von Zytokinen unterstützt. Weiterhin können Fibroblasten aktiviert werden, welche Matrix-Proteine produzieren. Zudem wird eine Neovaskularisierung gefördert. Die genauen Mechanismen sind bisher noch nicht bekannt. Jedoch werden den im Plasma enthaltenen reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies eine bedeutende Rolle zugesprochen (von Woedtke et al. 2019). Die wichtigsten Moleküle dabei sind Wasserstoffperoxid, Peroxinitrit und Stickstoffmonoxid. Reaktive Spezies sind in der Lage, kovalente Bindungen

zu formen. Ihre Limitation der räumlichen Verteilung liegt in der hohen Reaktivität. Daher sind in deren Signalweiterleitung oft Proteine involviert. Diese werden von den RONS oxidiert, besonders an Thiol-Gruppen der Aminosäure Cystein. Daraufhin werden Disulfidbrücken gebildet, die Proteinfaltung und Eigenschaften verändern. Es gibt zahlreiche Signalmoleküle, welche so von RONS aktiviert werden können, darunter auch Kinasen, Enzyme oder Zellzyklus-Faktoren. So können RONS die Regeneration, Inflammation, Angiogenese und Proliferation beeinflussen. Die Wirkung ist jedoch stark abhängig von Konzentration und Lokalisation. Der Vorteil der Plasmabehandlung ist dabei das kurzzeitige Einbringen dieser reaktiven Spezies durch ein und ausschalten des Gerätes (Graves 2012, Dunnill et al. 2017).

Die molekularen Mechanismen des Regenerationspotentials von Plasma im komplexen Zellverband sind bisher nur wenig erforscht. Daher wurde in dieser Arbeit auch die Reaktion regenerationsrelevanter Gene auf die Behandlung mit Plasma am 3D-Hautmodell untersucht.

Vergleichbar mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen, führte die Behandlung mittels Plasmajet zu einer signifikanten Steigerung regenerationsrelevanter Gene. Bei Plasma-Parametern, welche zu histologisch sichtbaren Änderungen führte, ist die Expressionssteigerung von Regenerationsmarkern eher auf die Schädigung als auf einen stimulatorischen Effekt des Plasmas zurückzuführen. Bei verträglichen Plasmaparametern war dagegen ebenfalls eine Expressionssteigerung der Regenerationsmarker, besonders bei *FGF2*, ersichtlich. Da das Arbeitsgas auf die Expression nur geringen Einfluss hatte, kann es sich hier um einen stimulatorischen Effekt auf die Genexpression durch das Plasma handeln. Jedoch wies vor allem die Sekretion von FGF-2 ein vergleichbares Muster mit der Plasmabehandlung auf. FGF-2 ist in der unverletzten Epidermis in geringen Mengen vorhanden (Adase et al. 2016, Meyer et al. 2017). Daher ist anzunehmen, dass durch eine Störung der Hautbarriere durch den Gasdruck des Arbeitsgases FGF-2 aus der Epidermis freigesetzt wird und somit in den Überstand gelangte. Daher kann angenommen werden, dass der Gasdruck des Plasmajets bei der Plasmabehandlung einen hohen Anteil am beobachteten Effekt hat.

Im Gegensatz zum Plasmajet war bei der Plasmabehandlung der Hautmodelle mit der DBD-Quelle kaum eine gesteigerte Expression von regenerationsrelevanten Genen zu beobachten. Zu späteren Zeitpunkten zeigte sich dazu eine Reduktion der Genexpression. Dies lässt sich mit der bereits erwähnten Beeinflussung des Plasmas von Proteinen erklären. Hier zeigt sich sehr deutlich, dass verschiedene Plasmaquellen an gleichen Geweben oder Zellen unterschiedliche Reaktionen hervorrufen können. Die Konzentrationen und Zusammensetzung der RONS ist abhängig von Gerätebauart und eingesetztem Arbeitsgas. Daraus können unterschiedliche Reaktionen der Zellen im Gewebe erfolgen (Privat-Maldonado et al. 2019).

5.5. Antimikrobielle Wirkung am 3D-Modell für kutane Candidose

Anhand eines kutanen Candidose-Modelles wurde die antimikrobielle Wirkung der Plasmabehandlung im komplexen Zellverband untersucht. Dafür wurden die Hautmodelle zunächst mit der Mikroorganismen-Suspension inkubiert und danach mit Plasma behandelt. Aufgrund von technischen Gründen wurde die antimikrobielle Wirksamkeit von Plasma am 3D-Hautmodell lediglich mittels der DBD-Quelle untersucht. Bei Anwendung des Plasmajets am kontaminierten Hautmodell würde durch den starken Gasdruck die Mikroorganismen-Suspension von den Hautmodellen gedrückt und dadurch den Überstand kontaminieren, was zu einer Verfälschung der Ergebnisse führt.

5.5.1. Verringerung des mikrobiellen Wachstums

C. albicans ist ein opportunistischer Krankheitserreger, der generell als harmloser Kommensale auch auf der Haut auftritt (Hube et al. 2015). Die Hefe ist dabei der häufigste Verursacher symptomatischer Hautinfektionen sowie einer der Hauptverursacher von nosokomialen Infektionen, welche häufig auch lebensbedrohlich werden können (Dantas et al. 2016). Die Bindung von *C. albicans* an das Gewebe erfolgt dabei über spezielle Adhäsine. Die Invasion in das Gewebe kann durch induzierte Endozytose erfolgen oder über aktive Penetration (Kuhbacher et al. 2017). Bei der induzierten Endozytose spielt die Interaktion vom fungalen Protein Als3 mit den Adhäsionsproteinen der Wirtszelle eine Rolle. Diese Interaktion ahmt die Bildung von Adhärenz-Verbindungen nach, was zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts und damit verbunden zu der Internalisierung der Pilzzellen führt (Phan et al. 2007). Da die Hornschicht der Haut eine schwer überwindbare Barriere darstellt, kann diese nur durch aktive Penetration überwunden werden. Dabei spielen neben, der durch Hyphenwachstum entstehenden, physikalischen Kraft auch molekulare Faktoren wie Proteasen für die Schädigung der Barriere eine wichtige Rolle. Verschiedene *C. albicans*-Stämme unterscheiden sich dabei in ihrer Invasivität. Bei dem hier verwendeten Stamm handelt es sich um ein invasiv wachsendes klinisches Isolat, welches sehr gut untersucht ist (Thewes et al. 2008).

In dieser Arbeit wurde ein Hautmodell für kutane Candidose etabliert, um die antimikrobielle Wirkung der Plasmabehandlung anwendungsnah zu untersuchen.

Die Bestimmung der Infektionslast von Gewebe kann generell durch unterschiedliche Tests wie Auszählung von koloniebildenden Einheiten, visueller Bestimmung, Farbstoffen oder PCR-Tests bestimmt werden. Die Zählung von koloniebildenden Einheiten wird am Hautmodell

durch die Hypheninvasion in das Gewebe erschwert. Durch die Homogenisierung mittels einer Kugelmühle kann eine Trennung erfolgen. Hier kann es einerseits durch die Fragmentierung der Hyphen zu verfälschten Ergebnissen kommen, da hierdurch entweder weniger lebensfähige Zellen entstehen, wenn es dabei zu einer Schädigung kommt. Andererseits ist bei intakten Zellen eine Überschätzung der Infektionslast durch die Fragmentierung der Hyphen möglich (Clemons und Stevens 2009). Allgemeine Viabilitätstests wie alamarBlue™, welche auf Farbstoffen beruhen (Repp et al. 2007), sind hier für den Infektionsnachweis ungeeignet, da die im Gewebe enthaltenen Zellen des Hautmodells diesen Farbstoff ebenfalls umsetzen. Das gilt auch für Tests wie BacTiter-Glo™, die auf der Bestimmung des ATP-Gehaltes beruhen (Kwolek-Mirek und Zadrag-Tecza 2014), was auch Bestandteil der Zellen des Hautmodells ist. Der PCR-Nachweis von bestimmten Genen, die typisch für einen Mikroorganismus sind, ist eine moderne und wirkungsvolle Methode, um das Vorhandensein von Pathogenen nachzuweisen. Aufgrund der multinuklearen Eigenschaften der Hyphen kann es bei einer PCR-Quantifizierung zur Überschätzung der Infektion kommen (Clemons und Stevens 2009). Daher wurden in dieser Arbeit neben der visuellen Betrachtung eine graphische Quantifizierung des Hyphenwachstums sowie ein fluoreszenzbasierter Nachweis der Infektion verwendet. Hier erfolgte die Färbung der fungalen Zellwand und die Quantifizierung mittels Software. Die fluoreszenzbasierte Echtzeit-Betrachtung erfolgte über die Sichtbarmachung der Auto-Fluoreszenz von Mikroorganismen durch violettes Licht (405 nm). Die Limitation bei dieser Methode ist jedoch eine zu geringe Zellzahl der Mikroorganismen, welche in diesem Fall nicht erfasst werden kann (Rennie et al. 2019).

Über die Reduzierung der Autofluoreszenz von *C. albicans* wurde ein Rückgang der Infektion auf den Hautmodellen beobachtet. Mittels HE- und PAS-Färbung konnten sowohl die Viabilität der Hautmodelle als auch die Ausbreitung der *Candida*-Infektion bewertet werden. Ein starkes Durchwachsen des Hautmodells mit Hyphen konnte ohne Behandlung 48h nach Infektion beobachtet werden, was zur Schädigung der Zellen führte. Mit steigender Plasmabehandlungszeit zeigte sich ein deutlicher Rückgang der Infektion, wobei bei der höchsten Behandlungszeit kein *Candida*-Wachstum im Behandlungsbereich mehr nachweisbar war.

Die Inaktivierung von *C. albicans* mittels Plasma wurde in der Literatur bisher meist über die Kultivierung auf Agar- oder Plastikoberflächen untersucht (Kostov et al. 2015, Rahimi-Verki et al. 2016, Leite et al. 2021). *In vivo* Versuche mittels Plasmajet am Mausmodell zeigten einen deutlichen Rückgang des Hyphenwachstums im Vergleich zu einem Antimykotikum (Borges et al. 2018). Die Ergebnisse lassen sich jedoch nur bedingt auf die humane Haut übertragen, da

sie sich u.a. morphologisch und immunologisch unterscheiden (Wong et al. 2011). Untersuchungen am humanen 3D-Modell sind bisher nicht beschrieben.

Zusammen mit den Ergebnissen des Agar-Testes ist in dieser Arbeit davon auszugehen, dass die verminderte Hyphenaktivität vor allem über eine Inaktivierung durch das entstandene Ozon sowie weiterer reaktiver Spezies vermittelt wird. Diese können auch die Virulenz von *C. albicans* beeinflussen. Durch Plasmabehandlung kann zudem die Adhärenz von *Candida* vermindert sowie der Übergang von Hefe zu Hyphe reduziert werden (Borges et al. 2017). Weiterhin ist bekannt, dass Plasma durch Eingriff in die Ergosterol-Biosynthese das Wachstum hemmen kann. Auch hier ist das Ergebnis abhängig von Geräteart, Arbeitsgas, Behandlungszeit etc. (Rahimi-Verki et al. 2016). Die Betrachtung der Zytotoxizität mittels LDH-Ausschüttung weist zwar eine stark signifikante Reduktion bei hoher Plasmabehandlungszeit auf, ist jedoch im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle immer noch deutlich erhöht. Dies ist durch das Wachstum von *C. albicans* am Rand des Hautmodells zu erklären. Bei diesem Plasmagerät handelt es sich um einen Prototyp, welcher speziell für die Testung in 48-Well-Platten hergestellt wurde. Für eine effektive Behandlung ist die räumliche Nähe des Gerätes zur Probe notwendig (Fischer et al. 2017). Die Hautmodelle für die Infektion müssen dagegen in speziellen Inserts kultiviert werden. Die Fläche des Plasmachips, an dem das Plasma entsteht, bedeckt die Fläche des Inserts nicht vollständig. Daher kam nicht die gesamte Fläche des Hautmodells mit dem Plasma in Kontakt. Die *Candida*-Zellsuspension dagegen diffundierte über das komplette Hautmodell. Aufgrund der begrenzten Fläche des Inserts konnte auch kein Versetzen der Plasmaquelle erfolgen um diesen Effekt auszugleichen. Anderenfalls würde eine Mehrfachbehandlung des infizierten Modells erfolgen und die Ergebnisse verfälschen.

5.5.2. Expression und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine

Die Anwesenheit von Pathogenen wird durch spezielle „*Pattern Recognition Receptors*“ (PRR) erkannt. Durch Bindung von Zellkomponenten wie DNA, Zellwandbestandteilen oder RNA werden die Rezeptoren aktiviert (Takeuchi und Akira 2010, Patin et al. 2019). Epithelzellen reagieren auf die Kolonisierung von *C. albicans* unter anderem mit einem TLR-4-abhängigen Mechanismus, was zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB führt. Daraus folgt u.a. die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine (Netea et al. 2015).

IL-1α ist eines der ersten Zytokine, welches bei einer Infektion durch Keratinozyten produziert und sekretiert wird. Besonders in den Keratinozyten des Stratum corneum sind große Mengen an IL-1α gelagert, um bei Infektion eine schnelle Inflammation und Immunantwort zu generieren (Hauser et al. 1986). Im Gewebe wird es dazu konstitutiv exprimiert, kann aber durch stress-

assoziierte Stimuli gesteigert werden (Di Paolo und Shayakhmetov 2016). Durch Bindungen an den entsprechenden Rezeptor erfolgt die Signalweiterleitung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B, was die Produktion anderer pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-8 und TNF α initiiert (Kuhbacher et al. 2017).

Die Infektion der Hautmodelle mit *C. albicans* führte in dieser Arbeit ohne Behandlung zu einer deutlich gesteigerten Expression von *IL1A*. Diese ist bereits 24h nach Infektion bei kaum sichtbarer Hyphenbildung in den histologischen Schnitten ersichtlich, was die Erkennung der fungalen Infektion bestätigt. Nachfolgend werden auch andere pro-inflammatorische Zytokine aktiviert, die der Immunantwort dienen. IL-6 ist ein Mediator der Inflammation und aktiviert die Akutphase-Reaktion und führt zur Aktivierung von Neutrophilen (van Enkevort et al. 1999). IL-8 ist dabei für die Rekrutierung von Neutrophilen zum Infektionsherd zuständig (Dongari-Bagtzoglou und Kashleva 2003). Auch TNF α wird bei Infektion ausgeschüttet und stimuliert die Expression von Chemokinen sowie die Rekrutierung von Immunzellen (Filler et al. 2005). IL-23 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches u.a. die Expression von anderen Zytokinen steuert und indirekt die Produktion von antimikrobiellen Peptiden beeinflusst (Yannam et al. 2012, Nur et al. 2019, Thompson und Orr 2018).

Nach Plasmabehandlung der infizierten Hautmodelle fand eine Reduktion der Expression sowie Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine statt. Bei den hier durchgeführten Versuchen ging die Verringerung der Zytokin-Expression sowie Sekretion einher mit der histologisch beobachteten Abnahme des Hyphenwachstums. Obwohl die Versuche zeigten, dass das Plasma der DBD-Quelle eine inhibitorische Wirkung auf die Expression einiger Gene hat, kann angenommen werden, dass der Rückgang der Expression durch die Inaktivierung von *C. albicans* erfolgte. Das beweist auch die verminderte Sekretion der Zytokine nach Plasmabehandlung der infizierten Hautmodelle, was bei der alleinigen Plasmabehandlung nicht der Fall war. Kitsin et al konnten anhand eines kutanen Candidose-Modells nach Behandlung durch ein Antimykotikum den Rückgang des Wachstums von *C. albicans* beobachten sowie eine verringerte Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen (Kitsin et al. 2020). Daten über die Expression und Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen an infizierten humanen Zellen oder Geweben und Plasmabehandlung sind in der Literatur noch nicht vorhanden und können an dieser Stelle nicht als Vergleich erörtert werden.

5.5.3. Expression antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMP's) stellen die erste Verteidigungslinie der humoralen Immunantwort bei invasiven Mikroorganismen dar. Es sind Effektor-Moleküle, welche eine direkte antimikrobielle Funktion besitzen, indem sie mit mikrobiellen Membranen oder mit interzellulären Zielen interagieren und so das Wachstum oder die Viabilität der Pathogene stören. AMP's werden durch Epithelzellen entweder konstitutiv exprimiert oder bei Kontakt mit dem Pathogen. Dabei erfolgt die Initiierung durch „*Pattern Recognition Receptors*“ (PRR) wie den „*Toll-like-Receptors*“ (TLR). Epithelzellen haben Mechanismen entwickelt, um die kommensale *C. albicans* von der invasiv wachsenden zu unterscheiden. Dabei löst das Hyphenwachstum die Produktion und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-8 sowie TNF α aus. Diese Zytokine sind wiederum relevant für die Herstellung verschiedener AMP's (Prasad 2017).

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen führte das invasive Wachstum von *C. albicans* nachweislich zur Expression und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine und damit verbunden auch zur Expression von AMP's. Humanes beta Defensin-2 (hBD-2) wird von Keratinozyten der Epidermis produziert und ist auch in der gesunden Haut vorhanden. Die Expression wird dabei unter anderem durch IL-1 α sowie TNF α induziert. Die antimikrobielle Wirkung erfolgt über elektrostatische Interaktion mit der negativ geladenen Membran von Mikroorganismen. Daneben sind noch chemotaktische Wirkungen für Immunzellen bekannt (Silva et al. 2014, Pazgier et al. 2006). Anhand der hier dargestellten Ergebnisse zeigte sich eine frühe Expressionssteigerung von *HBD2* nach Infektion mit *C. albicans*. Diese wurden folglich durch das Hyphenwachstum und damit verbundene pro-inflammatorische Reaktion ausgelöst. In einer Arbeit mit 3D-Modellen wurde die Infektion von Dermatophyten untersucht. Dabei konnte ebenfalls eine gesteigerte Expression von *HBD2* aufgezeigt werden. Auch die Behandlung der infizierten Modelle führten, wie in dieser Arbeit, zur signifikanten Verringerung der Expression (Hesse-Macabata 2019).

S100A7, auch Psoriasin genannt, wird ebenfalls konstitutiv in der Haut exprimiert und bei Inflammation oder Infektion vervielfacht. Neben der Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und der chemotaktischen Eigenschaften wirkt es bei *C. albicans* als Zink-Binder und löst somit den Zelltod aus. Zudem erschwert es die Bindung von *C. albicans* durch die Interaktion mit β -Glucan (Zackular et al. 2015, Brauner et al. 2018). Die Expression von *S100A7* wird besonders von IL-1 induziert (Bhatt et al. 2019), welches auch in dieser Arbeit als Reaktion auf die Invasion von *C. albicans* exprimiert sowie sekretiert wurde. Eine Steigerung der *S100A7*-Expression nach der Infektion von Hautmodellen mit einem Dermatophyten führten ebenfalls

zu erhöhten Werten dieses AMP's. Dies konnte durch eine antimikrobielle Behandlung reduziert werden (Hesse-Macabata 2019). Auch bei den hier durchgeführten Untersuchungen konnte mittels Plasmabehandlung die Expression von *SI00A7* signifikant reduziert werden, was mit dem Rückgang des Hyphenwachstums einhergeht.

Ein weiteres antimikrobiell wirksames Protein ist die RNase7, welches die dominante RNase der Haut darstellt. Diese Ribonuklease wird konstitutiv exprimiert, kann jedoch auch durch pro-inflammatorische Zytokine oder Mikroorganismen induziert werden. Bei *C. albicans* führt sie zur Spaltung von RNA und zur Lyse der Zellen (Salazar et al. 2016, Rademacher et al. 2016). Vergleichbar mit den anderen AMP's führte die Infektion der Hautmodelle in dieser Arbeit zu einem deutlichen Anstieg der Expression von *RNASE7*, induziert durch das pro-inflammatorische Milieu sowie das invasive Wachstum der Hefe. Eine Reduktion der Expression von *RNASE7* konnte nachweisbar durch die Plasmabehandlung erfolgen. Einen Rückgang der hier untersuchten antimikrobiellen Peptide nach antimikrobieller Behandlung konnte auch bei anderen Arbeiten beobachtet werden. Dort wurde die Expression der antimikrobiellen Peptide nach Infektion eines Hautmodells mit *T. benhamiae* nachgewiesen. Mit Rückgang der Infektion nach antimikrobieller Behandlung war ebenfalls die Verringerung der AMP-Expression zu beobachten (Hesse-Macabata 2019). Vergleichbare Untersuchungen in der Literatur sind für antimikrobielle Peptide in Verbindung mit der Plasmabehandlung von infizierten Zellen oder Hautmodellen bisher noch nicht bekannt. Lediglich die Aktivierung von hBD-2 durch reine Plasmabehandlung von nicht-infizierten Zellen wurde nachgewiesen (Arndt et al. 2015).

Zusammenfassend sind diese Ergebnisse konform mit dem Rückgang des histologisch nachgewiesenen Hyphenwachstumes von *C. albicans*. Auffällig zeigte sich jedoch der teilweise nur leicht signifikante Rückgang der Expression der AMP's. Dies ist mit der Tatsache zu begründen, dass an den Randbereichen des Hautmodells, wo das Plasma nicht hinreicht, noch Hyphenwachstum stattfand, was eine Immunreaktion bewirkt. Die Plasmaquelle ist zwar auf die Behandlung der Hautmodelle mittels Abstandsmesser auf die Inserts angepasst, jedoch füllt der Plasmachip nicht die gesamte Fläche des Inserts aus.

6. Schlussfolgerungen

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der Biokompatibilität sowie antimikrobielle Wirkung von zwei verschiedenen Plasmaquellen. Die Bewertung der beiden Plasmaquellen erfolgte zunächst anhand von 2D-Versuchen, welche einen ersten Einblick in die Verträglichkeit lieferten. Dabei zeigte sich eine sehr geringe Zellverträglichkeit beider Plasmageräte. Da 2D-Versuche nur unzureichende Aussagen für die Übertragung auf *in vivo* Systeme liefern, wurden die Versuche auf ein 3D-Hautmodell übertragen. Ziel war es, mittels verschiedener histologischer und molekularbiologischer Tests eine anwendungsnahe Untersuchung der Plasmaquellen durchzuführen.

Der Plasmajet wies für geringe Leistungen bzw. Behandlungszeiten eine gute Biokompatibilität auf. Eine Erhöhung der Leistung oder Behandlungszeit führte zur Schädigung des Gewebes. Unabhängig vom Schädigungsgrad konnte eine gesteigerte Expression und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen beobachtet werden. Ein scheinbar positiver Effekt bei den verträglichen Parametern zeigte sich bei der Expression und Sekretion von Markern des Regenerationspotentials. Bei histologisch unauffälligen Parametern kann dies auf eine verbesserte Regenerationsfähigkeit der Haut hindeuten, was für eine künftige therapeutische Wirkung, beispielsweise in der Wundbehandlung, von Bedeutung sein kann. Dieser Effekt konnte auch zum Teil bei der Behandlung mit dem Arbeitsgas, ohne Zünden des Plasmas, beobachtet werden. Es zeigte sich bei der Plasmabehandlung weiterhin eine sehr gute antimikrobielle Wirkung, welche abhängig vom eingesetzten Arbeitsgas und der Leistung war. Für die Anwendung am Patienten ist der Plasmajet bisher ungeeignet. Dafür müssten an der Anlage noch Verbesserungen durchgeführt werden, wie eine Verminderung des Gasdruckes, was jedoch Einfluss auf die Plasmazusammensetzung und Temperatur haben könnte. Weiterhin wäre eine Miniaturisierung für die klinische Anwendung von Vorteil. Der Hersteller war jedoch an einer Optimierung der Plasmaquelle nicht interessiert. Das derzeitige Anwendungsfeld für diese Plasmaquelle begrenzt sich daher auf die Dekontamination von hitzeempfindlichen Oberflächen und Medizinprodukten oder deren Oberflächenbehandlung. Aus diesem Grund erfolgten die weitergehenden Untersuchungen ausschließlich an der DBD-Quelle.

Im Gegensatz zum Plasmajet wies die DBD-Quelle bei allen Parametern eine sehr gute Biokompatibilität auf. Auf kontaminierten Agaroberflächen war eine antimikrobielle Wirkung schon bei geringen Behandlungszeiten erkennbar. Gegenüber den Biofilmen klinisch relevanter Mikroorganismen zeigte sich eine deutlich höhere Resilienz mit Ausnahme von *P. aeruginosa*.

Für die Inaktivierung von Biofilmen auf Oberflächen oder Medizinprodukten wie Kathetern eignet sich die DBD-Quelle mit den untersuchten Parametern daher nur bedingt.

Eine deutliche Expression und Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Markern für das Regenerationspotential war nach Behandlung mit der DBD-Quelle nicht ersichtlich. Daher ist anhand dieser Untersuchungen eine verbesserte Hautregeneration nicht zu erwarten. Jedoch zeigte sich bei vielen der untersuchten Zytokine ein Rückgang der Expression. Dies könnte beispielsweise bei der Behandlung von entzündlichen Hauterkrankungen wie Psoriasis oder atopischer Dermatitis einen therapeutischen Effekt erzielen.

Ein weiterer Schwerpunkt war die anwendungsnahe Erforschung der antimikrobiellen Wirkung des Plasmas am 3D-Infektionsmodell. Dafür wurde ein Modell für kutane Candidose etabliert, anhand dessen die molekularen Interaktionen zwischen Infektion und Plasmabehandlung analysiert werden sollten.

Das Infektionsmodell reagierte auf die Besiedlung mit *C. albicans*, mit der Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen sowie antimikrobiellen Peptiden. Durch die Anwendung der DBD-Quelle konnte erstmals die erfolgreiche antimykotische Behandlung von KAP am 3D-Hautmodell belegt werden. Dies war charakterisiert durch einen Rückgang des Hyphenwachstums sowie der Reduktion der Expression sowie Sekretion von Infektionsmarkern. Diese Plasmaquelle als Prototyp hat somit zukünftig ein hohes Potential, zunächst für die antimikrobielle Dekontamination der Haut. Untersuchungen für die Verwendung des Plasmagerätes am Patienten werden in Zukunft noch erfolgen.

Mit dieser Arbeit sollte zudem festgestellt werden, ob 3D-Hautmodelle für die Etablierung und Überprüfung von Plasmageräten geeignet sind. Es konnte gezeigt werden, dass die Hautmodelle auf äußere Reize wie z.B. Gasdruck, Plasmabehandlung und Infektion, in unterschiedlichem Umfang ansprechen. Besonders auf die Infektion reagierten die Hautmodelle mit der Expression und Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen sowie der Expression von antimikrobiellen Peptiden, vergleichbar zu einer *in vivo* Reaktion. Zudem konnten die Plasmaeffekte experimenteller Studien aus der Literatur am 3D-Hautmodell nachgewiesen werden. Diese umfassen die Expression und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine sowie Markern des Regenerationspotentials. Diese Effekte waren abhängig von der Art der Plasmaquelle. Durch einen vergleichbaren Aufbau zu Haut erlauben 3D-Hautmodelle eine anwendungsnahe Erforschung. Dennoch gibt es hier Limitationen, wie beispielsweise das Fehlen eines komplexen Immunsystems, Blutgefäßsystems oder Hautanhangsorganen, was einen Einfluss auf den zu beobachteten Effekt haben könnte. Zudem gestalten sich Einzelzellanalysen im Gegensatz zur 2D-Kultur sehr

schwierig. Die Problematik besteht hier die Zellen aus dem Gewebsverband zu lösen ohne diese zu schädigen oder anderweitig zu beeinflussen.

Diese Arbeit gibt besonders im Zusammenhang von Plasma und Infektion einen ersten Einblick in die komplexe Interaktion im Gewebe. Obwohl in der Plasmamedizin bereits sehr viel untersucht wurde, befindet sich die Forschung noch am Anfang. Einige Wirkungsweisen des Plasmas und dessen Bestandteile sind noch unbekannt und können durch intensive Forschung bald aufgeklärt werden. Besonders die Interaktion von Plasma mit komplexen Geweben sollte weiter erforscht werden. Die Erkenntnisse dieser Arbeit können die zukünftige Forschung maßgeblich unterstützen.

III LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

Ackermann K, Borgia SL, Korting HC, Mewes KR, Schafer-Korting M. 2010. The Phenion (R) Full-Thickness Skin Model for Percutaneous Absorption Testing. *Skin Pharmacology and Physiology*, 23 (2):105-112.

Adase CA, Borkowski AW, Zhang LJ, Williams MR, Sato E, Sanford JA, Gallo RL. 2016. Non-coding Double-stranded RNA and Antimicrobial Peptide LL-37 Induce Growth Factor Expression from Keratinocytes and Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 291 (22):11635-11646.

Ahlfeld B, Li YF, Boulaaba A, Binder A, Schotte U, Zimmermann JL, Morfill G, Klein G. 2015. Inactivation of a Foodborne Norovirus Outbreak Strain with Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma. *Mbio*, 6 (1).

Aman BS, Taj MK, Samreen Z, Hussain A, Taj I, Azam S, Ali SA, Khan S, Jomezai S, Javed B. 2020. Skin infection risk factors and its management. *J Bio & Env Sci*, 16 (1):117-133.

Arndt S, Schmidt A, Karrer S, von Woedtke T. 2018a. Comparing two different plasma devices kINPen and Adtec SteriPlas regarding their molecular and cellular effects on wound healing. *Clinical Plasma Medicine*, 9:24-33.

Arndt S, Unger P, Berneburg M, Bosserhoff AK, Karrer S. 2018b. Cold atmospheric plasma (CAP) activates angiogenesis-related molecules in skin keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells and improves wound angiogenesis in an autocrine and paracrine mode. *Journal of Dermatological Science*, 89 (2):181-190.

Arndt S, Landthaler M, Zimmermann JL, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Li YF, Morfill GE, Bosserhoff AK, Karrer S. 2015. Effects of cold atmospheric plasma (CAP) on ss-defensins, inflammatory cytokines, and apoptosis-related molecules in keratinocytes in vitro and in vivo. *PLoS One*, 10 (3):e0120041.

Arndt S, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Heinlin J, Li YF, Thomas HM, Morfill GE, Zimmermann JL, Bosserhoff AK, Karrer S. 2013. Cold Atmospheric Plasma (CAP) Changes Gene Expression of Key Molecules of the Wound Healing Machinery and Improves Wound Healing In Vitro and In Vivo. *Plos One*, 8 (11).

- Auten RL, Davis JM. 2009. Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Species: The Devil Is in the Details. *Pediatric Research*, 66 (2):121-127.
- Bardos L, Barankova H. 2010. Cold atmospheric plasma: Sources, processes, and applications. *Thin Solid Films*, 518 (23):6705-6713.
- Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16 (5):585-601.
- Bayata S, Ermertcan AT. 2012. Thermotherapy in dermatology. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 31 (3):235-240.
- Bhatt T, Bhosale A, Bajantri B, Mathapathi MS, Rizvi A, Scita G, Majumdar A, Jamora C. 2019. Sustained Secretion of the Antimicrobial Peptide S100A7 Is Dependent on the Downregulation of Caspase-8. *Cell Reports*, 29 (9):2546-+.
- Bink A, Vandenbosch D, Coenye T, Nelis H, Cammue BPA, Thevissen K. 2011. Superoxide Dismutases Are Involved in *Candida albicans* Biofilm Persistence against Miconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55 (9):4033-4037.
- Boeckmann L, Schafer M, Bernhardt T, Semmler ML, Jung O, Ojak G, Fischer T, Peters K, Nebe B, Muller-Hilke B, Seebauer C, Bekeschus S, Emmert S. 2020. Cold Atmospheric Pressure Plasma in Wound Healing and Cancer Treatment. *Applied Sciences-Basel*, 10 (19).
- Boehm D, Bourke P. 2019. Safety implications of plasma-induced effects in living cells - a review of in vitro and in vivo findings. *Biological Chemistry*, 400 (1):3-17.
- Borges AC, Lima GDG, Nishime TMC, Gontijo AVL, Kostov KG, Koga-Ito CY. 2018. Amplitude-modulated cold atmospheric pressure plasma jet for treatment of oral candidiasis: In vivo study. *Plos One*, 13 (6).
- Borges AC, Nishime TMC, Kostov KG, Lima GDG, Gontijo AVL, de Carvalho JNMM, Honda RY, Koga-Ito CY. 2017. Cold atmospheric pressure plasma jet modulates *Candida albicans* virulence traits. *Clinical Plasma Medicine*, 7-8:9-15.
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. 1988. Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell-Line. *Journal of Cell Biology*, 106 (3):761-771.

- Bourdens M, Jeanson Y, Taurand M, Juin N, Carriere A, Clement F, Casteilla L, Bulteau AL, Planat-Benard V. 2019. Short exposure to cold atmospheric plasma induces senescence in human skin fibroblasts and adipose mesenchymal stromal cells. *Scientific Reports*, 9.
- Bourke P, Ziuzina D, Han L, Cullen PJ, Gilmore BF. 2017. Microbiological interactions with cold plasma. *Journal of Applied Microbiology*, 123 (2):308-324.
- Boxman ILA, Ruwhof C, Boerman OC, Lowik CWGM, Ponc M. 1996. Role of fibroblasts in the regulation of proinflammatory interleukin IL-1, IL-6 and IL-8 levels induced by keratinocyte-derived IL-1. *Archives of Dermatological Research*, 288 (7):391-398.
- Brany D, Dvorska D, Halasova E, Skovierova H. 2020. Cold Atmospheric Plasma: A Powerful Tool for Modern Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (8).
- Brauner A, Alvendal C, Chromek M, Stopsack K, Ehrstrom S, Schroder JM, Bohm-Starke N. 2018. Psoriasin, a novel anti-Candida albicans adhesin. *Journal of Molecular Medicine-Jmm*, 96 (6):537-545.
- Brehmer F, Haenssle HA, Daeschlein G, Ahmed R, Pfeiffer S, Gorlitz A, Simon D, Schon MP, Wandke D, Emmert S. 2015. Alleviation of chronic venous leg ulcers with a hand-held dielectric barrier discharge plasma generator (PlasmaDerm (R) VU-2010): results of a monocentric, two-armed, open, prospective, randomized and controlled trial (NCT01415622). *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 29 (1):148-155.
- Brenner M, Hearing VJ. 2008. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochemistry and Photobiology*, 84 (3):539-549.
- Brohem CA, Cardeal LBD, Tiago M, Soengas MS, Barros SBD, Maria-Engler SS. 2011. Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 24 (1):35-50.
- Brun P, Pathak S, Castagliuolo I, Palu G, Brun P, Zuin M, Cavazzana R, Martines E. 2014. Helium Generated Cold Plasma Finely Regulates Activation of Human Fibroblast-Like Primary Cells. *Plos One*, 9 (8).
- Bulson JM, Liveris D, Derkatch I, Friedman G, Geliebter J, Park S, Singh S, Zemel M, Tiwari RK. 2020. Non-thermal atmospheric plasma treatment of onychomycosis in an in vitro human nail model. *Mycoses*, 63 (2):225-232.

- Canullo L, Genova T, Wang HL, Carossa S, Mussano F. 2017. Plasma of Argon Increases Cell Attachment and Bacterial Decontamination on Different Implant Surfaces. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 32 (6):1315-1323.
- Chen Z, Garcia G, Arumugaswami V, Wirz RE. 2020. Cold atmospheric plasma for SARS-CoV-2 inactivation. *Physics of Fluids*, 32 (11).
- Clemons KV, Stevens DA. 2009. Conventional or molecular measurement of *Aspergillus* load (vol 47, pg S132, 2009). *Medical Mycology*, 47 (6):669-669.
- Colquhoun JM, Rather PN. 2020. Insights Into Mechanisms of Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* and Implications for Uropathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10.
- Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG. 2020. *Candida albicans* Antifungal Resistance and Tolerance in Bloodstream Infections: The Triad Yeast-Host-Antifungal. *Microorganisms*, 8 (2).
- D'Arcy MS. 2019. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43 (6):582-592.
- Dahlman D, Hakansson A, Kral AH, Wenger L, Ball EL, Novak SP. 2017. Behavioral characteristics and injection practices associated with skin and soft tissue infections among people who inject drugs: A community-based observational study. *Substance Abuse*, 38 (1):105-112.
- Dale Wilson B, Moon S, Armstrong F. 2012. Comprehensive review of ultraviolet radiation and the current status on sunscreens. *J Clin Aesthet Dermatol*, 5 (9):18-23.
- Dantas AD, Lee KK, Raziunaite I, Schaefer K, Wagener J, Yadav B, Gow NAR. 2016. Cell biology of *Candida albicans*-host interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 34:111-118.
- Del Rosso JQ, Levin J. 2011. The Clinical Relevance of Maintaining the Functional Integrity of the Stratum Corneum in both Healthy and Disease-affected Skin. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 4 (9).
- Deng XT, Shi JJ, Kong MG. 2006. Physical mechanisms of inactivation of *Bacillus subtilis* spores using cold atmospheric plasmas. *Ieee Transactions on Plasma Science*, 34 (4):1310-1316.

Deva AK, Adams WP, Vickery K. 2013. The Role of Bacterial Biofilms in Device-Associated Infection. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 132 (5):1319-1328.

Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. 2016. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

Di Paolo NC, Shayakhmetov DM. 2016. Interleukin 1alpha and the inflammatory process. *Nat Immunol*, 17 (8):906-913.

Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H. 2003. *Candida albicans* triggers interleukin-8 secretion by oral epithelial cells. *Microb Pathog*, 34 (4):169-177.

Duan JW, Ma MY, Yusupov M, Cordeiro RM, Lu XP, Bogaerts A. 2020. The penetration of reactive oxygen and nitrogen species across the stratum corneum. *Plasma Processes and Polymers*, 17 (10).

Dubuc A, Monsarrat P, Virard F, Merbahi N, Sarrette JP, Laurencin-Dalichieux S, Cousty S. 2018. Use of cold-atmospheric plasma in oncology: a concise systematic review. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 10:1-12.

Dunnill C, Patton T, Brennan J, Barrett J, Dryden M, Cooke J, Leaper D, Georgopoulos NT. 2017. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International Wound Journal*, 14 (1):89-96.

Duske K, Koban I, Kindel E, Schroder K, Nebe B, Holtfreter B, Jablonowski L, Weltmann KD, Kocher T. 2012. Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals. *Journal of Clinical Periodontology*, 39 (4):400-407.

Duske K, Jablonowski L, Koban I, Matthes R, Holtfreter B, Sckell A, Nebe JB, von Woedtke T, Weltmann KD, Kocher T. 2015. Cold atmospheric plasma in combination with mechanical treatment improves osteoblast growth on biofilm covered titanium discs. *Biomaterials*, 52:327-334.

Eze EC, Chenia HY, El Zowalaty ME. 2018. *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. *Infection and Drug Resistance*, 11:2277-2299.

- Fahmide F, Ehsani P, Atyabi M. 2021. Time-dependent behavior of the *Staphylococcus aureus* biofilm following exposure to cold atmospheric pressure plasma. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 24 (6):744-751.
- Falcone D, Spee P, van de Kerkhof PCM, van Erp PEJ. 2017. Minimally-invasive Sampling of Interleukin-1alpha and Interleukin-1 Receptor Antagonist from the Skin: A Systematic Review of In vivo Studies in Humans. *Acta Derm Venereol*, 97 (9):1066-1073.
- Fernandez A, Noriega E, Thompson A. 2013. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on fresh produce by cold atmospheric gas plasma technology. *Food Microbiology*, 33 (1):24-29.
- Filipic A, Gutierrez-Aguirre I, Primc G, Mozetic M, Dobnik D. 2020. Cold Plasma, a New Hope in the Field of Virus Inactivation. *Trends in Biotechnology*, 38 (11):1278-1291.
- Filler SG, Yeaman MR, Sheppard DC. 2005. Tumor necrosis factor inhibition and invasive fungal infections. *Clin Infect Dis*, 41 Suppl 3:S208-212.
- Fink S. 2015. Analyse der Toxizität von antimikrobieller Behandlung mittels CAPs (cold atmospheric pressure plasma) – mit Hilfe eines 3D-Hautmodelles in vitro [Masterarbeit]. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Fink S, Sethmann A, Hipler UC, Wiegand C. 2022. In vitro investigation of the principle of action of ammonium bituminosulfonate ointments on a 3D skin model. *Eur J Pharm Sci*:106152.
- Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. 2008. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc*, 2008:pdb prot4986.
- Fischer M, Stubenrauch M, Naber A, Gutzeit N, Klett M, Singh S, Schober A, Witte H, Müller J. 2017. LTCC-based micro plasma source for the selective treatment of cell cultures Warsaw, Poland: Institute of Electrical and Electronics Engineers.
- Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14 (9):563-575.
- Flynn PB, Graham WG, Gilmore BF. 2019. *Acinetobacter baumannii* biofilm biomass mediates tolerance to cold plasma. *Letters in Applied Microbiology*, 68 (4):344-349.

Flynn PB, Higginbotham S, Alshraideh NH, Gorman SP, Graham WG, Gilmore BF. 2015. Bactericidal efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma (APNTP) against the ESKAPE pathogens. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46 (1):101-107.

Gambino M, Cappitelli F. 2016. Mini-review: Biofilm responses to oxidative stress. *Biofouling*, 32 (2):167-178.

Gastmeier P, Geffers C. 2008. [Nosocomial infections in Germany. What are the numbers, based on the estimates for 2006?]. *Dtsch Med Wochenschr*, 133 (21):1111-1115.

Gilmore BF, Flynn PB, O'Brien S, Hickok N, Freeman T, Bourke P. 2018. Cold Plasmas for Biofilm Control: Opportunities and Challenges. *Trends in Biotechnology*, 36 (6):627-638.

Graves DB. 2012. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 45 (26).

Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Bilski JJ, Redmer DA, Reynolds LP, Abdullah A, Abdullah KM. 2003. Wound healing: The role of growth factors. *Drugs of Today*, 39 (10):787-800.

Grone A. 2002. Keratinocytes and cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 88 (1-2):1-12.

Gulati M, Nobile CJ. 2016. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*, 18 (5):310-321.

Gulzar M, Zehra A. 2018. *Staphylococcus aureus*: A brief review. *International Journal of Veterinary Science and Research*, 4.

Gupta TT, Ayan H. 2019. Application of Non-Thermal Plasma on Biofilm: A Review. *Applied Sciences-Basel*, 9 (17).

Haertel B, von Woedtke T, Weltmann KD, Lindequist U. 2014. Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma Possible Application in Wound Healing. *Biomolecules & Therapeutics*, 22 (6):477-490.

Haertel B, Wende K, von Woedtke T, Weltmann KD, Lindequist U. 2011. Non-thermal atmospheric-pressure plasma can influence cell adhesion molecules on HaCaT-keratinocytes. *Experimental Dermatology*, 20 (3):282-284.

- Haertel B, Strassenburg S, Oehmigen K, Wende K, von Woedtke T, Lindequist U. 2013. Differential Influence of Components Resulting from Atmospheric-Pressure Plasma on Integrin Expression of Human HaCaT Keratinocytes. *Biomed Research International*, 2013.
- Han L, Patil S, Boehm D, Milosavljevic V, Cullen PJ, Bourke P. 2016. Mechanisms of Inactivation by High-Voltage Atmospheric Cold Plasma Differ for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*, 82 (2):450-458.
- Hans-Robert Metelmann TvW, Klaus-Dieter Weltmann 2016. *Plasmamedizin-Kaltplasma in der medizinischen Anwendung* Springer-Verlag.
- Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. 1994. Essential Involvement of Interleukin-8 (IL-8) in Acute-Inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 56 (5):559-564.
- Hasse S, Muller MC, Schallreuter KU, von Woedtke T. 2019. Stimulation of melanin synthesis in melanoma cells by cold plasma. *Biological Chemistry*, 400 (1):101-109.
- Hasse S, Meder T, Freund E, von Woedtke T, Bekeschus S. 2020. Plasma Treatment Limits Human Melanoma Spheroid Growth and Metastasis Independent of the Ambient Gas Composition. *Cancers*, 12 (9).
- Hasse S, Tran TD, Hahn O, Kindler S, Metelmann HR, von Woedtke T, Masur K. 2016a. Induction of proliferation of basal epidermal keratinocytes by cold atmospheric-pressure plasma. *Clinical and Experimental Dermatology*, 41 (2):202-209.
- Hasse S, Duong Tran T, Hahn O, Kindler S, Metelmann HR, von Woedtke T, Masur K. 2016b. Induction of proliferation of basal epidermal keratinocytes by cold atmospheric-pressure plasma. *Clin Exp Dermatol*, 41 (2):202-209.
- Hattori N, Yamada S, Torii K, Takeda S, Nakamura K, Tanaka H, Kajiyama H, Kanda M, Fujii T, Nakayama G, Sugimoto H, Koike M, Nomoto S, Fujiwara M, Mizuno M, Hori M, Kodera Y. 2015. Effectiveness of plasma treatment on pancreatic cancer cells. *International Journal of Oncology*, 47 (5):1655-1662.
- Hauser C, Saurat JH, Schmitt A, Jaunin F, Dayer JM. 1986. Interleukin-1 Is Present in Normal Human-Epidermis. *Journal of Immunology*, 136 (9):3317-3323.

He MW, Duan JW, Xu JL, Ma MY, Chai B, He GY, Gan L, Zhang S, Duan XR, Lu XP, Chen HX. 2020. *Candida albicans* biofilm inactivated by cold plasma treatment in vitro and in vivo. *Plasma Processes and Polymers*, 17 (4).

Heinlin J, Isbary G, Stolz W, Morfill G, Landthaler M, Shimizu T, Steffes B, Nosenko T, Zimmermann JL, Karrer S. 2011. Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25 (1):1-11.

Heinlin J, Maisch T, Zimmermann JL, Shimizu T, Holzmann T, Simon M, Heider J, Landthaler M, Morfill G, Karrer S. 2013. Contact-free inactivation of *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis* by cold atmospheric plasma treatment. *Future Microbiology*, 8 (9):1097-1106.

Hesse-Macabata J. 2019. Characterization of *Isatis Tinctoria* and *Isatis Tinctoria*-derived secondary metabolites in terms of biofunctionality and biocompatibility in different co-culture infection models Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

Hijnen WAM, Beerendonk EF, Medema GJ. 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Research*, 40 (1):3-22.

Hinkelmann M. 2018. In-vitro-Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit einer DBD-Plasma-Quelle (TU Ilmenau) [Dissertation]. Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Hirao T, Aoki H, Yoshida T, Sato Y, Kamoda H. 1996. Elevation of interleukin 1 receptor antagonist in the stratum corneum of sun-exposed and ultraviolet B-irradiated human skin. *J Invest Dermatol*, 106 (5):1102-1107.

Hobley L, Harkins C, MacPhee CE, Stanley-Wall NR. 2015. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *Fems Microbiology Reviews*, 39 (5):649-669.

Horn K, Beier O, Wiegand C, Laaouina A, Fink S, Pfuch A, Schimanski A, Gruenler B, Hipler U. 2017. Screening Test of a New Pulsed Plasma Jet for Medical Application. *Plasma Medicine*, 7 (2):133-145.

Hube B, Hay R, Brasch J, Veraldi S, Schaller M. 2015. Dermatmycoses and inflammation: The adaptive balance between growth, damage, and survival. *Journal De Mycologie Medicale*, 25 (1):E44-E58.

Husain T. 1953. An Experimental Study of Some Pressure Effects on Tissues, with Reference to the Bed-Sore Problem. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 66 (2):347-&.

Ikehara S, Sakakita H, Ishikawa K, Akimoto Y, Yamaguchi T, Yamagishi M, Kim J, Ueda M, Ikeda J, Nakanishi H, Shimizu N, Hori M, Ikehara Y. 2015. Plasma Blood Coagulation Without Involving the Activation of Platelets and Coagulation Factors. *Plasma Processes and Polymers*, 12 (12):1348-1353.

Isbary G, Shimizu T, Li YF, Stolz W, Thomas HM, Morfill GE, Zimmermann JL. 2013a. Cold atmospheric plasma devices for medical issues. *Expert Review of Medical Devices*, 10 (3):367-377.

Isbary G, Stolz W, Shimizu T, Monetti R, Bunk W, Schmidt H-U, Morfill G, Klämpfl TG, Steffes B, Thomas HM, Heinlin J, Karrer S. 2013b. Cold atmospheric argon plasma treatment may accelerate wound healing in chronic wounds: Results of an open retrospective randomized controlled study in vivo. *Clinical Plasma Medicine*, 1:25-30.

Iyer K, Chen Z, Ganapa T, Wu BM, Tawil B, Linsley CS. 2018. Keratinocyte Migration in a Three-Dimensional In Vitro Wound Healing Model Co-Cultured with Fibroblasts. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 15 (6):721-733.

Jablonowski L, Fricke K, Matthes R, Holtfreter B, Schluter R, von Woedtke T, Weltmann KD, Kocher T. 2017. Removal of naturally grown human biofilm with an atmospheric pressure plasma jet: An in-vitro study. *J Biophotonics*, 10 (5):718-726.

Jaritz M, Behm H, Hopmann C, Kirchheim D, Mitschker F, Awakowicz P, Dahmann R. 2017. The effect of UV radiation from oxygen and argon plasma on the adhesion of organosilicon coatings on polypropylene. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 50 (1).

Jenny M. 2018. Properties and Prevention: A Review of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biology and Medical Research*, 2 (3).

Ji HW, Kim H, Kim HW, Yun SH, Park JE, Choi EH, Kim SJ. 2020. Genome-Wide Comparison of the Target Genes of the Reactive Oxygen Species and Non-Reactive Oxygen Species Constituents of Cold Atmospheric Plasma in Cancer Cells. *Cancers (Basel)*, 12 (9).

Kalghatgi S, Friedman G, Fridman A, Clyne AM. 2010. Endothelial Cell Proliferation is Enhanced by Low Dose Non-Thermal Plasma Through Fibroblast Growth Factor-2 Release. *Annals of Biomedical Engineering*, 38 (3):748-757.

- Kanitakis J. 2002. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology*, 12 (4):390-400.
- Kapalczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajaczkowska M, Teresiak A, Filas V, Ibbs M, Blizniak R, Luczewski L, Lamperska K. 2018. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, 14 (4):910-919.
- Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. 2020. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends in Microbiology*, 28 (8):668-681.
- Kaushik NK, Ghimire B, Li Y, Adhikari M, Veerana M, Kaushik N, Jha N, Adhikari B, Lee SJ, Masur K, von Woedtke T, Weltmann KD, Choi EH. 2019. Biological and medical applications of plasma-activated media, water and solutions. *Biological Chemistry*, 400 (1):39-62.
- Kerlikowski A, Matthes R, Pink C, Steffen H, Schluter R, Holtfreter B, Weltmann KD, von Woedtke T, Kocher T, Jablonowski L. 2020. Effects of cold atmospheric pressure plasma and disinfecting agents on *Candida albicans* in root canals of extracted human teeth. *J Biophotonics*, 13 (12):e202000221.
- Kim W, Lee S, Seo D, Kim D, Kim K, Kim E, Kang J, Seong KM, Youn H, Youn B. 2019. Cellular Stress Responses in Radiotherapy. *Cells*, 8 (9).
- Kitisin T, Muangkaew W, Ampawong S, Sukphopetch P. 2020. Utilization of an in vitro biofabricated 3D skin as a pathological model of cutaneous candidiasis. *New Microbiologica*, 43 (4):171-179.
- Klebes M, Lademann J, Philipp S, Ulrich C, Patzelt A, Ulmer M, Kluschke F, Kramer A, Weltmann KD, Sterry W, Lange-Asschenfeldt B. 2014. Effects of tissue-tolerable plasma on psoriasis vulgaris treatment compared to conventional local treatment: A pilot study. *Clinical Plasma Medicine*, 2:22-27.
- Koban I, Matthes R, Hubner NO, Welk A, Meisel P, Holtfreter B, Sietmann R, Kindel E, Weltmann KD, Kramer A, Kocher T. 2010. Treatment of *Candida albicans* biofilms with low-temperature plasma induced by dielectric barrier discharge and atmospheric pressure plasma jet. *New Journal of Physics*, 12.

- Kostov KG, Borges AC, Koga-Ito CY, Nishime TMC, Prysiashnyi V, Honda RY. 2015. Inactivation of *Candida albicans* by Cold Atmospheric Pressure Plasma Jet. *Ieee Transactions on Plasma Science*, 43 (3):770-775.
- Kuhbacher A, Burger-Kentischer A, Rupp S. 2017. Interaction of *Candida* Species with the Skin. *Microorganisms*, 5 (2).
- Kumar CG, Anand SK. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42 (1-2):9-27.
- Kwolek-Mirek M, Zadrag-Tecza R. 2014. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *Fems Yeast Research*, 14 (7):1068-1079.
- Labadie M, Marchal F, Merbahi N, Girbal-Neuhauser E, Fontagne-Faucher C, Marcato-Romain CE. 2021. Response of Controlled Cell Load Biofilms to Cold Atmospheric Plasma Jet: Evidence of Extracellular Matrix Contribution. *Life-Basel*, 11 (7).
- Lackmann JW, Baldus S, Steinborn E, Edengeiser E, Kogelheide F, Langklotz S, Schneider S, Leichert LIO, Benedikt J, Awakowicz P, Bandow JE. 2015. A dielectric barrier discharge terminally inactivates RNase A by oxidizing sulfur-containing amino acids and breaking structural disulfide bonds. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 48 (49).
- Laksitorini M, Prasasty VD, Kiptoo PK, Siahaan TJ. 2014. Pathways and progress in improving drug delivery through the intestinal mucosa and blood-brain barriers. *Ther Deliv*, 5 (10):1143-1163.
- Laroussi M. 1996. Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma. *Ieee Transactions on Plasma Science*, 24 (3):1188-1191.
- Laroussi M. 2020. Cold Plasma in Medicine and Healthcare: The New Frontier in Low Temperature Plasma Applications. *Frontiers in Physics*, 8.
- Lee HJ, Shon CH, Kim YS, Kim S, Kim GC, Kong MG. 2009. Degradation of adhesion molecules of G361 melanoma cells by a non-thermal atmospheric pressure microplasma. *New Journal of Physics*, 11.
- Lee MH, Lee YS, Kim HJ, Han CH, Kang SU, Kim CH. 2019. Non-thermal plasma inhibits mast cell activation and ameliorates allergic skin inflammatory diseases in NC/Nga mice. *Scientific Reports*, 9.

Leite LDP, Oliveira MAC, Vegian M, Sampaio ADG, Nishime TMC, Kostov KG, Koga-Ito CY. 2021. Effect of Cold Atmospheric Plasma Jet Associated to Polyene Antifungals on *Candida albicans* Biofilms. *Molecules*, 26 (19).

Liao XY, Liu DH, Xiang QS, Ahn J, Chen SG, Ye XQ, Ding T. 2017. Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review. *Food Control*, 75:83-91.

Lipner SR, Friedman G, Scher RK. 2017. Pilot study to evaluate a plasma device for the treatment of onychomycosis. *Clin Exp Dermatol*, 42 (3):295-298.

Lister JL, Horswill AR. 2014. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4.

Lopez M, Calvo T, Prieto M, Mugica-Vidal R, Muro-Fraguas I, Alba-Elias F, Alvarez-Ordenez A. 2019. A Review on Non-thermal Atmospheric Plasma for Food Preservation: Mode of Action, Determinants of Effectiveness, and Applications. *Frontiers in Microbiology*, 10.

Lotfy K, Khalil SM, Abd El-Raheem H. 2020. Inactivation by helium cold atmospheric pressure plasma for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Theoretical and Applied Physics*, 14 (1):37-45.

Lou BS, Hsieh JH, Chen CM, Hou CW, Wu HY, Chou PY, Lai CH, Lee JW. 2020. Helium/Argon-Generated Cold Atmospheric Plasma Facilitates Cutaneous Wound Healing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8.

Lunov O, Zablotskii V, Churpita O, Chanova E, Sykova E, Dejneka A, Kubinova S. 2014. Cell death induced by ozone and various non-thermal plasmas: therapeutic perspectives and limitations. *Scientific Reports*, 4.

Ma RN, Feng HQ, Liang YD, Zhang Q, Tian Y, Su B, Zhang J, Fang J. 2013. An atmospheric-pressure cold plasma leads to apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* by accumulating intracellular reactive oxygen species and calcium. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 46 (28).

Mai-Prochnow A, Bradbury M, Ostrikov K, Murphy AB. 2015. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Response and Resistance to Cold Atmospheric Pressure Plasma Is Linked to the Redox-Active Molecule Phenazine. *Plos One*, 10 (6).

Mai-Prochnow A, Clauson M, Hong JM, Murphy AB. 2016. Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Scientific Reports*, 6.

- Maisch T, Shimizu T, Li YF, Heinlin J, Karrer S, Morfill G, Zimmermann JL. 2012a. Decolonisation of MRSA, S-aureus and E-coli by Cold-Atmospheric Plasma Using a Porcine Skin Model In Vitro. *Plos One*, 7 (4).
- Maisch T, Shimizu T, Isbary G, Heinlin J, Karrer S, Klampfl TG, Li YF, Morfill G, Zimmermann JL. 2012b. Contact-Free Inactivation of *Candida albicans* Biofilms by Cold Atmospheric Air Plasma. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (12):4242-4247.
- Maisch T, Bosserhoff AK, Unger P, Heider J, Shimizu T, Zimmermann JL, Morfill GE, Landthaler M, Karrer S. 2017. Investigation of toxicity and mutagenicity of cold atmospheric argon plasma. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58 (3):172-177.
- Mann EE, Wozniak DJ. 2012. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *Fems Microbiology Reviews*, 36 (4):893-916.
- Matthes R, Jablonowski L, Koban I, Quade A, Hubner NO, Schlueter R, Weltmann KD, von Woedtke T, Kramer A, Kocher T. 2015. In vitro treatment of *Candida albicans* biofilms on denture base material with volume dielectric barrier discharge plasma (VDBD) compared with common chemical antiseptics. *Clin Oral Investig*, 19 (9):2319-2326.
- Mayer FL, Wilson D, Hube B. 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4 (2):119-128.
- McMillan TJ, Leatherman E, Ridley A, Shorrocks J, Tobi SE, Whiteside JR. 2008. Cellular effects of long wavelength UV light (UVA) in mammalian cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60 (8):969-976.
- Megahed A, Aldridge B, Lowe J. 2018. The microbial killing capacity of aqueous and gaseous ozone on different surfaces contaminated with dairy cattle manure. *Plos One*, 13 (5).
- Meyer E, Geffers C, Gastmeier P, Schwab F. 2013. No increase in primary nosocomial candidemia in 682 German intensive care units during 2006 to 2011. *Eurosurveillance*, 18 (24):24-31.
- Meyer PF, de Oliveira P, Silva FKBA, da Costa ACS, Pereira CRA, Casenave S, Silva RMV, Araujo-Neto LG, Santos SD, Aizamaque E, Araujo HG, Bernardo M, Carvalho MGF, Soares CD. 2017. Radiofrequency treatment induces fibroblast growth factor 2 expression and subsequently promotes neocollagenesis and neoangiogenesis in the skin tissue. *Lasers in Medical Science*, 32 (8):1727-1736.

Millar AH, Heazlewood JL, Giglione C, Holdsworth MJ, Bachmair A, Schulze WX. 2019. The Scope, Functions, and Dynamics of Posttranslational Protein Modifications. *Annual Review of Plant Biology*, Vol 70, 70:119-151.

Mir MA, Ashraf MW, Tripathi V, Mir BA. 2021. Isolation, characterization and prevention of various microbial strains in NIC unit and PIC unit. *Scientific Reports*, 11 (1).

Mirpour S, Fathollah S, Mansouri P, Larijani B, Ghoranneviss M, Tehrani MM, Amini MR. 2020. Cold atmospheric plasma as an effective method to treat diabetic foot ulcers: A randomized clinical trial. *Scientific Reports*, 10 (1).

Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. 2014. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20 (7):1126-1167.

Modic M, McLeod NP, Sutton JM, Walsh JL. 2017. Cold atmospheric pressure plasma elimination of clinically important single- and mixed-species biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49 (3):375-378.

Moormeier DE, Bayles KW. 2017. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular Microbiology*, 104 (3):365-376.

Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. 2019. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 10.

Murga R, Stewart PS, Daly D. 1995. Quantitative-Analysis of Biofilm Thickness Variability. *Biotechnology and Bioengineering*, 45 (6):503-510.

Nasiru MMd, Frimpong EBd, Muhammad Ud, Qian J, Mustapha AT, Yan W, Zhuang H, Zhang J. 2021. Dielectric barrier discharge cold atmospheric plasma: Influence of processing parameters on microbial inactivation in meat and meat products. *Compr Rev Food Sci Food Saf*.

Netea MG, Joosten LAB, van der Meer JWM, Kullberg BJ, van de Veerdonk FL. 2015. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nature Reviews Immunology*, 15 (10):630-642.

Nickel W, Rabouille C. 2009. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10 (2):148-155.

- Niedzwiedz I, Wasko A, Pawlat J, Polak-Berecka M. 2019. The State of Research on Antimicrobial Activity of Cold Plasma. *Polish Journal of Microbiology*, 68 (2):153-164.
- Niehues H, Bouwstra JA, El Ghalbzouri A, Brandner JM, Zeeuwen PLJM, van den Bogaard EH. 2018. 3D skin models for 3R research: The potential of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function. *Experimental Dermatology*, 27 (5):501-511.
- Nishijima A, Fujimoto T, Hirata T, Nishijima J. 2019. Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma on Accelerating Acute Wound Healing: A Comparative Study among 4 Different Treatment Groups. *Modern Plastic Surgery*, 9 (1):18-31.
- Nishime TMC, Borges AC, Koga-Ito CY, Machida M, Hein LRO, Kostov KG. 2017. Non-thermal atmospheric pressure plasma jet applied to inactivation of different microorganisms. *Surface & Coatings Technology*, 312:19-24.
- Nobile CJ, Johnson AD. 2015. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annual Review of Microbiology*, Vol 69, 69:71-92.
- Nur S, Sparber F, Lemberg C, Guiducci E, Schweizer TA, Zwicky P, Becher B, LeibundGut-Landmann S. 2019. IL-23 supports host defense against systemic *Candida albicans* infection by ensuring myeloid cell survival. *PLoS Pathog*, 15 (12):e1008115.
- O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. 2018. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9.
- Onuki Y, Bhardwaj U, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ. 2008. A review of the biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response. *J Diabetes Sci Technol*, 2 (6):1003-1015.
- Ott LC, Appleton HJ, Shi H, Keener K, Mellata M. 2021. High voltage atmospheric cold plasma treatment inactivates *Aspergillus flavus* spores and deoxynivalenol toxin. *Food Microbiology*, 95.
- Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo HJ, Freeman BA, Darley-Usmar VM. 1999. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1411 (2-3):385-400.
- Patin EC, Thompson A, Orr SJ. 2019. Pattern recognition receptors in fungal immunity. *Semin Cell Dev Biol*, 89:24-33.

- Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J. 2006. Human beta-defensins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63 (11):1294-1313.
- Phan QT, Myers CL, Fu Y, Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Ibrahim AS, Edwards JE, Filler SG. 2007. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *Plos Biology*, 5 (3):543-557.
- Pierce CG, Vila T, Romo JA, Montelongo-Jauregui D, Wall G, Ramasubramanian A, Lopez-Ribot JL. 2017. The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. *Journal of Fungi*, 3 (1).
- Plattfaut I, Besser M, Severing AL, Sturmer EK, Oplander C. 2021. Plasma medicine and wound management: Evaluation of the antibacterial efficacy of a medically certified cold atmospheric argon plasma jet. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 57 (5).
- Plewig G, Ruzicka T, Kaufmann R, Hertl M. 2018. *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*. Springer Verlag.
- Prasad R. 2017. *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology*. Springer Verlag.
- Privat-Maldonado A, Schmidt A, Lin A, Weltmann KD, Wende K, Bogaerts A, Bekeschus S. 2019. ROS from Physical Plasmas: Redox Chemistry for Biomedical Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
- Przekora A. 2020. A Concise Review on Tissue Engineered Artificial Skin Grafts for Chronic Wound Treatment: Can We Reconstruct Functional Skin Tissue In Vitro? *Cells*, 9 (7).
- Rademacher F, Simanski M, Harder J. 2016. RNase 7 in Cutaneous Defense. *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (4).
- Rahimi-Verki N, Shapoorzadeh A, Razzaghi-Abyaneh M, Atyabi SM, Shams-Ghahfarokhi M, Jahanshiri Z, Gholami-Shabani M. 2016. Cold atmospheric plasma inhibits the growth of *Candida albicans* by affecting ergosterol biosynthesis and suppresses the fungal virulence factors in vitro. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 13:66-72.
- Ramirez H, Patel SB, Pastar I. 2014. The Role of TGFbeta Signaling in Wound Epithelialization. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 3 (7):482-491.

Randall MJ, Jungel A, Rimann M, Wuertz-Kozak K. 2018. Advances in the Biofabrication of 3D Skin in vitro: Healthy and Pathological Models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6.

Reinke JM, Sorg H. 2012. Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*, 49 (1):35-43.

Rennie MY, Dunham D, Lindvere-Teene L, Raizman R, Hill R, Linden R. 2019. Understanding Real-Time Fluorescence Signals from Bacteria and Wound Tissues Observed with the MolecuLight i:X (TM). *Diagnostics*, 9 (1).

Repp KK, Menor SA, Pettit RK. 2007. Microplate Alamar blue assay for susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Medical Mycology*, 45 (7):603-607.

Rock KL, Kono H. 2008. The inflammatory response to cell death. *Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease*, 3:99-126.

Roti JLR. 2008. Cellular responses to hyperthermia (40-46 degrees C): Cell killing and molecular events. *International Journal of Hyperthermia*, 24 (1):3-15.

Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentin E, Sentandreu R. 2006. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *Fems Yeast Research*, 6 (1):14-29.

Rutkowski R, Daeschlein G, von Woedtke T, Smeets R, Gosau M, Metelmann HR. 2020. Long-Term Risk Assessment for Medical Application of Cold Atmospheric Pressure Plasma. *Diagnostics*, 10 (4).

Sakudo A, Toyokawa Y, Imanishi Y, Murakami T. 2017. Crucial roles of reactive chemical species in modification of respiratory syncytial virus by nitrogen gas plasma. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 74:131-136.

Salazar VA, Arranz-Trullen J, Navarro S, Blanco JA, Sanchez D, Moussaoui M, Boix E. 2016. Exploring the mechanisms of action of human secretory RNase 3 and RNase 7 against *Candida albicans*. *Microbiologyopen*, 5 (5):830-845.

Satpathy S, Sen SK, Pattanaik S, Raut S. 2016. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7:56-66.

- Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. 2001. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 11 (4):173-186.
- Schairer DO, Chouake JS, Nosanchuk JD, Friedman AJ. 2012. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence*, 3 (3):271-279.
- Schieber M, Chandel NS. 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*, 24 (10):R453-462.
- Schmidt A, Bekeschus S, Wende K, Vollmar B, von Woedtke T. 2017a. A cold plasma jet accelerates wound healing in a murine model of full-thickness skin wounds. *Experimental Dermatology*, 26 (2):156-162.
- Schmidt A, Bekeschus S, Jablonowski H, Barton A, Weltmann KD, Wende K. 2017b. Role of Ambient Gas Composition on Cold Physical Plasma-Elicited Cell Signaling in Keratinocytes. *Biophysical Journal*, 112 (11):2397-2407.
- Schmidt A, Bekeschus S, Jarick K, Hasse S, von Woedtke T, Wende K. 2019. Cold Physical Plasma Modulates p53 and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Keratinocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
- Scholzen T, Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, 182 (3):311-322.
- Semmler ML, Bekeschus S, Schafer M, Bernhardt T, Fischer T, Witzke K, Seebauer C, Rebl H, Grambow E, Vollmar B, Nebe JB, Metelmann HR, von Woedtke T, Emmert S, Boeckmann L. 2020. Molecular Mechanisms of the Efficacy of Cold Atmospheric Pressure Plasma (CAP) in Cancer Treatment. *Cancers*, 12 (2).
- Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S, Gabrani R. 2016. Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 121 (2):309-319.
- Shome D, von Woedtke T, Riedel K, Masur K. 2020. The HIPPO Transducer YAP and Its Targets CTGF and Cyr61 Drive a Paracrine Signalling in Cold Atmospheric Plasma-Mediated Wound Healing. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.
- Shome S. 2020. The effect of Cold Atmospheric Plasma (CAP) on the molecular mechanism of wound healing [Dissertation]. Universität Greifswald

Shuheng H, Yan L, Jie M, Ji S, Wei H, Shuheng H, Chaobing Y, Wenhao X, Yudi Z, Chunjun Y. 2020. Applications of atmospheric pressure plasma in microbial inactivation and cancer therapy: a brief review. *Plasma Science and Technology*, 22 (10).

Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. 2010. *The Bacterial Cell Envelope*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2 (5).

Silva PM, Goncalves S, Santos NC. 2014. Defensins: antifungal lessons from eukaryotes. *Frontiers in Microbiology*, 5.

Song HP, Kim B, Choe JH, Jung S, Moon SY, Choe W, Jo C. 2009. Evaluation of atmospheric pressure plasma to improve the safety of sliced cheese and ham inoculated by 3-strain cocktail *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 26 (4):432-436.

Stoffels E, Sakiyama Y, Graves DB. 2008. Cold atmospheric plasma: Charged species and their interactions with cells and tissues. *Ieee Transactions on Plasma Science*, 36 (4):1441-1457.

Stratmann B, Costea TC, Nolte C. 2020. Effect of Cold Atmospheric Plasma Therapy vs Standard Therapy Placebo on Wound Healing in Patients With Diabetic Foot Ulcers: A Randomized Clinical Trial (vol 3, e2010411, 2020). *Jama Network Open*, 3 (10).

Sun T, Jackson S, Haycock JW, MacNeil S. 2006. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. *Journal of Biotechnology*, 122 (3):372-381.

Tabuchi Y, Uchiyama H, Zhao QL, Yunoki T, Andocs G, Nojima N, Takeda K, Ishikawa K, Hori M, Kondo T. 2016. Effects of nitrogen on the apoptosis of and changes in gene expression in human lymphoma U937 cells exposed to argon-based cold atmospheric pressure plasma. *International Journal of Molecular Medicine*, 37 (6):1706-1714.

Takai E, Kitano K, Kuwabara J, Shiraki K. 2012. Protein Inactivation by Low-temperature Atmospheric Pressure Plasma in Aqueous Solution. *Plasma Processes and Polymers*, 9 (1):77-82.

Takai E, Kitamura T, Kuwabara J, Ikawa S, Yoshizawa S, Shiraki K, Kawasaki H, Arakawa R, Kitano K. 2014. Chemical modification of amino acids by atmospheric-pressure cold plasma in aqueous solution. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 47 (28).

Takamatsu T, Uehara K, Sasaki Y, Hidekazu M, Matsumura Y, Iwasawa A, Ito N, Kohno M, Azuma T, Okino A. 2015. Microbial Inactivation in the Liquid Phase Induced by Multigas Plasma Jet (vol 10, e0132381, 2015). *Plos One*, 10 (8).

Takeuchi O, Akira S. 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140 (6):805-820.

Taylor W, Camilleri E, Craft DL, Korza G, Granados MR, Peterson J, Szczpaniak R, Weller SK, Moeller R, Douki T, Mok WWK, Setlow P. 2020. DNA Damage Kills Bacterial Spores and Cells Exposed to 222-Nanometer UV Radiation. *Appl Environ Microbiol*, 86 (8).

Tendero C, Tixier C, Tristant P, Desmaison J, Leprince P. 2006. Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 61 (1):2-30.

Terrier O, Essere B, Yver M, Barthelemy M, Bouscambert-Duchamp M, Kurtz P, VanMechelen D, Morfin F, Billaud G, Ferraris O, Lina B, Rosa-Calatrava M, Moules V. 2009. Cold oxygen plasma technology efficiency against different airborne respiratory viruses. *Journal of Clinical Virology*, 45 (2):119-124.

Theinkom F, Singer L, Cieplik F, Cantzler S, Weilemann H, Cantzler M, Hiller KA, Maisch T, Zimmermann JL. 2019. Antibacterial efficacy of cold atmospheric plasma against *Enterococcus faecalis* planktonic cultures and biofilms in vitro. *Plos One*, 14 (11).

Thewes S, Moran GP, Magee BB, Schaller M, Sullivan DJ, Hube B. 2008. Phenotypic screening, transcriptional profiling, and comparative genomic analysis of an invasive and non-invasive strain of *Candida albicans*. *Bmc Microbiology*, 8.

Thiele JJ, Schroeter C, Hsieh SN, Podda M, Packer L. 2001. The antioxidant network of the stratum corneum. *Curr Probl Dermatol*, 29:26-42.

Thompson A, Orr SJ. 2018. Emerging IL-12 family cytokines in the fight against fungal infections. *Cytokine*, 111:398-407.

Tolouie H, Mohammadifar MA, Ghomi H, Hashemi M. 2018. Cold atmospheric plasma manipulation of proteins in food systems. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 58 (15):2583-2597.

Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. 2014. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1843 (11):2563-2582.

Uitto J, Turto H, Lindy S. 1972. Assay of Lactate-Dehydrogenase in Human Skin - Total Activity and Isoenzyme Composition. *Clinica Chimica Acta*, 36 (1):43-+.

Ujino D, Nishizaki H, Higuchi S, Komasa S, Okazaki J. 2019. Effect of Plasma Treatment of Titanium Surface on Biocompatibility. *Applied Sciences-Basel*, 9 (11).

van den Broek LJ, Bergers L, Reijnders CMA, Gibbs S. 2017. Progress and Future Perspectives in Skin-on-Chip Development with Emphasis on the use of Different Cell Types and Technical Challenges. *Stem Cell Rev Rep*, 13 (3):418-429.

van der Meide PH, Schellekens H. 1996. Cytokines and the immune response. *Biotherapy*, 8 (3-4):243-249.

van Enckevort FH, Netea MG, Hermus AR, Sweep CG, Meis JF, Van der Meer JW, Kullberg BJ. 1999. Increased susceptibility to systemic candidiasis in interleukin-6 deficient mice. *Med Mycol*, 37 (6):419-426.

Virard F, Cousty S, Cambus JP, Valentin A, Kemoun P, Clement F. 2015. Cold Atmospheric Plasma Induces a Predominantly Necrotic Cell Death via the Microenvironment. *Plos One*, 10 (8).

von Woedtke T, Reuter S, Masur K, Weltmann KD. 2013. Plasmas for medicine. *Physics Reports-Review Section of Physics Letters*, 530 (4):291-320.

von Woedtke T, Schmidt A, Bekeschus S, Wende K, Weltmann KD. 2019. Plasma Medicine: A Field of Applied Redox Biology. *In Vivo*, 33 (4):1011-1026.

von Woedtke T, Emmert S, Metelmann HR, Rupf S, Weltmann KD. 2020. Perspectives on cold atmospheric plasma (CAP) applications in medicine. *Physics of Plasmas*, 27 (7).

Wang LY, Xia CK, Guo YJ, Yang CJ, Cheng C, Zhao J, Yang XY, Cao ZC. 2020. Bactericidal efficacy of cold atmospheric plasma treatment against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiology*, 15 (2):115-125.

Weltmann KD, von Woedtke T. 2017. Plasma medicine-current state of research and medical application. *Plasma Physics and Controlled Fusion*, 59 (1).

Weltmann KD, Kindel E, von Woedtke T, Hahnel M, Stieber M, Brandenburg R. 2010. Atmospheric-pressure plasma sources: Prospective tools for plasma medicine. *Pure and Applied Chemistry*, 82 (6):1223-1237.

- Wiegand C, Hipler UC. 2009. Evaluation of Biocompatibility and Cytotoxicity Using Keratinocyte and Fibroblast Cultures. *Skin Pharmacology and Physiology*, 22 (2):74-82.
- Wiegand C, Elsner P. 2017. Plasma Medicine - Cold Plasma for Treatment of Skin Infections. *Aktuelle Dermatologie*, 43 (8-9):339-345.
- Wiegand C, Beier O, Horn K, Pfuch A, Tolke T, Hipler UC, Schimanski A. 2014. Antimicrobial Impact of Cold Atmospheric Pressure Plasma on Medical Critical Yeasts and Bacteria Cultures. *Skin Pharmacology and Physiology*, 27 (1):25-35.
- Wiegand C, Fink S, Hipler UC, Beier O, Horn K, Pfuch A, Schimanski A, Grunler B. 2017. Cold atmospheric pressure plasmas exhibit antimicrobial properties against critical bacteria and yeast species. *J Wound Care*, 26 (8):462-468.
- Wiegand C, Fink S, Beier O, Horn K, Pfuch A, Schimanski A, Grunler B, Hipler UC, Elsner P. 2016. Dose- and Time-Dependent Cellular Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma Evaluated in 3D Skin Models. *Skin Pharmacology and Physiology*, 29 (5):257-265.
- Wirtz M, Stoffels I, Dissemond J, Schadendorf D, Roesch A. 2018. Actinic keratoses treated with cold atmospheric plasma. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 32 (1):E37-E39.
- Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Longaker MT, Gurtner GC. 2011. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J Biomed Biotechnol*, 2011:969618.
- Xu DH, Ning N, Xu YJ, Xia WJ, Liu DX, Chen HL, Kong MG. 2021. Effect of He Plasma Jet Versus Surface Plasma on the Metabolites of Acute Myeloid Leukemia Cells. *Frontiers in Oncology*, 11.
- Xu ZM, Shen J, Cheng C, Hu SH, Lan Y, Chu PK. 2017. In vitro antimicrobial effects and mechanism of atmospheric-pressure He/O-2 plasma jet on *Staphylococcus aureus* biofilm. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 50 (10).
- Yang Y, Zheng M, Li J, Su YF, Li HP, Tan JG. 2020. Inhibition of bacterial growth on zirconia abutment with a helium cold atmospheric plasma jet treatment. *Clinical Oral Investigations*, 24 (4):1465-1477.
- Yannam GR, Gutti T, Poluektova LY. 2012. IL-23 in infections, inflammation, autoimmunity and cancer: possible role in HIV-1 and AIDS. *J Neuroimmune Pharmacol*, 7 (1):95-112.

Yin W, Wang YT, Liu L, He J. 2019. Biofilms: The Microbial "Protective Clothing" in Extreme Environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (14).

Zackular JP, Chazin WJ, Skaar EP. 2015. Nutritional Immunity: S100 Proteins at the Host-Pathogen Interface. *Journal of Biological Chemistry*, 290 (31):18991-18998.

Zeitvogel J, Werfel T. 2020. Use of 2D and 3D cell cultures in dermatology. *Hautarzt*, 71 (2):91-100.

Zhang H, Xu ZM, Shen J, Li X, Ding LL, Ma J, Lan Y, Xia WD, Cheng C, Sun Q, Zhang ZL, Chu PK. 2015. Effects and Mechanism of Atmospheric-Pressure Dielectric Barrier Discharge Cold Plasma on Lactate Dehydrogenase (LDH) Enzyme. *Scientific Reports*, 5.

Ziuzina D, Han L, Cullen PJ, Bourke P. 2015. Cold plasma inactivation of internalised bacteria and biofilms for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol*, 210:53-61.

Ziuzina D, Patil S, Cullen PJ, Boehm D, Bourke P. 2014. Dielectric Barrier Discharge Atmospheric Cold Plasma for Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Plasma Medicine*, 4:137-152.

IV Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich auf vielfältige Weise bei meiner Arbeit unterstützten:

Als erstes möchte ich PD Dr. Uta-Christina Hipler danken, die es mir ermöglichte die Forschung in ihrem Labor durchzuführen und mich durch die Promotion begleitete. Weiterhin möchte ich auch Prof. Dr. Dagmar Fischer als Zweitbetreuerin für die nette Zusammenarbeit in der Plasma-Arbeitsgruppe danken.

Besonderen Dank gilt ebenfalls PD Dr. Cornelia Wiegand für die Möglichkeit dieses Thema weiterzubearbeiten sowie für die wissenschaftliche Betreuung, fachliche Unterstützung, Hilfsbereitschaft und steten Einsatz in allen Dingen.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der Firma Innovent bedanken, die mich bei der Arbeit technisch durch die Bereitstellung des Plasmajets und Durchführung der Behandlung unterstützen. Hier gilt mein Dank Oliver Beier, der mit mir zusammen die Experimente am Plasmajet durchführte. Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Kerstin Horn, Dr. Andreas Pfuch und Dr. Sebastian Spange für die nette Zusammenarbeit in der Plasma-Arbeitsgruppe bedanken.

Zudem möchte ich Michel Fischer von der TU Ilmenau für die Bereitstellung der DBD-Plasmaquelle danken sowie für die freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit.

Auch bei den Doktoranden und Mitarbeitern des Forschungslabors möchte ich mich herzlich für die praktische Unterstützung und darüber hinaus für die für die harmonische Arbeitsgemeinschaft bedanken.

Letztendlich möchte ich meiner Familie danken, die mich während dieser Arbeit in allen Lebenslagen unterstützte. Besondere Erwähnung gilt dabei meinen Eltern, die mir meinen Lebensweg ermöglichten und denen ich diese Arbeit in Liebe und Dankbarkeit widme.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Inaktivierung von Mikroorganismen mittels KAP	17
Tabelle 2: Zelllinien und Bakterien.....	29
Tabelle 3: Chemikalien	29
Tabelle 4: Zusammensetzung von Puffer und Medien.....	31
Tabelle 5: Antikörper	31
Tabelle 6: Geräte	32
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien	32
Tabelle 8: Kits und Assays.....	33
Tabelle 9: Primersequenzen	33
Tabelle 10: kommerzielle Primer	34
Tabelle 11: Herstellung des cDNA-Mastermixes	40
Tabelle 12: Zyklen der cDNA-Synthese	40
Tabelle 13: Herstellung des Mastermixes für die RT-qPCR.....	41
Tabelle 14: Zyklen der RT-qPCR	41
Tabelle 15: Schematischer Verlauf des ELISA.....	43
Tabelle 16: Ablauf der Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	44
Tabelle 17: Ablaufprotokoll der Periodsäure-Schiff-Färbung	45
Tabelle 18: Übersicht der antimikrobiellen Wirkung des Plasmajets.	52
Tabelle 19: Zusammenfassung der antimikrobiellen Wirkung der DBD-Quelle:	74

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zusammensetzung von Plasma. Das Plasma besteht aus einer Reihe von Bestandteilen, welche Einfluss auf biologische Systeme haben können.	12
Abbildung 2: Funktionsweise von direktem Plasma	14
Abbildung 3: Erzeugung von indirektem Plasma	15
Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Haut. Die humane Haut besteht grundlegend aus 3 Teilen: Hypodermis, Dermis und Epidermis. Die Epidermis wiederum ist in verschiedene Schichten unterteilt.....	21
Abbildung 5: Kultivierung von Vollhautmodellen. Fibroblasten werden in einer Kollagenmatrix eingesät. Nach einer bestimmten Kultivierungszeit werden Keratinozyten auf das Dermismodell gegeben und zur Proliferation angeregt. Danach erfolgt die Kultivierung an der Medium-Luft-Grenze, um die Differenzierung der Epidermis zu erreichen.	24
Abbildung 6: Untersuchung der Biokompatibilität und Biofunktionalität von kaltem atmosphärischem Plasma in dieser Arbeit	25
Abbildung 7: Aufbau des Plasmajets. Schematische Illustration des Geräteaufbaus (A) sowie Darstellung des Plasmakopfes bei gezündetem Plasma mit Luft als Arbeitsgas (B).....	38
Abbildung 8: DBD-Plasmaquelle. Geräteaufbau (A) sowie Darstellung des Plasmachips mit dem Elektrodenfeld (B), bestehend aus zwei Elektroden.	39
Abbildung 9: Antimikrobielle Wirkung des Plasmajets: verschiedene klinisch relevante Mikroorganismen wurden auf Agarplatten ausplattiert und mit dem Plasma behandelt. Nach 24h Inkubationszeit wurde der entstandene Hemmhof bewertet. Dargestellt sind die Ergebnisse für die Arbeitsgase A) Luft und B) Stickstoff. Die Behandlungsfläche ist mit einem Ring gekennzeichnet: rot=Effekt, schwarz=kein Effekt.	51
Abbildung 10: Viabilität von Keratinozyten 24h nach Plasmabehandlung. HaCaT-Keratinozyten wurden mit dem Plasmajet behandelt und die Viabilität mittels MTT-Test untersucht. Als Arbeitsgase wurden Luft und Stickstoff verglichen. Die Viabilität [%] ergibt sich aus dem Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich mit der Kontrolle wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.	53
Abbildung 11: Histologische Betrachtung des Plasmaeffektes. 3D-Hautmodelle wurden mit dem Plasmajet behandelt und darauffolgend bis zu 72h beobachtet. Die histologischen Schnitte wurde für die Übersichtsfärbung mittels Hämatoxylin & Eosin gefärbt. Die Einteilung der Kategorien erfolgte anhand des Schädigungsgrades. Die Balkenlänge entspricht 100 μm	55

Abbildung 12: Histologische Untersuchung der Proliferation am 3D-Hautmodell. Die Hautmodelle wurden mit dem Plasmajet behandelt und bis zu 72h beobachtet. Die histologischen Schnitte wurden mit einem Antikörper gegen Ki67 immunhistochemisch angefärbt. Proliferierende Zellen sind als rote Punkte dargestellt. Die Balkenlänge entspricht 100 µm..... 57

Abbildung 13: Untersuchung der Zytotoxizität nach Plasmabehandlung. Die Hautmodelle wurden mit dem Plasmajet behandelt und der Gehalt an Laktat-Dehydrogenase im Überstand bis 72h nach Behandlung bestimmt. Die fache Ausschüttung ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „****“, für $p \leq 0,01$ „***“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen. 58

Abbildung 14: Genexpressionsanalyse von Entzündungsmediatoren. Mittels RT-qPCR wurde die relative Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine von plasmabehandelten 3D-Hautmodellen ermittelt. Die relative Expression der Zytokine *IL6* (A), *IL8* (B), *IL1A* (C) sowie *TNF* (D) ergeben sich aus dem Vergleich mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „****“, für $p \leq 0,01$ „***“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen..... 60

Abbildung 15: Expressionsanalyse des Regenerationspotentials. Die relative Expression der Gene *FGF2* (A), *FGF7* (B), *KI67* (C) und *TGF* (D) wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Die relative Expression ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „****“, für $p \leq 0,01$ „***“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen..... 62

Abbildung 16: Sekretionsanalyse. 3D-Hautmodelle wurden mit Plasma des Plasmajets behandelt und der Überstand nach bestimmten Zeitpunkten entnommen. Die Bestimmung der Freisetzung von IL-6 (A), IL-8 (B), IL-1 α (C) sowie FGF-2 (D) aus dem Überstand erfolgte mittels ELISA. Die fache Sekretion ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „****“, für $p \leq 0,01$ „***“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen..... 64

Abbildung 17: Histologische Analyse. Die Hautmodelle wurden mit dem Arbeitsgas behandelt, ohne das Plasma zu zünden um histologische Änderungen zu untersuchen. Für die

Übersichtsfärbung wurden die Paraffin-Schnitte mittels Hämatoxylin & Eosin angefärbt. Die Balkenlänge entspricht 100 µm.....	65
Abbildung 18: Histologische Untersuchung der Proliferation am 3D-Hautmodell. Die Hautmodelle wurden mit dem Arbeitsgas, ohne Zünden des Plasmas, behandelt und bis zu 72h nach Behandlung beobachtet. Die histologischen Schnitte wurden mit einem Antikörper gegen Ki67 immunhistochemisch angefärbt. Proliferierende Zellen sind als rote Punkte dargestellt. Die Balkenlänge entspricht 100 µm.....	66
Abbildung 19: Untersuchung der Zytotoxizität. Die Hautmodelle wurden mit dem Arbeitsgas, ohne Zünden des Plasmas, behandelt und der Gehalt an Laktat-Dehydrogenase wurde im Überstand bis 72h nach Behandlung bestimmt. Die fache Ausschüttung ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „****“, für $p \leq 0,01$ „***“ und für $p \leq 0,05$ „**“ stehen.....	67
Abbildung 20: Genexpressionsanalyse verschiedener pro-Inflammatorischer Zytokine. Die relative Expression der Zytokine <i>IL6</i> (A), <i>IL8</i> (B), <i>IL1A</i> (C) und <i>TNF</i> (D) wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Die relative Expression ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „****“, für $p \leq 0,01$ „***“ und für $p \leq 0,05$ „**“ stehen.	68
Abbildung 21: Genexpressionsanalyse des Regenerationspotentials. Die Expression der Gene <i>FGF2</i> (A), <i>FGF7</i> (B), <i>KI67</i> (C) sowie <i>TGF</i> (D) wurden nach Behandlung mit dem Arbeitsgas mittels RT-qPCR untersucht. Die relative Expression ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „****“, für $p \leq 0,01$ „***“ und für $p \leq 0,05$ „**“ stehen.....	70
Abbildung 22: Untersuchung der Sekretion. Nach der Behandlung der Hautmodelle mit dem Arbeitsgas, ohne zünden des Plasmas, wurde der Überstand nach bestimmten Zeitpunkten entnommen. Die Bestimmung der Freisetzung von IL-6 (A), IL-8 (B), IL-1 α (C) sowie FGF-2 (D) erfolgte mittels ELISA. Die fache Sekretion ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „****“, für $p \leq 0,01$ „***“ und für $p \leq 0,05$ „**“ stehen.	72

Abbildung 23: Antimikrobielle Wirkung der DBD-Quelle. Verschiedene klinisch relevante Mikroorganismen wurden auf Agarplatten ausplattiert und mit Plasma behandelt. Nach 24h Inkubationszeit wurde der entstandene Hemmhof bewertet. Die Behandlungsfläche ist mit einem Ring gekennzeichnet: rot=Effekt, schwarz=kein Effekt.	74
Abbildung 24: Plasmabehandlung von Biofilmen -Viabilität-. Die Viabilität verschiedener Biofilmbildner wurde mittels CelltiterBlue®-Assay ermittelt. Die prozentuale Viabilität ergibt sich aus dem Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit der behandelten Probe wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „****“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.	76
Abbildung 25: Plasmabehandlung von Biofilmen -Biomasse-. Um die Ablösung des Biofilms nach Plasmabehandlung auszuschließen, wurde dieser mittels Kristallviolett angefärbt. Die prozentuale Biomasse ergibt sich aus dem Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit der behandelten Probe wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „****“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.	77
Abbildung 26: Viabilität von Keratinozyten nach Plasmabehandlung. HaCaT-Keratinozyten wurden mit der DBD-Plasmaquelle bis zu 40s behandelt und die Viabilität nach 24h untersucht. Die Viabilität [%] ergibt sich aus dem Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich mit der Kontrolle wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „****“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.	78
Abbildung 27: Histologische Analyse nach Plasma-Behandlung mittels DBD-Quelle. Zu bestimmten Zeitpunkten nach Plasmabehandlung wurden Proben entnommen und histologisch analysiert. Die Übersichtsfärbung der Paraffinschnitte erfolgte mittels Hämatoxylin & Eosin. Die Balkenlänge entspricht 100 μm	79
Abbildung 28: Analyse der Zytotoxizität nach Plasmabehandlung mit der DBD-Quelle. Der Gehalt an Laktat-Dehydrogenase wurde im Überstand bestimmt. Die fache Ausschüttung ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „****“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.	80
Abbildung 29: Histologische Untersuchung der Proliferation am 3D-Hautmodell nach Behandlung mit der DBD-Quelle. Die histologischen Schnitte wurden mit einem Antikörper gegen Ki67 immunhistochemisch angefärbt. Proliferierende Zellen sind als rote Punkte dargestellt. Die Balkenlänge entspricht 100 μm	81

Abbildung 30: Analyse der Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine. Die relative Expression der Zytokine *IL6* (A), *IL8* (B), *IL1A* (C), *TNF* (D) und *IL23* (E) wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Die relative Expression ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „****“, für $p \leq 0,01$ „***“ und für $p \leq 0,05$ „**“ stehen. 82

Abbildung 31: Expressionsanalyse verschiedener Marker des Regenerationspotentials. Die Expression der Gene *FGF2* (A), *FGF7* (B), *KI67* (C) sowie *TGF* (D) wurden nach Plasmabehandlung mittels RT-qPCR untersucht. Die relative Expression ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „****“, für $p \leq 0,01$ „***“ und für $p \leq 0,05$ „**“ stehen..... 84

Abbildung 32: Expression antimikrobieller Peptide. Nach Plasmabehandlung erfolgte die Analyse der antimikrobiellen Peptide *HBD2* (A), *S100A7* (B) sowie *RNASE7* (C). Die relative Expression ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „****“, für $p \leq 0,01$ „***“ und für $p \leq 0,05$ „**“ stehen..... 86

Abbildung 33: Sekretionsanalyse. Nach der Behandlung der Hautmodelle mit Plasma der DBD-Quelle wurde der Überstand nach bestimmten Zeitpunkten entnommen. Die Bestimmung der Freisetzung von IL-6 (A), IL-8 (B), IL-1 α (C) sowie FGF-2 (D) aus dem Überstand erfolgte mittels ELISA. Die fache Sekretion ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten 1h-Kontrolle. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Kontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „****“, für $p \leq 0,01$ „***“ und für $p \leq 0,05$ „**“ stehen..... 88

Abbildung 34: Analyse der Autofluoreszenz. Nach Infektion der 3D-Hautmodelle und Plasmabehandlung wurde *C. albicans* mittels Autofluoreszenz sichtbar gemacht. Die Hautmodelle besitzen eine grüne Fluoreszenz, während *C. albicans* orange-rötlich erscheint. Die Balkenlänge entspricht 1 cm. 89

Abbildung 35: Histologische Analyse nach Infektion. 3D-Hautmodelle wurden mit *C. albicans* infiziert und mit Plasma behandelt. Mittels PAS-Färbung wurde das Hyphenwachstum von *C. albicans* sichtbar gemacht. Die Balkenlänge entspricht 50 μm 90

Abbildung 36: Graphische Auswertung der Candida-Infektion nach 48h. Mittels der PAS-gefärbten histologischen Schnitte wurde die infizierte Fläche prozentual zur Gesamtfläche des

Hautmodells ermittelt. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Infektionskontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.	91
Abbildung 37: Histologische Analyse. Mittels HE-Übersichtsfärbung wurden nach Infektion der Hautmodelle histologische Veränderungen sichtbar gemacht. Die Balkenlänge entspricht $50 \mu\text{m}$	92
Abbildung 38: Analyse der Zytotoxizität nach Infektion. Nach Infektion und Plasmabehandlung der Hautmodelle wurde mittels LDH-Assay die Ausschüttung von LDH im Überstand bestimmt. Die fache Ausschüttung ergibt sich aus dem Vergleich mit der unbehandelten, nicht infizierten Kontrolle des gleichen Zeitpunktes. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Infektionskontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.	92
Abbildung 39: Expression pro-inflammatorischer Zytokine nach Infektion. Die Expression der Zytokine <i>IL6</i> (A), <i>IL8</i> (B), <i>IL1A</i> (C), <i>TNF</i> (D) sowie <i>IL23</i> (E) wurden mittels RT-qPCR bestimmt. Die relative Expression ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten, nicht infizierten Kontrolle des gleichen Zeitpunktes. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Infektionskontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.	94
Abbildung 40: Expression antimikrobieller Peptide. Nach Infektion der Hautmodelle wurde die Expression von <i>HBD2</i> (A), <i>S100A7</i> (B) und <i>RNASE7</i> (C) mittels RT-qPCR bestimmt. Die relative Expression ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten, nicht infizierten Kontrolle des gleichen Zeitpunktes. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Infektionskontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.	95
Abbildung 41: Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine. Nach Infektion der Hautmodelle und Behandlung mit Plasma der DBD-Quelle wurde anhand des Überstandes die Freisetzung von <i>IL-6</i> (A), <i>IL-8</i> (B), <i>IL-1α</i> (C) mittels ELISA bestimmt. Die fache Sekretion ergibt sich anhand des Vergleiches mit der unbehandelten, nicht infizierten Kontrolle des gleichen Zeitpunktes. Statistische Signifikanzen resultieren aus dem Vergleich der Infektionskontrolle mit dem jeweiligen Behandlungswerten des gleichen Zeitpunktes wobei für p-Werte $\leq 0,001$ „***“, für $p \leq 0,01$ „**“ und für $p \leq 0,05$ „*“ stehen.	96

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: **PD Dr. Cornelia Wiegand, Dr. Kirsten Reddersen**

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers