

Universität Greifswald  
Medizinische Fakultät

**Die Wirkung physikalischen Plasmas  
auf die Hämostase und Physiologie des Thrombozyten  
in humanem Vollblut**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Greifswald

angefertigt am Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie (INP)  
Abteilung ZIK *plasmatis* „Plasma-Redox-Effekte“ und der  
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-,  
Thorax- und Gefäßchirurgie der Universitätsmedizin Greifswald  
(Direktor Prof. Dr. med. Stephan Kersting, MBA)

vorgelegt von  
Broder Poschkamp  
geboren am 17.02.1997  
in Waren (Müritz)  
Greifswald, den 01.05.2023



Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Stephan Kersting

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Datum der Disputation: 23.11.2023



# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS UND GLOSSAR .....</b>	<b>III</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1. BLUT UND BLUTGERINNUNG .....	- 1 -
1.2. DER THROMBOZYT .....	- 2 -
1.2.1. Allgemeine Informationen und Struktur .....	- 2 -
1.2.2. Thrombozyten im Kontext der Blutgerinnung und deren Aktivierung .....	- 3 -
1.2.3. Signalwege der Thrombozytenaktivierung .....	- 4 -
1.3. KALTES PHYSIKALISCHES PLASMA .....	- 9 -
1.4. BLUTGERINNUNG DURCH GAS-PLASMA .....	- 10 -
<b>2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>- 13 -</b>
<b>3. MATERIALIEN .....</b>	<b>- 14 -</b>
3.1. LABORGERÄTE.....	- 14 -
3.2. VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	- 15 -
3.3. CHEMIKALIEN UND PUFFER .....	- 15 -
3.4. ANTIKÖRPER.....	- 16 -
3.5. GASE.....	- 16 -
3.6. ASSAY KITS .....	- 16 -
3.7. SOFTWARE, DATENBANKEN .....	- 17 -
<b>4. METHODEN .....</b>	<b>- 18 -</b>
4.1. EXPERIMENTELLE ÜBERSICHT UND METHODEN .....	- 18 -
4.2. BLUTABNAHME UND PROBANDENBESCHREIBUNG .....	- 19 -
4.3. PROBENAUFBEREITUNG .....	- 20 -
4.4. BEHANDLUNG MIT GAS-PLASMA.....	- 21 -
4.5. DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....	- 21 -
4.5.1. Messung der Thrombozytenaktivierung .....	- 22 -
4.5.2. Thrombozytenaktivierung bei unterschiedlichen Konditionen .....	- 24 -
4.5.3. Messung der Erythrozytenanzahl .....	- 25 -
4.5.4. Mitochondriales Membranpotenzial .....	- 26 -
4.6. IMAGING-CYTOMETRY .....	- 27 -
4.6.1. Messung der Thrombozytenaktivierung .....	- 27 -
4.6.2. Messung der gewichteten Thrombozytenaggregation .....	- 28 -
4.7. TEMPERATURMESSUNG MITTELS INFRAROTKAMERA.....	- 30 -
4.8. OPTISCHE EMISSIONSSPEKTROSKOPIE .....	- 31 -
4.9. SPEKTROSKOPIE DES HÄMOGLOBINS UND DESSEN ANALYSE .....	- 32 -
4.10. STATISTIK.....	- 35 -

<b>5. ERGEBNISSE.....</b>	<b>- 36 -</b>
5.1. GAS-PLASMA-VERMITTELTE THROMBOZYTENAKTIVIERUNG .....	- 36 -
5.1.1. Nachweis der Thrombozytenaktivierung mittels Durchflusszytometrie.....	- 36 -
5.1.2. Nachweis der Thrombozytenaktivierung mittels Imaging-Cytometry.....	- 38 -
5.2. TEMPERATUR.....	- 40 -
5.3. UNTERSUCHUNG DER REAKTIVEN SPEZIES .....	- 42 -
5.4. VERÄNDERUNGEN DES MITOCHONDRIALEN MEMBRANPOTENTIALS.....	- 44 -
5.5. UNTERSUCHUNG DER SIGNALKASKADE.....	- 45 -
5.5.1. Konzentrationsfindung von Inhibitoren der Signaltransduktion .....	- 45 -
5.5.2. Inhibition der Signaltransduktion.....	- 48 -
5.6. HÄMOGLOBIN-EXPERIMENTE .....	- 50 -
5.6.1. Hämoglobin-Untersuchungen in Blutüberständen.....	- 50 -
5.6.2. Untersuchung der Wirkung von Gas-Plasma auf Blut-Lysate.....	- 52 -
5.7. HÄMOLYSE .....	- 54 -
5.7.1. Quantifizierung der Hämolyse und Stimulation der Thrombozyten .....	- 54 -
5.7.2. Gas-Plasma-Wirkung in PRP.....	- 56 -
<b>6. DISKUSSION .....</b>	<b>- 58 -</b>
6.1. HÄMOLYSE ALS MEDIATOR DER GAS-PLASMA-VERMITTELTEN THROMBOZYTENAKTIVIERUNG....	- 58 -
6.2. UNTERSUCHUNG DER SIGNALTRANSDUKTION DER THROMBOZYTEN .....	- 60 -
6.3. REAKTIVE SPEZIES ALS VERMITTLER DER WIRKUNG VON GAS-PLASMA .....	- 64 -
6.4. PHYSIKALISCHE ÄNDERUNGEN BEI GAS-PLASMA-BEHANDLUNG.....	- 66 -
6.5. GAS-PLASMA ZUR BLUTGERINNUNG IN KLINISCHER PRAXIS.....	- 68 -
<b>7. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>- 71 -</b>
<b>8. APPENDIX .....</b>	<b>72</b>
8.1. NOMENKLATORISCHE HINWEISE UND ÜBERSICHT DER REAKTIVEN SPEZIES .....	72
8.2. FAHRTISCHPROGRAMM.....	74
8.3. ERWEITERTE STATISTISCHE INFORMATIONEN .....	75
8.3.1. Zeitabhängigkeit der Thrombozytenaktivierung.....	75
8.3.2. Untersuchung der Temperatur bei Behandlung mit Gas-Plasma .....	75
8.4. EINFLUSS VON N-ACETYLCYSTEIN AUF HÄMOGLOBIN.....	76
<b>9. BIBLIOGRAFIE .....</b>	<b>77</b>
<b>10. ERKLÄRUNG AN EIDES STATT .....</b>	<b>94</b>
<b>11. DANKSAGUNG .....</b>	<b>95</b>

## Abkürzungsverzeichnis und Glossar

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µl	Mikroliter
-A	<i>-area</i> (engl.: Fläche; Analysemethode, bei der die Signalfäche berechnet wird)
AC	Adenylatcyclase
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (engl.: Varianzanalyse)
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester)
BF	<i>brightfield</i> (engl.: Hellfeldaufnahme)
BL	Blut-Lysat
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumion
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
Cy	Cyanine (Farbstoff)
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DBD	<i>dielectric barrier discharge</i> (engl.: dielektrische Barriereentladung), Bautyp einer Gas-Plasma Quelle
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (engl.: Desoxyribonukleinsäure)
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> (engl.: Rezeptor des Epidermiswachstumsfaktors)
engl.	englisch
et al.	<i>et alii</i> (lat.: und andere)
FCCP	Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
FL	Fluoreszenzkanal

FSC	<i>forward scatter</i> (engl.: Vorwärtsstreulicht)
g	Lastvielfaches (Vielfaches der Fallbeschleunigung)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
-H	<i>-height</i> (engl.: Höhe/Größe; Analysemethode, bei der die Höhe des Signals berechnet wird)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
HBDDE	2,2',3,3',4,4'-Hexahydroxy-1,1'-biphenyl-6,6'-dimethanol dimethyl ether
InEK	Institut für das Entgeltsystem im Krankenhaus
IP	<i>impact plate</i> , Mikrotiterplatte mit kleinerem Füllvolumen
IP-Rezeptor	Prostacyclin-Rezeptor
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IU	International Unit (Einheit der biologischen Aktivität)
KHEntgG	Krankenhausentgeltgesetz
lat.	lateinisch
LED	<i>light-emitting diode</i> (engl.: Leuchtdiode)
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
min	Minute
ml	Milliliter
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
MLCP	Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase
ms	Millisekunden
MT	MitoTracker (Farbstoff)
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
mW	Milliwatt
NAC	N-Acetylcystein
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
ns	nicht signifikant
NUB	neue Untersuchungs- und Behandlungsmethode
PAR	Protease-aktivierter-Rezeptor

PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (engl.: Phosphatgepufferte Salzlösung)
PDE	Phosphodiesterase
PE	Phycoerythrin
PG I <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub> (syn.: Prostacyclin)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase-A
PKC	Proteinkinase-C
PKG	Proteinkinase-G
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase-A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase-C
PPP	<i>platelet poor plasma</i> (engl.: thrombozytenarmes Blutplasma)
PRP	<i>platelet rich plasma</i> (engl.: thrombozytenreiches Blutplasma)
RNS	<i>reactive nitrogen species</i> (engl.: reaktive Stickstoff Spezies)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (engl.: reaktive Sauerstoff Spezies)
s	Sekunden
SD	<i>standard deviation</i> (engl.: Standardabweichung)
SEM	<i>standard error of the mean</i> (engl.: Standardfehler)
sGC	<i>soluble guanylate cyclase</i> (engl.: lösliche Guanylcyclase)
slm	Standard-Liter pro Minute (Einheit des Gasmengenstroms)
SOD	Superoxiddismutase
SSC	<i>side scatter</i> (engl.: Seitwärtsstreulicht)
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>
syn.	synonym
TP	Thromboxan-Rezeptor
TxA <sub>2</sub>	Thromboxan-A <sub>2</sub>
VB	Vollblut
vWF	von-Willebrand-Faktor
Well	Einbuchtung einer Mikrotiterplatte

WPA

*weighted platelet aggregation* (engl.: gewichtete  
Thrombozytenaggregation)

# **1. Einleitung**

## **1.1. Blut und Blutgerinnung**

Blut ist eine Körperflüssigkeit und wird als flüssiges Gewebe bezeichnet. Neben den Blutzellen enthält es Proteine, Lipoproteine, Kohlenhydrate und Mineralien. Die Zellen nehmen einen Volumenanteil von 45 % des Blutes ein und in einem Mikroliter befinden sich ca. vier Millionen Erythrozyten (rote Blutzellen, 93 %), 300.000 Thrombozyten (Blutplättchen, 7 %) und 8.000 Leukozyten (weiße Blutzellen, 0,1 %). Blut übernimmt eine wichtige Funktion als Transportmedium. Beispielsweise transportiert es Sauerstoff von der Lunge in die Peripherie des Körpers, Glucose von der Leber zum Gehirn und Immunzellen zum Entzündungsherd [1]. Eine weitere Funktion ist die Aufrechterhaltung einer geschlossenen Körperoberfläche bei Verletzungen. Dies wird durch die Blutgerinnung (syn.: Koagulation) ermöglicht. Der Verlauf der Blutgerinnung hängt jedoch stark davon ab, in welchem Teil des Kreislaufs sich die Läsion befindet. Bei Schädigung von venösen Gefäßen bildet sich ein fibrinreicher Thrombus, in welchem viele Erythrozyten eingeschlossen werden. Dies wird durch Protein-Protein-Wechselwirkungen ermöglicht, welche final Fibrinogen zu Fibrin umwandeln. Wird das arterielle Stromgebiet lädiert, bildet sich ein Gerinnsel aus Thrombozyten. Der Prozess wird durch den Kontakt zu extravasalen Bereichen initiiert [2, 3].

## 1.2. Der Thrombozyt

### 1.2.1. Allgemeine Informationen und Struktur

Thrombozyten sind eine besondere Zellart im menschlichen Körper. Die Zellen entstehen aus der Abschnürung von Megakaryozyten im Knochenmark sowie in der Lunge und werden in den Blutkreislauf abgegeben [4, 5]. Ihre Lebensdauer beträgt ca. 10 Tage. Sie weisen eine Größe von 1,5-3  $\mu\text{M}$  auf und sind diskoidal geformt [6].

Sie besitzen keinen Zellkern, enthalten jedoch Ribosomen, mRNA aus den Megakaryozyten und Mitochondrien mit mitochondrialem Genom. Sie sind dadurch zu einer eigenen Proteinsynthese befähigt [7].

Im Zentrum der Zelle befinden sich zahlreiche Vesikel, die zusammengefasst als Granulomer<sup>1</sup> bezeichnet werden [8]. Die Vesikel werden in  $\alpha$ - und *dense*-Granula<sup>2</sup> geteilt, weithin kommen Peroxisomen und Lysosomen vor.

Der Außenbereich der Zelle ist frei von Organellen und wird Hyalomer genannt [8]. Hier befinden sich zahlreiche Aktinfilamente und ein zirkumferentielles Band aus Mikrotubuli [11]. Die Zellmembran besitzt Einstülpungen bis zum Granulomer ins Innere der Zelle. Diese Invaginationen werden zusammen als offenes kanalikuläres System (OCS, engl.: open canalicular system) bezeichnet und enthalten Extrazellularlumen sowie eine Glykokalyx [12]. Das OCS dient als Reserve für Plasmamembran, zur direkten Ausschüttung des Inhalts von Vesikeln und wird verwendet, um Pathogene aufzunehmen[13].<sup>3</sup>

Daneben gibt es ein weiteres Membransystem, welches sich im Inneren des Thrombozyten befindet und sich aus dem glatten endoplasmatischen Retikulum des Megakaryozyten bildete. Das sogenannte „dichte Röhrensystem“ (engl.: *dense tubular system*) speichert Kalziumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ), welche ins Intrazellularlumen abgegeben werden können [14].

Reste des Golgi-Apparates des Megakaryozyten befinden sich in weniger als 1 % der Thrombozyten und raues endoplasmatisches Retikulum kommt nur pathologisch in Thrombozyten vor [3].

---

<sup>1</sup> Die Unterteilung zwischen Granulomer und Hyalomer wird überwiegend in der deutschsprachigen Literatur vorgenommen.

<sup>2</sup> Die Einteilung intrazellulärer Membrankomplexe wurde nach der Elektronendichte in der Elektronenmikroskopie vorgenommen und die Bezeichnung wurde mit Hilfe des griechischen Alphabet festgelegt:  $\alpha$ -Granula (Speichervesikel),  $\beta$ -Granula (Mitochondrien),  $\gamma$ -Granula (kleine Vesikel: Lysosomen, Peroxisomen),  $\delta$ -Granula (syn.: *dense*-Granula, Speichervesikel) [9, 10].

<sup>3</sup> Da die Bakterien nicht intrazellulär aufgenommen werden, sondern im OCS verharren, werden Thrombozyten analog zu „*phagocytes*“ auch „*covercytes*“ genannt [13].

### 1.2.2. Thrombozyten im Kontext der Blutgerinnung und deren Aktivierung

Die Thrombozyten sind durch ihre Struktur stark an ihre Funktionen angepasst. Sie besitzen eine Rolle in der Blutgerinnung, Immunabwehr und Steuerung der Inflammation [15].

Bei einer arteriellen Gefäßläsion kommt es zu einer Interaktion von „von-Willebrand-Faktor“ (vWF) und Kollagen aus extravasalen Regionen [16]. Durch die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes werden Bindungsstellen am vWF für Thrombozyten freigelegt [17–19].

Im arteriellen Stromgebiet werden die Blutplättchen aufgrund ihrer kleineren Größe, verglichen mit den anderen Blutzellen, nahe der Gefäßwand transportiert. Dadurch können Thrombozyten bei einer Gefäßläsion Kontakt zu den Bindungsstellen des vWF erhalten.<sup>4</sup> Es bildet sich eine erste Schicht aus Thrombozyten, welche durch die Interaktion mit vWF und Kollagen aktiviert werden [20].

Die Thrombozytenaktivierung ist eine Antwort der Thrombozyten, die die Blutgerinnung einleitet. Dabei bedingen komplexe biochemische Reaktionen innerhalb des Thrombozyten vielseitige Veränderungen, unter anderem die Ausbildung von Pseudopodien, Veränderung der Plasmamembran und die Ausschüttung von Vesikeln [21].

Dies dient der Rekrutierung von weiteren Thrombozyten, welche sich an die erste Schicht von Thrombozyten anheften und der Schaffung einer strömungsarmen Umgebung, in welcher die Ausbildung von Fibrin stattfinden kann, um den sich bildenden Thrombus weiter zu festigen. Zu den ausgeschütteten Vesikeln der Thrombozyten gehören unter anderem  $\alpha$ - und *dense*-Granula. Die alpha-Granula enthalten beispielsweise Plättchen Faktor 4 (PF4) sowie P-Selektin (CD62P) und die *dense*-Granula Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP),  $\text{Ca}^{2+}$  und Serotonin [9, 19, 22]. Somit werden nicht nur Signalmoleküle in die Umgebung abgegeben, sondern auch Rezeptoren auf der Oberfläche der Thrombozyten externalisiert, die sonst nicht vorhanden sind. Der Nachweis der Rezeptoren, wie z. B. CD62P, wird laborchemisch genutzt, um den Umfang der aktivierten Thrombozyten zu quantifizieren [23].

---

<sup>4</sup> Die Offenlegung der Bindungsstellen des vWF mit der Bindung des Thrombozyten ist ein zentraler Prozess der Blutgerinnung im arteriellen System. Bei den hohen Strömungsgeschwindigkeiten des Blutes ist eine alleinige Bildung eines fibrinreichen Thrombus, aufgrund eines Auswascheffektes der löslichen Komponenten, nicht möglich. Auf diesen Mechanismen ist es zurückzuführen, dass Antikoagulantien, die die Thrombozyten betreffen, vor allem in Gefäßen mit hohen Strömungsgeschwindigkeiten des Blutes wirken [19].

### 1.2.3. Signalwege der Thrombozytenaktivierung

Im Folgenden wird auf verschiedene Signalwege eingegangen, welche eine Aktivierung der Thrombozyten hervorrufen.<sup>5</sup>

Im Allgemeinen werden über Rezeptoren Signaltransduktionsprozesse im Thrombozyten ausgelöst, welche verschiedene Reaktionen des Thrombozyten zur Folge haben. Rezeptorgruppen, die der Thrombozyt exprimiert, sind unter anderem G-Protein gekoppelte Rezeptoren [25–32], Liganden-abhängige Ionenkanäle [33, 34], ITAM-Rezeptoren [35, 36] und Rezeptoren, welche aus verschiedenen Glykoproteinen zusammengesetzt sind [37–39].

Die an der Aktivierung der Thrombozyten beteiligten Signalkaskaden lassen sich in fünf wichtige Komponenten einteilen:

1. Aktivierung der Proteinkinase-C (PKC-Signalweg)
2. Aktivierung des monomeren G-Proteins Rho (Rho-Signalweg)
3. Reduktion der zyklischen Adenosinmonophosphat Konzentration (cAMP-Signalweg)
4. Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K-Signalweg)
5. Stickstoffmonoxid und dessen Folgereaktionen (NO-Signalweg).

Es ist unbedingt zu beachten, dass die verschiedenen Signalwege durch mehrere Rezeptoren beeinflusst werden können, die teilweise unterschiedliche Isoformen des gleichen Enzyms aktivieren und stark miteinander wechselwirken. Die Signaltransduktion wird häufig über G-Proteine initiiert, welche mehrere Untereinheiten besitzen, die unterschiedlich reagieren können. Die wichtigsten G-Proteine sind  $G_q$ ,  $G_i$ ,  $G_{13}$ <sup>6</sup>,  $G_z$  und  $G_s$  [40].

In der Arbeit wurden einzelne Abschnitte von Signalkaskaden mittels Inhibitoren gehemmt und zu den Wirkstoffen wurde eine Tabelle erstellt (**Tabelle 1**). Die wichtigsten Schritte der jeweiligen Signalkaskaden wurden in einer Abbildung festgehalten (**Abbildung 1**).

---

<sup>5</sup> Die Vielzahl an physiologischen und synthetischen Agonisten sowie die Möglichkeit der Beschreibung von genauesten Proteinwechselwirkungen führt dazu, dass eine Übersicht über die Signalwege des Thrombozyten immer eine Vereinfachung beinhaltet. Es wurden nur die wichtigsten Zwischenschritte, Agonisten und die für das Verständnis wichtigen Reaktionen thematisiert. Eine Generalisierung der dargestellten Reaktionen ist nicht uneingeschränkt möglich, da es unterschiedliche Isoformen der Enzyme gibt, die teilweise andere Wirkungen bedingen können [24].

<sup>6</sup>  $G_{13}$  gehört zur  $G_{12}$ -Familie. Innerhalb der  $G_{12}$ -Familie kommt  $G_{13}$  die höchste Bedeutung in der Physiologie des Thrombozyten zu, weshalb von  $G_{13}$  gesprochen wird.  $G_z$  gehört zur  $G_i$ -Familie [40].

#### 1.2.3.1. Aktivierung der Proteinkinase-C

Die  $\alpha$ -Untereinheit von  $G_q$  oder die  $\beta/\gamma$ -Untereinheit von  $G_i$  sorgen für eine Aktivierung der Phospholipase-C  $\beta$  (PLC  $\beta$ ). Die PLC  $\beta$  bildet aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) [40].

Das DAG aktiviert nachfolgend die Proteinkinase-C (PKC) [41]. Das Enzym beeinflusst über Phosphorylierung weitere Reaktionen, wie die Thromboxan-A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) Synthese, die Sekretion von Vesikeln und die Aktivierung der Phosphodiesterase (PDE) [24, 42, 43].

IP<sub>3</sub> führt über Bindung an IP<sub>3</sub>-Rezeptoren des *dense tubular system* zu einer Ausschüttung von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup>. Das Ca<sup>2+</sup> selbst vermittelt intrazellulär vielfältige Reaktionen, wie einen Ca<sup>2+</sup>-Influx von extrazellulär über Stim1-Orail-Wechselwirkung oder der Aktivierung von Integrinen [44, 45].

#### 1.2.3.2. Aktivierung des monomeren G-Proteins Rho

Die  $\alpha$ -Untereinheit vom G<sub>13</sub>-Protein sorgt für eine Aktivierung von Rho. Das monomere G-Protein Rho vermittelt über mehrere Zwischenschritte eine Aktinpolymerisierung und eine Hemmung der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP). Dies hat eine relative Erhöhung der Aktivität der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) zur Folge, wodurch über vermehrte Aktin-Myosin-Interaktionen eine Formveränderung des Thrombozyten erreicht wird [40, 41]. Bei der Formveränderung kommt Ca<sup>2+</sup> ebenfalls eine Rolle zu, worauf nicht weiter eingegangen werden soll.

#### 1.2.3.3. Reduktion der zyklischen Adenosinmonophosphat Konzentration

Die  $\alpha$ -Untereinheit vom G<sub>s</sub>-Protein vermittelt eine Aktivierung der Adenylatcyclase (AC), welche die Reaktion von Adenosintriphosphat (ATP) zum zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert. Durch die Bindung von cAMP an der Proteinkinase-A (PKA) wird die enzymatische Aktivität des Enzyms ermöglicht [46]. Die PKA vermittelt vielfältige Reaktionen, wie die Reduktion der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und der Verringerung der Formveränderung des Thrombozyten [47, 48]. Die Erhöhung der cAMP-Konzentration über die AC mit den nachfolgenden Reaktionen würde die Aktivierung der Thrombozyten verringern. Die AC kann jedoch inhibiert werden, was eine relative Reduktion der cAMP-Konzentration zur Folge hat und dadurch zu der Thrombozytenaktivierung beiträgt [49].

#### 1.2.3.4. *Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase*

Die  $\beta/\gamma$ -Untereinheit von  $G_i$  kann eine Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) vermitteln [50]. Die Aktivierung der PI3K ist ebenfalls durch das Glykoprotein-VI (GPVI) und den Rezeptorkomplex GPIb-IX-V möglich [39, 51]. In der weiteren Signalkaskade des GPVI kommt mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) eine Rolle bei der Thrombozytenaktivierung zu [52].

Die PI3K verursacht eine Aktivierung der PLC  $\gamma$ , spielt in der Integrin-Aktivierung eine Rolle und kann über Akt die vermehrte Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) durch die NO-Synthase (NOS) bewirken [53–55].

#### 1.2.3.5. *Stickstoffmonoxid und dessen Folgereaktionen*

NO kann als ungeladenes Gas über Zellmembranen diffundieren [56]. Die Wirkung von NO und dessen Folgereaktionen wirken biphasisch. Initial wirkt es aktivierend, während es bei fortschreitender Blutgerinnung die Aktivierung verringert [57].

Im Folgenden wird auf die aktivierende Wirkung der Thrombozyten eingegangen. NO wirkt an der löslichen Guanylcyclase (sGC), dadurch wird die Bildung vom zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) katalysiert [58].

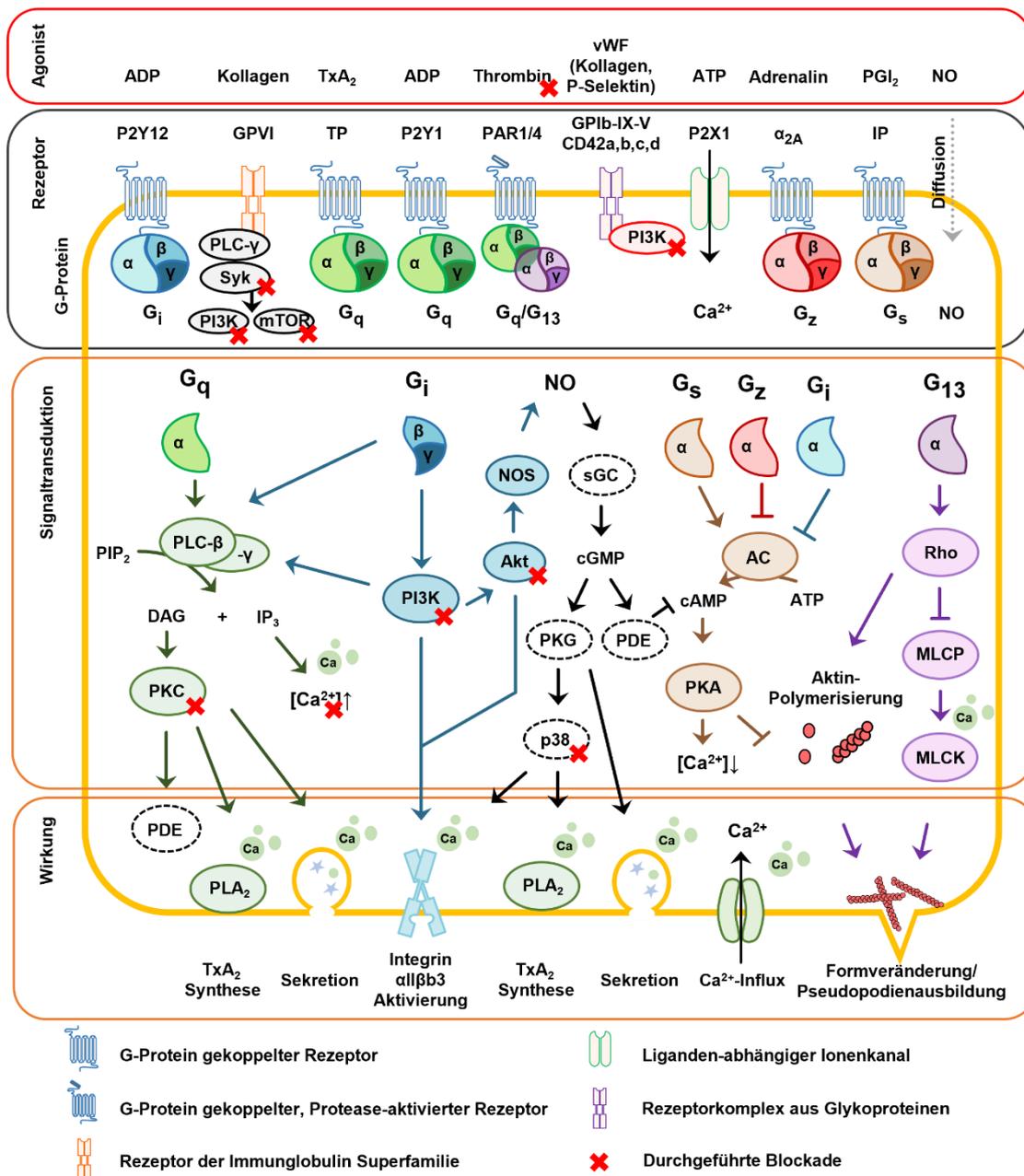
cGMP bewirkt über eine PDE einen Abbau von cAMP und die Aktivierung von der Proteinkinase-G (PKG), welche über mehrere Zwischenschritte p38 aktiviert [41]. Die Kinase p38 bewirkt eine Integrinaktivierung und über die Phospholipase-A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) mit dessen Folgereaktionen eine TxA<sub>2</sub>-Synthese [59, 60].

#### 1.2.3.6. *Auswirkungen der Thrombozytenaktivierung*

Die Ausschüttung von Vesikeln dient dazu, weitere Thrombozyten zu aktivieren, neue Thrombozyten zu rekrutieren und einen Inflammationsprozess zu steuern. Die TxA<sub>2</sub>-Synthese dient ebenso der weiteren Aktivierung von Thrombozyten. Bei diesem Prozess werden Rezeptoren externalisiert und Integrine aktiviert, die die Vernetzung der Thrombozyten untereinander fördern. Weiterhin bedingt die Formveränderung eine bessere Anhaftung an den sich bildenden Thrombus [61].

**Tabelle 1: Inhibitoren und deren Wirkort**

<b>Inhibitor</b>	<b>Wirkort</b>	<b>Komponente der Signalkaskade</b>
<b>BAPTA</b>	<b>intrazelluläres Ca<sup>2+</sup> [62]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PKC-Signalweg</b></li> <li>• <b>Rho-Signalweg</b></li> <li>• <b>cAMP-Signalweg</b></li> <li>• <b>PI3K-Signalweg</b></li> <li>• <b>NO-Signalweg</b></li> </ul>
<b>BML-257</b>	<b>Akt (1, 2, 3) [63]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PI3K-Signalweg</b></li> </ul>
<b>D-Erythro-Sphingosine</b>	<b>PKC [64]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PKC-Signalweg</b></li> </ul>
<b>GF 109203X</b>	<b>PKC (<math>\alpha</math>, <math>\beta</math>I&amp;II, <math>\gamma</math>) [65]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PKC-Signalweg</b></li> </ul>
<b>HBDDE</b>	<b>PKC (<math>\alpha</math>, <math>\gamma</math>) [66]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PKC-Signalweg</b></li> </ul>
<b>Ly294002</b>	<b>PI3K [67]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PI3K-Signalweg</b></li> </ul>
<b>MK-2206</b>	<b>Akt (1, 2, 3) [68]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PI3K-Signalweg</b></li> </ul>
<b>Piceatannol</b>	<b>Syk [69]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>GPVI-vermittelter Signalweg</b></li> </ul>
<b>Rapamycin</b>	<b>mTOR [70]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>GPVI-vermittelter Signalweg</b></li> </ul>
<b>Rotterlin</b>	<b>PKC (<math>\delta</math>) [71]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PKC-Signalweg</b></li> </ul>
<b>SB-203580</b>	<b>P38 <math>\alpha</math> &amp; <math>\beta</math> [72]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PI3K-Signalweg</b></li> <li>• <b>NO-Signalweg</b></li> </ul>
<b>Staurosporin</b>	<b>Kinasen (nicht spezifisch) [73]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PKC-Signalweg</b></li> <li>• <b>Rho-Signalweg</b></li> <li>• <b>cAMP-Signalweg</b></li> <li>• <b>PI3K-Signalweg</b></li> <li>• <b>NO-Signalweg</b></li> </ul>
<b>Tricibin</b>	<b>Akt (1, 2, 3) [74]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PI3K-Signalweg</b></li> </ul>
<b>Wortmannin</b>	<b>PI3K [75]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PI3K-Signalweg</b></li> </ul>
<b>Z-VAD-FMK</b>	<b>Caspasen [76]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Apoptose</b></li> </ul>



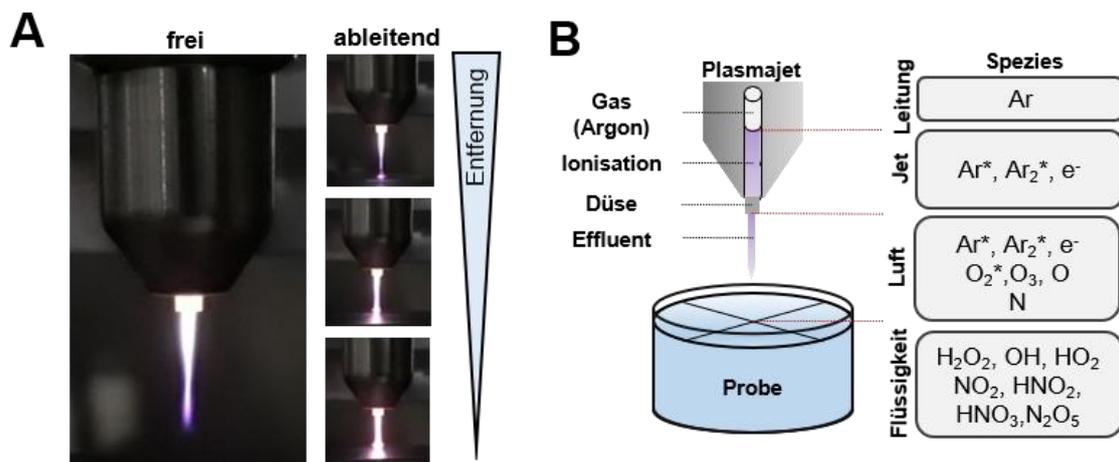
**Abbildung 1: Schema der Signaltransduktion der Thrombozytenaktivierung**

Es wurde eine Übersicht zu den Signaltransduktionsprozessen der Aktivierung des Thrombozyten erstellt. Das Schema wurde in die Bereiche Agonist, Receptor, Signaltransduktion und Wirkung unterteilt. Dabei wurden die Agonisten über dem Receptor und die jeweiligen Initiatoren der intrazellulären Wirkung unterhalb des Receptors platziert. Es wurden nur wichtige Zwischenreaktionen der Signaltransduktion in die Abbildung mit aufgenommen und die jeweilige Kaskade farblich hervorgehoben. Die Signaltransduktion wurde im Fließtext erklärt. Alle Reaktionen, an welchen  $Ca^{2+}$  beteiligt ist, wurden durch ein eigenes Symbol beschriftet. Ein spitzer Pfeil kennzeichnet eine Erhöhung und ein stumpfer Pfeil die Verringerung der Wirkung der nachfolgenden Einheit. Die Bezeichnung „Durchgeführte Blockade“ beschreibt eine Inhibition, welche in dieser Arbeit vollzogen wurde. Folgende Abkürzungen sind nicht im Fließtext enthalten: IP Prostacyclin-Rezeptor, PAR Protease-aktivierter-Rezeptor, PGI<sub>2</sub> Prostaglandin-I<sub>2</sub>, TP Thromboxan-Rezeptor, Syk (engl.: *spleen tyrosine kinase*). Ein Teil der Abbildung wurde mit Hilfe eines *Motifolio-Illustration-Toolkits* ([www.motifolio.com](http://www.motifolio.com)) erstellt.

### 1.3. Kaltes physikalisches Plasma

Die Bezeichnung des physikalischen Plasmas stammt von Irving Langmuir [77]. Es beschreibt ein energiereiches Gas, in welchem ionisierte Atome vorliegen. Aufgrund der Wortgleichheit zwischen Blutplasma und physikalischem, gasförmigen Plasma wird das kalte physikalische Plasma nachfolgend als Gas-Plasma bezeichnet. Gas-Plasma wird häufig als vierter Aggregatzustand aufgefasst, welcher mittels Energiezufuhr zu der gasförmigen Phase erreicht werden kann [78]. Im Allgemeinen wird der Plasmazustand erst durch sehr hohe Energiezufuhr und Temperatur realisiert. Es ist jedoch möglich durch unterschiedliche Bauvarianten, wie dem Plasmajet oder der dielektrisch behinderten Entladung (engl.: *dielectric barrier discharge*, DBD), Gas-Plasma zu erzeugen, welches eine Anwendungstemperatur im Bereich von 35-40°C besitzt [79]. Gas-Plasma wechselwirkt mit seiner Umgebung. Die Komponenten, die die Wirkung entfalten sind: UV- und Wärmestrahlung, elektrische Felder, Temperatur sowie reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies (ROS, RNS)[79].<sup>7</sup> Zu Letztgenannten gehören unter anderem Ozon, Superoxidanion, Hydroxylradikale, Wasserstoffperoxid, Stickstoffmonooxid, Nitrit und Nitrat [80–82].

Biomedizinische Anwendungsfelder vom Gas-Plasma sind in der Wundheilung und Hygiene zu finden [83, 84]. Weiterhin wurde die Verwendung im Bereich der Onkologie und der Blutgerinnung untersucht [85, 86].



**Abbildung 2: Plasmaquelle und dessen Spezies**

Es wurde ein repräsentatives Bild der verwendeten Plasmaquelle abgebildet. Es ist eine Quelle vom Typ des Plasmajets. Durch den Plasmajet wird Argon geleitet, welches zu Gas-Plasma angeregt wird. Das Gas-Plasma wird durch eine Keramikdüse nach außen geführt und wird als Effluent sichtbar (A, links). Die Behandlungsart wird in ein freies und ein ableitendes Regime unterteilt. Beim ableitenden Behandlungsregime hat der Effluent direkten Kontakt zur Probe. Es wurden Aufnahmen mit unterschiedlichen Entfernungen zur behandelten Oberfläche abgebildet (A, rechts). Weiterhin wurde eine schematische Abbildung erstellt, die die reaktiven Spezies im Gas und in der Flüssigkeitsphase beschreibt (B).

<sup>7</sup> Es wurde eine Übersicht der ROS und RNS erstellt sowie nomenklatorische Schwierigkeiten in dem Appendix angesprochen.

## 1.4. Blutgerinnung durch Gas-Plasma

Es wurde eine Tabelle mit den wichtigsten Erkenntnissen zur Gas-Plasma-vermittelten Blutgerinnung erstellt (**Tabelle 2**).

Die Koagulation durch Gas-Plasma wurde zuerst im Jahr 2005 beschrieben [87]. Zunächst wurde der gerinnungsfördernde Effekt auf die Bereitstellung von  $\text{Ca}^{2+}$  zurückgeführt [88]. Die Hypothese wurde für kürzere Behandlungszeiten widerlegt und es wurde beschrieben, dass Fibrinogen direkt zu Fibrin gespalten wird. Der Nachweis erfolgte durch die Aggregatbildung einer Fibrinogenlösung im Puffermedium nach Behandlung mit Gas-Plasma. Gleichzeitig wurde der Einfluss der Temperatur (durch Abschirmung mit einer dünnen Alufolie) und von elektrischen Feldern (mit Hilfe einer dünnen Glasscheibe) negiert<sup>8</sup>, sodass als Vermittler der Plasmawirkung reaktive Spezies vermutet wurden [89].

Unter der Verwendung von Scanning-Elektron-Mikroskopie (SEM) und makroskopischer Begutachtung an thrombozytenreichem Blutplasma (engl.: *platelet-rich-plasma*, PRP) wurde eine gerinnungsfördernde Wirkung auf Thrombozyten festgestellt [89, 90]. Im Zuge der Untersuchung der Nebenwirkungen von Gas-Plasma wurde beschrieben, dass Gas-Plasma Blutzellen lysiert, wobei die Zellarten unterschiedlich stark betroffen scheinen [91]. Daneben ist bekannt, dass Hämolyse zu einer Aktivierung von Thrombozyten führen kann [92, 93].

Anschließend wurde eine Membranbildung nach Behandlung mit Gas-Plasma festgestellt und eine Proteinaggregation beschrieben [94, 95]. Dabei wurde als weiterer Wirkmechanismus, neben den physiologischen Gerinnungsprozessen, eine Membranbildung aus lysierten Erythrozyten dargestellt. Die Membranbildung ist jedoch abhängig von der verwendeten Plasmaquelle [96].

Die blutstillende Wirkung von Gas-Plasma wurde bereits in einigen Tiermodellen untersucht. Dazu gehört die suffiziente Blutstillung an der *Vena saphena* von Mäusen [97], Lebern von Ratten und Mäusen [85, 94, 98], sowie der Milz von Hasen [99].

In den letzten Jahren finden sich einzelne Fallberichte, bei welchen Gas-Plasma in der Chirurgie am Menschen eingesetzt wurde. Es wurde in der plastischen Gesichtschirurgie, zur chirurgischen Behandlung eines Rhinophyms und Basalzellkarzinoms sowie zur Endarteriektomie der Carotis verwendet [100, 101].

Bei *in-vitro* Untersuchungen an murinem Blut wurden Thrombozyten als wesentlicher Mediator der Blutgerinnung durch Gas-Plasma identifiziert, weshalb sich die Arbeit primär den humanen Thrombozyten widmet [85]. Im Mausmodell wurde unter Medikation mit neuen

---

<sup>8</sup> Bei den Experimenten diente die Abschirmung dazu, ausschließlich die Temperatur, bzw. die elektrischen Felder, wirken zu lassen, wodurch sich keine Blutgerinnung erzeugen ließ.

oralen Antikoagulantien (NOAC) bei der Verwendung von Gas-Plasma eine suffiziente Blutgerinnung erreicht und dadurch rückte Gas-Plasma näher in den Fokus der chirurgischen Gerinnungsforschung und im Interesse ist nun der Transfer der Grundlagenforschung in den klinischen Alltag („bench-to-bedside-transfer“) [85]. Daher werden nun *in-vitro* Untersuchungen an menschlichem Blut durchgeführt, um einen Wirkungsmechanismus zu demaskieren.

**Tabelle 2: Übersicht wichtiger Publikationen zur Blutgerinnung mit Gas-Plasma nach Jahr**

<b>Jahr/ Autor</b>	<b>Plasmaquelle</b>	<b>Modell</b>	<b>Ergebnisse</b>
<b>2005/ Fridman[87]</b>	DBD-Plasma	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vorstellung von Gas-Plasma zur Blutgerinnung (Konferenz)</li> </ul>
<b>2006/ Fridman[88]</b>	DBD-Plasma	<i>in-vitro</i> : humanes Blut, <i>ex-vivo</i> : entnommene humane Milz	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Koagulation an humaner Milz</li> <li>• Erhöhung des freien Ca<sup>2+</sup> aus plasmagebundenen Proteinen durch pH-Verringerung</li> <li>• Hypothese: Katalyse der Gerinnungskaskade durch Ca<sup>2+</sup></li> </ul>
<b>2007/ Kalghati[89]</b>	DBD-Plasma	<i>in-vitro</i> : humanes Blut	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Negation von Ca<sup>2+</sup> als Katalysator (Änderung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration erst bei langen Gas-Plasma-Behandlungen)</li> <li>• Koagulation von antikoaguliertem Blut (Citrat)</li> <li>• Negation der pH-Wert-Verringerung als Mediator der Koagulation (Änderung des pH-Wertes erst bei langen Behandlungen)</li> <li>• Negation der Gas-Plasma-Temperatur als Wirkungskomponente</li> <li>• Negation des elektrischen Feldes als Wirkungskomponente</li> <li>• Ausbildung von Pseudopodien der Thrombozyten (Nachweis mittels SEM)</li> <li>• Fibrinnachweis im Thrombus (Nachweis mittels SEM)</li> <li>• Direkte Konversion von Fibrinogen zu Fibrin (Fibrinogenspaltung in gepufferter Lösung nach Gas-Plasma-Behandlung)</li> </ul>
<b>2008/ Fridman[97]</b>	DBD-Plasma	<i>in-vivo</i> : Maus, <i>Vena saphena</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suffiziente Koagulation von Venen im Mausmodell</li> <li>• Koagulation von antikoaguliertem Blut (Heparin, EDTA)</li> </ul>
<b>2009/ Chen-Yen[90]</b>	Plasmajet	<i>in-vitro</i> : humanes Blut	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blutgerinnung nur in thrombozytenreichem Blutplasma (PRP) nicht in thrombozytenarmen Blutplasma (engl.: <i>platelet-poor-plasma</i>, PPP)</li> </ul>
<b>2012/ Baik[91]</b>	Nicht spezifiziert	<i>in-vitro</i> : canines Blut (Hund)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Toxizitätsnachweis des Gas-Plasmas auf Blutzellen</li> <li>• Feststellung eines Suszeptibilitätsunterschieds der toxischen Gas-Plasma-Wirkung auf Leukozyten (Frühe Schädigung: Monozyten, späte Schädigung: basophile, neutrophile Granulozyten, Nachweis durch Volumenänderung der Zellen)</li> <li>• Nachweis der Lyse von Erythrozyten (Hämolyse)</li> </ul>

Jahr/ Autor	Plasmaquelle	Modell	Ergebnisse
2013/ Ikehara[94]	Plasmajet (Sakakita)	<i>in-vivo</i> : Maus, Leber-OP	<ul style="list-style-type: none"> <li>Beschreibung von Membranen bei Koagulation durch Gas-Plasma (Lichtmikroskopie)</li> </ul>
2016/ Miyamoto[96]	Plasmajet (He), BPC-HP1, PN-110/120 TPG	<i>in-vitro</i> : humanes Blut	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hypothese: Bildung von Membranen aus dem Lysat von Erythrozyten</li> <li>Abhängigkeit der Hämolyse von Stromstärke des Plasmagerätes</li> <li>Bildung der Membranen nur bei hoher Stromstärke und langer Behandlungszeit</li> <li>Hypothese: Proteinmembranen aus Erythrozyten als weitere Komponente neben plasmatischer und zellulärer Gerinnung</li> </ul>
2017/ Bekeschus[85]	Plasmajet Argon	<i>in-vitro</i> : Mausblut, <i>in-vivo</i> : Maus, Leber-OP	<ul style="list-style-type: none"> <li>Blutplasma-Parameter nach Gas-Plasma-Behandlung: Ca<sup>2+</sup> konstant, pH bei langer Behandlung erniedrigt, Fibrinogen konstant (heparinisiertes Blut)</li> </ul> <p>Mausmodell:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Gas-Plasma-Koagulation ähnlich schnell, wie Elektrokauterisation</li> <li>Wenig Gewebeschaden, oberflächliche Thrombozytenaggregation, oberflächliche Fibrinogen-Ablagerung</li> <li>Keine Wirkung des Gas-Plasmas bei Clopidogrel-Antikoagulation</li> <li>Identifikation von Thrombozyten als Hauptmediator der Gas-Plasma-vermittelten Blutgerinnung</li> </ul>
2017/ Aleinik[98]	DBD-Plasma	<i>in-vivo</i> : Ratte, Leber-OP	<ul style="list-style-type: none"> <li>Beschreibung des Heilungsprozesses im Verlauf: <ul style="list-style-type: none"> <li>0d: Nekrosen nachweisbar</li> <li>30d: Heilung im Sinne eines <i>restitutio ad integrum</i> (Nachweis: Lichtmikroskopie)</li> </ul> </li> <li>Leber-Blutparameter nach OP: normgerechte Cholestase- und Syntheseparameter, keine Einschränkung der Syntheseleistung der Leber</li> <li>Schwankungen der Glukosekonzentration</li> </ul>
2018/ Bekeschus[102]	Plasmajet	<i>in-vitro</i> : humanes Blut	<ul style="list-style-type: none"> <li>Untersuchung der Gaszusammensetzungen auf die Wirkung des Gas-Plasmas</li> <li>Nachweis der Aggregation von Thrombozyten</li> <li>Mikropartikelnachweis (Exosomen)</li> <li>Thrombozytenaktivierung in heparinisiertem Blut größer als in EDTA-antikoaguliertem Blut</li> </ul>
2018/ Aleinik[99]	DBD-Plasma	<i>in-vivo</i> : Hase, Milz-OP	<ul style="list-style-type: none"> <li>Beschreibung des Heilungsprozesses im Verlauf: <ul style="list-style-type: none"> <li>Entzündungsprozess der Gas-Plasma-Gruppe ohne exsudative Phase</li> <li>Physiologische Gewebestruktur wird wiedererlangt</li> <li>90d: Heilung im Sinne eines <i>restitutio ad integrum</i></li> </ul> </li> </ul>
2018/ Yan[103]	Plasmajet	<i>in-vivo</i> : Ratte, Leber-OP	<ul style="list-style-type: none"> <li>Beschreibung einer Membran aus Thrombozyten auf mit Gas-Plasma behandeltem Blut</li> </ul>
2018/ Gentile[101]	J-Plasma	<i>in-vivo</i> : Mensch	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fallberichte zur Anwendung von Gas-Plasma in der plastischen Gesichtschirurgie</li> </ul>
2020/ Filis[100]	J-Plasma	<i>in-vivo</i> : Mensch	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fallbericht zur Anwendung von Gas-Plasma bei einer Endarteriektomie</li> </ul>

## 2. Zielsetzung der Arbeit

In der vorgelegten experimentellen Arbeit am humanen Blut sollen die gerinnungsfördernden Mechanismen von kaltem physikalischem Plasma (Gas-Plasma) untersucht werden. Dabei wird ein besonderer Fokus auf die Physiologie des Thrombozyten gelegt. Diese wurden in vorangegangenen Arbeiten als Hauptmediator der durch Gas-Plasma initiierten Koagulation erkannt [85].

In dieser Arbeit werden reaktive Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) hinsichtlich ihrer Wirkungsweise auf die Förderung der Blutgerinnung untersucht. Wir postulieren, dass ROS und RNS maßgeblich an der Thrombozytenaktivierung beteiligt sind. Die Thrombozytenaktivierung erfolgt jedoch sekundär, indem die ROS und RNS mit der Umgebung des Thrombozyten wechselwirken.

Bei den Experimenten werden die Thrombozyten im Vollblut untersucht, damit die Interaktionen der ROS und RNS im natürlichen Medium beschrieben werden können.

Als Ziele der *in-vitro*-Untersuchungen wurden folgende Inhalte definiert:

- die Spezifikation der Mechanismen, wodurch Gas-Plasma eine Wirkung auf Thrombozyten entfaltet,
- die Eingrenzung der reaktiven Spezies, welche als Vermittler der Gas-Plasma-Wirkung in Frage kommen,
- die Quantifizierung von physikalischen Faktoren (Temperatur, Evaporation) einer Gas-Plasma-Behandlung und
- die Beschreibung der Physiologie der Thrombozytenaktivierung, welche durch Gas-Plasma hervorgerufen wird.

### 3. Materialien

#### 3.1. Laborgeräte

Autoklav	Systec, Linden, Deutschland
Durchflusszytometer, <i>Cytoflex S</i>	Beckman-Coulter, Brea, USA
Fahrtisch, <i>High-Z S-150T</i>	CNC-Step, Geldern, Deutschland
Fahrtisch, <i>High-Z S-400</i>	CNC-Step, Geldern, Deutschland
Gefrierschrank <i>HERAfreeze</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
Imaging-Cytometer, <i>Amnis Image Stream<sup>X</sup> Mark II</i>	Luminex, Austin, USA
Infrarotkamera, <i>Optris PI450 G7</i>	Optris GmbH, Berlin, Deutschland
Messschieber, <i>IP 54</i>	Preciva, Shenzhen, China
Multiplate Reader, <i>Infinite F200 Pro</i>	Tecan, Männedorf, Schweiz
Multiplate Reader, <i>Infinite M200 Pro</i>	Tecan, Männedorf, Schweiz
Optisches Emissionsspektroskop, <i>AvaSpec ULS2048x64-2-USB2</i>	Avantes, Apeldoorn, Niederlande
Pipetten, <i>Research Plus</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe, <i>Pipetboy</i>	Integra, Biebertal, Deutschland
Plasmajet, <i>kINPen 11</i>	Neoplas tools GmbH, Greifswald, Deutschland
Präzisionswaage, <i>Memmert ED 124S</i>	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Reinstwasseranlage, <i>GenPure Pro</i>	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Thermometer, <i>TFA 30.1040</i>	TFA Dostmann, Wertheim- Reicholzheim, Deutschland
Reagenzglasschüttler, <i>Vortex-Genie 2</i>	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zellkulturinkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge, <i>5430 R</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge, <i>5810 R</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### 3.2. Verbrauchsmaterialien

96 well Rundboden-Mikrotiterplatte	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
96 well Impact Plate	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
96 well schwarze, flache Mikrotiterplatte, BD Falcon Flat Black	BD, Franklin Lakes, USA
96 well flache TC-Mikrotiterplatte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Blutabnahmeset, BD Vacutainer Safety Lok	BD, San Jose, USA
Blutröhrchen, Lithium Heparin, 6 ml, BD Vacutainer	BD, San Jose, USA
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Konische Zentrifugenröhrchen 15; 50 ml, Falcon	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Petrischalen, 35x10 mm, Falcon	BD, Franklin Lakes, USA
Pipettenspitze; 10; 200; 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß 0,5; 1,5; 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,7 ml	Costar, Corning, USA
Reaktionsgefäß 5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
serologische Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

### 3.3. Chemikalien und Puffer

Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
BAPTA <sup>9</sup>	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
BML-257	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
D-Erythro-Sphingosine	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FCCP <sup>10</sup>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
GF 109203X	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
HBDDE <sup>11</sup>	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
histological marking colors-black	WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach, Deutschland
Hypochlorige Säure, 12 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

<sup>9</sup> 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester)

<sup>10</sup> Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone

<sup>11</sup> 2,2',3,3',4,4'-Hexahydroxy-1,1'-biphenyl-6,6'-dimethanol dimethyl ether

JC-1 ultra-pure	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Katalase	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ly294002	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Mitotempo	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
MitoTracker Deep Red FM	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
MK-2206	Selleckchem, München, Deutschland
N-Acetylcystein	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Oligomycin A	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<i>phosphate-buffered saline (PBS)</i>	PanBiotech, Aidenbach, Deutschland
Piceatannol	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Rapamycin	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
SB-203580	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Staurosporin	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Superoxiddismutase	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tricibine	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland
Wortmannin	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Z-VAD-FMK	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland

### 3.4. Antikörper

Antigen	Konjugat	Hersteller
CD42b	PE-Cy7	BioLegend, San Diego, USA
CD62P	BV 421	BioLegend, San Diego, USA

### 3.5. Gase

Argon	Air Liquide, Paris, Frankreich
-------	--------------------------------

### 3.6. Assay Kits

<i>hemoglobin colorimetric detection kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
--	--

### 3.7. Software, Datenbanken

AvaSoft 7.6.1	Avantes, Apeldoorn, Niederlande
CytExpert 2.0	Beckman-Coulter, Brea, USA
EndNote x8.2	Thomson Reuters, Toronto, Kanada
Feature Extraction Software 12.1.1.1	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
IDEAS 6.2.187.0	Amnis, Luminex, Austin, USA
INSPIRE 200.1.620.0	Amnis, Luminex, Austin, USA
Kaluza 2.1	Beckman Coulter, Brea, USA
Maxima 17.10.1	Sourceforge
Microsoft Office suite 2016	Microsoft, Redmond, USA
NanoDrop 2000c Software 1.4.1	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Optris PI Connect 2.9.2147.0	Optris GmbH, Berlin, Deutschland
Prism 8.3	Graph Pad Software, La Jolla, USA
Python 3.9.0	Python Software Foundation
Scholar	Google, Mountain View, USA
Scan Control Software, SureScan 8.3	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
WinPC-NC 2.50/17	Burkhard Lewetz, Meckenbeuren, Deutschland

## 4. Methoden

### 4.1. Experimentelle Übersicht und Methoden

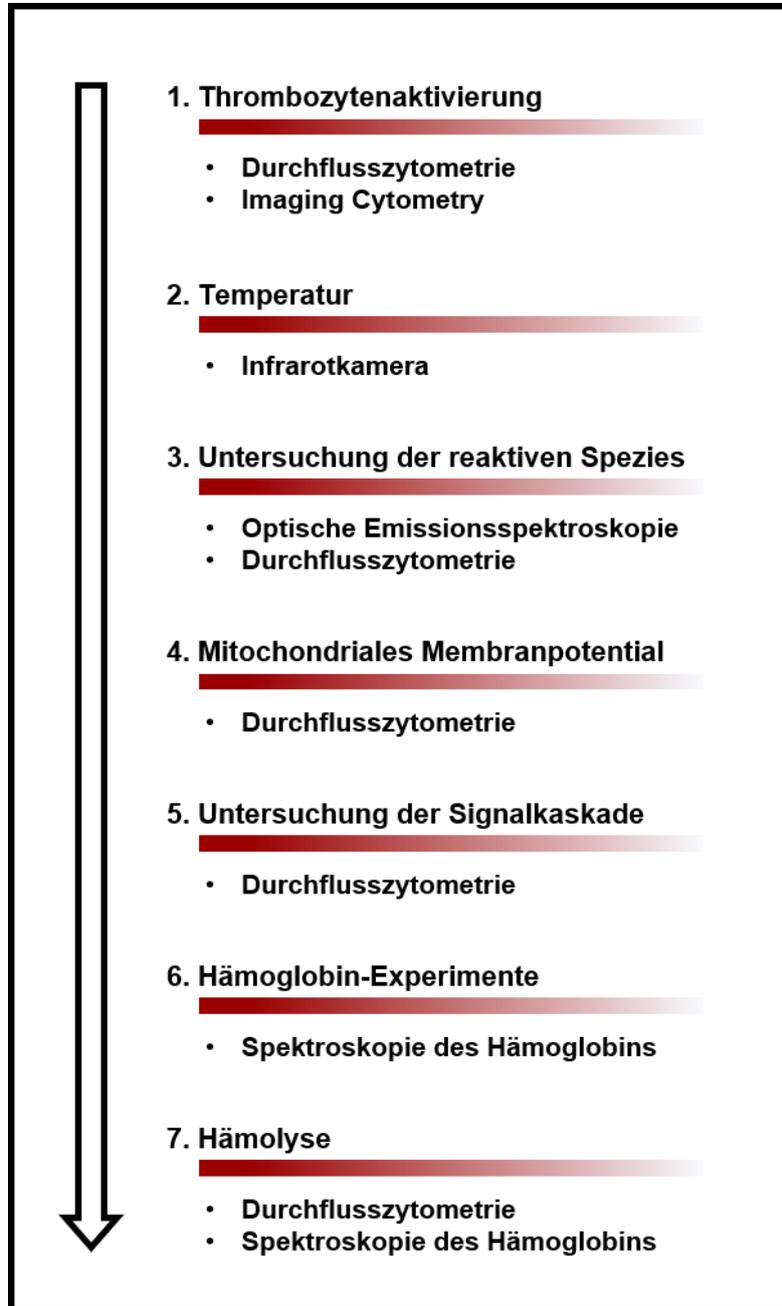


Abbildung 3: Logischer Aufbau und Methodenübersicht

Es wurde ein Schema zu den Ergebnissen und den jeweils spezifischen Methoden erstellt.

## 4.2. Blutabnahme und Probandenbeschreibung

Die venöse Blutabnahme erfolgte bei Patienten der Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie, der Station für Allgemeine Chirurgie und der Thoraxchirurgie, die in stationärer Behandlung waren. Ausschlusskriterien waren Schwangerschaft, Minderjährigkeit, Geschäftsuntüchtigkeit, fehlende rechtskräftige Einwilligung und eine gesicherte oder vermutete blutübertragbare Krankheit. Eingeschlossen wurden Patienten, die die Einwilligungserklärung unterschrieben haben und eine medizinische Indikation zur Blutabnahme besaßen. Mit Hilfe eines Blutabnahmesets (BD *Vacutainer Safety Lok*) wurde am Ende der routinemäßigen Blutabnahme das Blut in einem Entnahmeröhrchen (BD *Vacutainer*) zur angegebenen Füllhöhe aufgefüllt und für die weitere Untersuchung verwendet. Das Blut wurde mit Lithium Heparin (17 IU/ml) antikoaguliert. Die Dissertation ist Teil der am 28.11.2017 von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Greifswald bewilligten Studie zur Oxidantien-basierten Blutstillung (positives Ethikvotum liegt vor, interne Reg. Nr.: BB166/17). Daneben wurden anonymisierte Blutproben der Transfusionsmedizin Greifswald verwendet, wobei die Abnahme des Blutröhrchens vor der Abnahme der Blutkonserve durchgeführt wurde. Alle Blutproben wurden bei Raumtemperatur gelagert und es wurde bis zur Probenaufbereitung ein maximaler Zeitrahmen von 30 min eingehalten.

### 4.3. Probenaufbereitung

Das abgenommene Blut wurde entweder als Vollblut (VB), PRP, Blut-Lysat (BL), isotones BL oder Überstand zur weiteren Untersuchung genutzt. Das VB wurde aus dem befüllten Blutröhrchen entnommen.

Die Gewinnung von PRP erfolgte nach häufig durchgeführtem Protokoll [104]. Zur Aufbereitung des PRP wurde das VB in ein Zentrifugenröhrchen (Thermo Fisher Scientific) transferiert und bei 800 g für 8 min zentrifugiert. Es wurde die obere Blutplasmafraktion bis zum Leukozytenfilm (ohne den Leukozytenfilm selbst) entnommen und in einem zweiten Schritt bei 900 g für 10 min zentrifugiert. Danach wurden die oberen zwei Drittel des Blutplasmas entfernt und das entstandene Zellpellet durch leichtes Auf- und Abpipettieren in der Flüssigkeit gelöst.

Für die Herstellung von BL wurde das VB zunächst bei 500 g für 10 min zentrifugiert, das Blutplasma und der Leukozytenfilm entfernt und zwei Mal mit isotonischer phosphatgepufferter Salzlösung (engl.: *phosphate-buffered saline*, PBS, PanBiotech) gewaschen. Danach wurde die Probe aus der Fraktion der roten Blutzellen entnommen und 1:10 in doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) aus einer Reinstwasseranlage (Fisher Scientific) gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurde das Lysat zwei Mal bei 2000 g für 10 min zentrifugiert und stets der Überstand weiterverwendet.

Für die Herstellung von isotonen BL wurde das VB bei 500 g für 10 min zentrifugiert, 500 µl aus der Fraktion der Erythrozyten entnommen und mit 8,5 ml ddH<sub>2</sub>O für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 1 ml 10-fach konzentriertem PBS vermischt.

Der Überstand wurde nach Gas-Plasma-Behandlung aus fünf Proben zu je 50 µl VB gepoolt und bei 500 g für 10 min zentrifugiert. Danach wurde die Fraktion des Blutplasmas entnommen und ausreichend Abstand zum Buffy-Coat und der Schicht der Erythrozyten gelassen.

#### 4.4. Behandlung mit Gas-Plasma

Mit Hilfe des Plasmajets *kINPen 11* (Neoplas tools GmbH) wurde aus dem Trägergas Argon (Air Liquide) das Gas-Plasma für die Behandlung erzeugt [105]. Es wurden zwei Behandlungsregime etabliert, wofür die Proben (VB, PRP oder BL) in unterschiedliche Mikrotiterplatten versetzt wurden.

Das Testsystem zur Behandlung von größeren Volumina (50-100  $\mu$ l) wurde in *96 well* Rundboden-Mikrotiterplatten (Thermo Fisher Scientific) vollzogen. Hier war die Entfernung von Flüssigkeitsoberfläche und Keramik der Düse des Plasmajets 15 mm. Der Gasmengenstrom betrug 2 Standard-Liter pro Minute (slm) und die Standardbehandlungszeit 30 s.

Für kleinere Volumina (20  $\mu$ l) wurden die Proben in eine *96 well Impact-Plate* (IP, Greiner bio-one) versetzt. Die IP besitzt ein kleineres Füllvolumen und eine geringere Einbuchtung, wodurch eine direkte und ableitende Gas-Plasma-Behandlung möglich ist.<sup>12</sup> Die Entfernung zwischen Flüssigkeitsoberfläche und Keramik der Düse des Plasmajets betrug stets 7 mm. Der Gasmengenstrom war 1 slm und die Standardbehandlungszeit 5 s.

Gemessen wurden die Entfernungen mit einem *IP54*-Messschieber (Preciva) und der Gasmengenstrom in dem im *kINPen 11* integrierten Messgerät. Eine standardisierte Gas-Plasma-Behandlung wurde durch die Fahrtische *High-Z S-400* und *High-Z S-150T* (CNC-Step) gewährleistet. Die Software zur Bedienung war WinPC-NC 2.50/17 (Burkhard Lewetz). Die Software liest die Behandlungskoordinaten, Schrittfolge und die Zeiten aus einer Datei. Für die Erstellung dieser von den Fahrtischen lesbaren Datei wurde eigens ein Programm geschrieben, welches in dem Appendix erwähnt wird.

Als Kontrolle wurde eine gleichartige Behandlungsweise vorgenommen, wobei die Plasmaquelle ausgeschaltet wurde, sodass nur Argongas auf die Probe geleitet wurde.

#### 4.5. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde am *Cytoflex S* Durchflusszytometer (Beckman-Coulter) durchgeführt. Während der Messung wird die Zellsuspension aufgenommen und jede Zelle einzeln an vier Lasern vorbeigeleitet (405 nm, 488 nm, 561 nm, 638 nm). Anschließend wird das Licht mit Hilfe eines optischen Systems zu Photodioden geleitet (insgesamt 15) und in eine Spannung umgewandelt. Durch die Anordnung des optischen Systems kann über Beugung,

---

<sup>12</sup> Bei den Gas-Plasma-Behandlungen im Testsystem der kleinen Volumina wurde grundsätzlich ein weiteres Well als Mindestabstand zwischen den Proben eingehalten, um den Einfluss der Gas-Plasma-Behandlung auf umliegende Proben zu minimieren.

Streuung und Lichtemission Informationen über die Zellen gewonnen werden. Die Zellgröße ist als Surrogat im Vorwärtsstreulicht repräsentiert (engl.: *forward scatter*, FSC), ebenso die Zellgranularität im Seitwärtsstreulicht (engl.: *side scatter*, SSC). Außerdem lassen sich mit fluoreszierenden Farbstoffen zellphysiologische Parameter (z. B.: mitochondriales Membranpotenzial) und Oberflächenmarker (z. B.: CD42b) erfassen. Das Hinübertreten eines Emissionsspektrums von einem fluoreszierenden Farbstoff in den Aufnahmebereich eines anderen Farbstoffes (engl.: *spill-over*) wurde digital herausgerechnet (kompensiert), wenn mehrere Farbstoffe gleichzeitig verwendet wurden. Ermöglicht wurde dies durch Experimente, bei denen die Messungen komplett ohne Farbstoff und nur mit jeweils einem der gewählten Farbstoffe verglichen wurden. Somit werden von jeder einzelnen Zelle mehrere Spannungsimpulse aufgenommen, die je nach Anordnung im optischen System unterschiedliche Eigenschaften repräsentieren und sich in einem Koordinatensystem darstellen lassen [106]. Die Intensitätsmessungen einer gesamten Zellpopulation wurden als geometrischer Mittelwert erfasst und zur statistischen Auswertung verwendet. Die Software zur Messung am Durchflusszytometer war *CytExpert 2.0* (Beckman-Coulter) und zur Analyse der Daten wurde *Kaluza 2.1* (Beckman-Coulter) genutzt.

#### 4.5.1. Messung der Thrombozytenaktivierung

Um die Aktivierung der Thrombozyten zu messen wurde auf ein bestehendes Testsystem zurückgegriffen und dieses optimiert [102]. Die Aufbereitung erfolgte direkt aus der Probe (VB, PRP), ohne Zentrifugation und Waschschrte mit minimaler mechanischer Erschütterung.

Es wurden 5 µl der Probe für 15 min mit insgesamt 20 µl Antikörperlösung im Dunkeln gefärbt. Die Trägerlösung der Antikörper war PBS.

Folgende Antikörper wurden verwendet:

Antigen	Konjugat (Hersteller)	Klon	Konzentration
CD42b	PE-Cy7 (BioLegend)	HIP1	0,16 µg/100µl
CD62P	BV421 (BioLegend)	AK4	0,04 µg/100µl

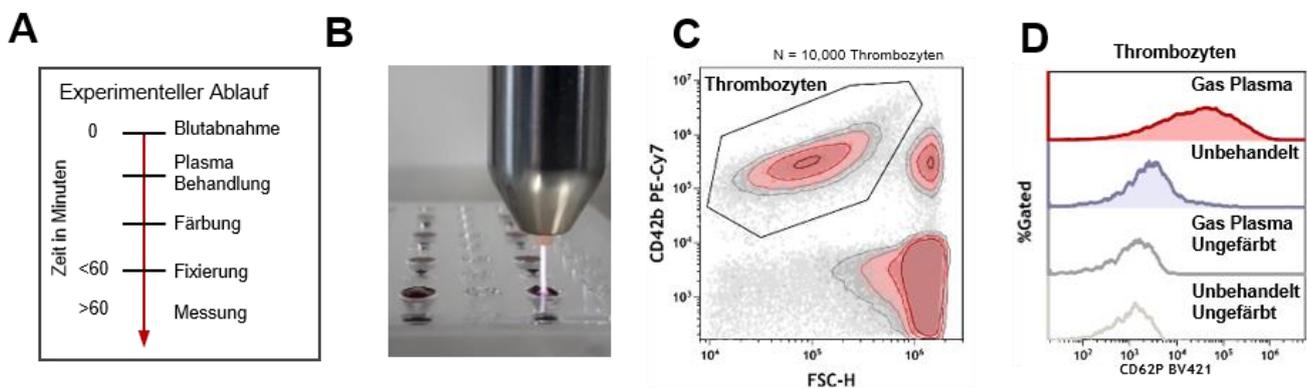
Anschließend wurde der gefärbten Probe 225 µl einprozentiger Paraformaldehydlösung (Carl Roth GmbH) in PBS hinzugefügt. Die Paraformaldehydlösung wurde in vierprozentiger Form bei -20 °C gelagert und vor den Experimenten auf Zimmertemperatur gebracht und verdünnt. Die anschließende Messung erfolgte automatisiert aus einer *96 Well* Rundboden-Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur.

Die CD42b Antikörper dienen der Identifikation der Thrombozyten, an deren Fluoreszenz die Auswahl der Thrombozytenpopulation (engl.: *gating*, **Abbildung 4, C**) und die Aufnahmebedingung geknüpft wurden. Das Ende einer einzelnen Messung (ein Well) wurde

bei der Aufnahme von 10.000 Thrombozyten oder bei einer Messdauer von einer Minute festgelegt. Die Flussgeschwindigkeit der Lösung im Kapillarsystem betrug 10  $\mu$ l/min.

Das Ausmaß der Thrombozytenaktivierung wurde anhand der Rezeptordichte von CD62P der Thrombozyten bestimmt, dessen mittlere Fluoreszenzintensität (engl.: *mean fluorescence intensity*, MFI) ermittelt wurde (**Abbildung 4, D**).

Das Zeitintervall von Blutabnahme, über Probenaufbereitung und Gas-Plasma-Behandlung zur Fixierung der Zellen, lag bei VB zwischen 30 und 45 min und bei PRP zwischen 45 und 60 min. Nach der Fixierung wurden die Proben für maximal 4 h kühl (4-8 °C) gelagert. Als Positivkontrolle diente der Agonist ADP (100  $\mu$ M), welcher zum Startzeitpunkt der Behandlung mit Gas-Plasma zu den Proben hinzugegeben und für 10 min inkubiert wurde. Bei allen weiter aufgeführten experimentellen Bedingungen wurde stets eine maximale Zeitspanne von 60 min bis zur Fixierung angestrebt.



**Abbildung 4: Übersicht einer repräsentativen Messung der Thrombozytenaktivierung in Vollblut**

Es wurde eine Übersicht der experimentellen Schritte zur Erhebung der Thrombozytenaktivierung erstellt (A). Bei kleinen Volumina wurde ein ableitendes Behandlungsregime vorgenommen (B). Die Thrombozyten wurden anhand ihrer Größe und an ihrem Rezeptorprofil (CD42b) erkannt (C). Für die ausgewählte Population wurde die Fluoreszenzintensität von CD62P bestimmt (D).

#### 4.5.2. Thrombozytenaktivierung bei unterschiedlichen Konditionen

##### 4.5.2.1. *Intrazelluläre Inhibition in VB*

Bei diesem Versuchsaufbau wurde das VB nach der Blutabnahme für 30 min mit einem Inhibitor inkubiert. Es wurden folgende Inhibitoren verwendet: BAPTA, BML-257, D-Erythro-Sphingosine, GF 109203X, HBDDE, Ly294002, MK-2206, Piceatannol, Rapamycin, Rotterlin, SB-203580, Staurosporin, Tricibin, Wortmannin und Z-VAD-FMK. In allen Proben wurden stets 90 µl des VB mit 10 µl Inhibitor vermengt. Die Trägerlösung des Inhibitors war PBS. Die genaue Konzentrationsfindung der Inhibitoren wird gesondert im Ergebnisteil erklärt. Nach der Inkubation erfolgte die Behandlung mit Gas-Plasma nach dem Testsystem der kleinen Volumina und die Messung der Proben. Pro Probanden wurden je Inhibitor jeweils drei Replikate gefertigt, die einzeln mit Gas-Plasma behandelt wurden und getrennt in die Analyse eingingen. Der Versuchsaufbau wurde so gestaltet, dass jegliche mechanische Manipulation zwischen den einzelnen Spendern und experimentellen Gruppen identisch war. Es wurde in der Gas-Plasma-Gruppe pro Messung auf mit Gas-Plasma behandeltes VB ohne Zusatz (=100 %) normiert. In der unbehandelten Gruppe wurde pro Messung auf unbehandeltes VB (=100 %) ohne Zusatz normiert.

##### 4.5.2.2. *Thrombozytenaktivierung mit Blut-Lysaten*

Bei diesem Behandlungsregime wurde aus dem VB des Spenders isotones BL hergestellt, dem VB vor der Behandlung mit Gas-Plasma<sup>13</sup> hinzugegeben und 10 min inkubiert. Das isotone BL wurde entsprechend mit PBS verdünnt, sodass es dieselbe Hämoglobin (Hb)-Konzentration aufwies, die bei diesem Behandlungsregime durchschnittlich freigesetzt wird. Die Hb-Konzentration des BL wurde spektroskopisch bestimmt.

##### 4.5.2.3. *Wirkung von Antioxidantien*

Es wurden Antioxidantien zu dem VB hinzugegeben und 10 min inkubiert, bevor eine Behandlung mit Gas-Plasma nach dem Testsystem der kleinen Volumina begonnen wurde. Die Antioxidantien, die verwendet wurden, waren N-Acetylcystein (NAC, 2 mM), Katalase (CAT, 20 µg/ml), Superoxiddismutase (SOD, 100 UE) und Mitotempo (100µM, 200µM).

##### 4.5.2.4. *Behandlung mit Oxidantien*

Vor der Messung der Thrombozytenaktivierung wurde dem VB Wasserstoffperoxid und hypochlorige Säure zugesetzt. Bevor die Oxidantien hinzugegeben wurden, erfolgten vier

---

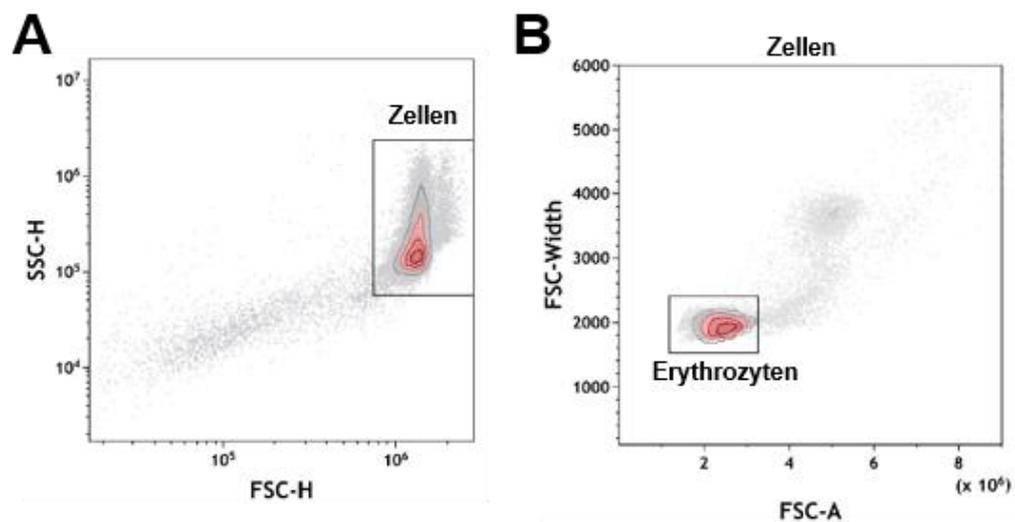
<sup>13</sup> Die Gas-Plasma-Behandlung erfolgte nach dem Testsystem der großen Volumina.

Verdünnungsschritte in einem 1:1 Verhältnis in PBS. Die höchste finale Konzentration des Wasserstoffperoxids betrug 30  $\mu\text{M}$  und der hypochlorigen Säure 1 mM. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde die Messung gestartet.

#### 4.5.3. Messung der Erythrozytenanzahl

Für die Erhebung der Anzahl der Erythrozyten wurde das VB 1:100 in PBS gelöst. Anschließend wurden vier Verdünnungsschritte in einem Verhältnis von 1:1 durchgeführt. Danach wurden die Proben durchflusszytometrisch gemessen. Die Identifikation der Erythrozyten erfolgte anhand charakteristischer Merkmale im FSC/SSC.

Durch eine im Durchflusszytometer integrierte Messung des aufgenommenen Volumens wurde die Konzentration der Erythrozyten pro  $\mu\text{l}$  bestimmt.



#### Abbildung 5: Repräsentative Messung der Erythrozytenanzahl

Bei der ungefärbten Probe wurden zuerst größere Zellen identifiziert (A) und danach die Population der einzelnen roten Blutzellen bestimmt (B). In den Diagrammen ist die Zelldichte in Farben repräsentiert, wobei der Wechsel von Grau zu Dunkelrot, eine Erhöhung der Zellzahl beschreibt.

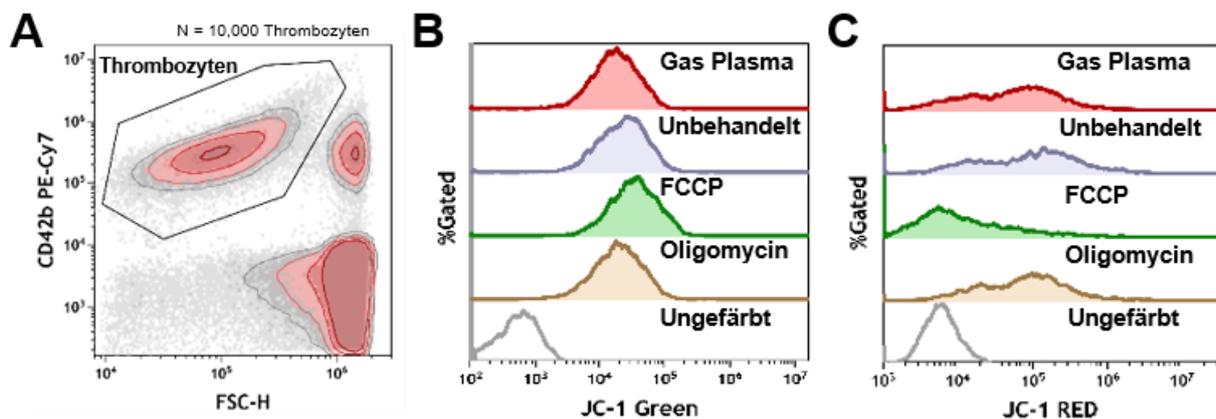
Die Messung wurde mit einer spektroskopischen Hb-Messung kombiniert. Dafür wurden die Proben vor der durchflusszytometrischen Messung halbiert, zentrifugiert (10 min, 500 g), der Überstand restlos entfernt und im selben Volumen mit ddH<sub>2</sub>O lysiert. Die weitere Aufarbeitung ist identisch mit der der Hb-Messung.

#### 4.5.4. Mitochondriales Membranpotenzial

Für die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials wurden JC-1 (Enzo Life Sciences GmbH) und MitoTracker Deep Red (MT Deep Red, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Messungen mit Hilfe von JC-1 orientierten sich an einem publiziertem Protokoll, welches leicht abgewandelt wurde [107]. Die Probenaufbereitung mit MT Deep Red erfolgte in gleicher Weise. Es wurde das VB mit JC-1 (50  $\mu$ M) und MT Deep Red (10  $\mu$ M) gefärbt und 35 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Behandlung der Proben mit Gas-Plasma<sup>14</sup> wurden in einem zweiten Färbungsschritt 5  $\mu$ l der Proben mit einem Antikörpermix, bestehend aus CD42b PE-Cy7 und CD62P BV421, gefärbt. Nach 15 min Inkubationszeit wurden jeweils 225  $\mu$ l PBS zu den Proben hinzugefügt und die Messung gestartet.

Das Reagenz JC-1 diffundiert abhängig vom Membranpotenzial über die mitochondriale Membran. JC-1 bildet in höherer Konzentration rot fluoreszierende J-Aggregate. In geringerer Konzentration fluoresziert JC-1 überwiegend grün [108]. Aus dem Verhältnis zwischen roter und grüner Fluoreszenz ist es möglich das mitochondriale Membranpotential relativ zu ermitteln. Zur Kontrolle dienten die Reagenzien FCCP<sup>15</sup> und Oligomycin, welche im Anschluss nach der Färbung mit JC-1 hinzugegeben und weitere 10 min inkubiert wurden, bevor die Messung gestartet wurde (**Abbildung 6**).

MT Deep Red reichert sich in hyperpolarisierten Mitochondrien an, weshalb die Zellen eine erhöhte Fluoreszenz aufweisen [109].



**Abbildung 6: Messung des mitochondrialen Membranpotenzials mit JC-1**

Thrombozyten wurden anhand spezifischer Oberflächenmarker und anhand ihrer Größe identifiziert (A). Es wurde die grüne (B) und die rote (C) Fluoreszenz von JC-1 ermittelt. Dargestellt wurde jeweils ein repräsentatives Overlay mit den jeweiligen Kontrollen FCCP und Oligomycin (C).

<sup>14</sup> Die Gas-Plasma-Behandlungen erfolgten im Testsystem der großen Volumina (50  $\mu$ l).

<sup>15</sup> Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone

## 4.6. Imaging-Cytometry

Die Methode des Imaging-Cytometry mit dem *Amnis Image Stream<sup>X</sup> Mark II* (Luminex) lässt sich mit der Durchflusszytometrie vergleichen. Die Erfassung der Zellparameter erfolgt jedoch nicht über Messung von Spannungsimpulsen an Photodioden, sondern über eine Bildgebung im entsprechenden Spektralbereich. Das System besitzt drei Laser (violett: 405 nm; blau: 488 nm; rot: 642 nm) und sechs Aufnahmebereiche (Channel) in denen die Bildgebung möglich ist.

Für die Messung wurde die Software *Inspire* (Amnis, Luminex) und für die Auswertung wurde die Software *Ideas* (Amnis, Luminex) verwendet. Die Darstellung und Analyse der Bilder wird über Auswertungsalgorithmen ermöglicht, die die morphologischen Kennzeichen der Zellen (engl.: *features*) quantifizieren und dadurch in einem Koordinatensystem darstellbar machen. Die Kompensation wurde über eine integrierte Software durchgeführt, bei der jedes Fluorochrom einzeln betrachtet wurde.

### 4.6.1. Messung der Thrombozytenaktivierung

Für dieses Experiment wurde das VB mit Gas-Plasma<sup>16</sup> behandelt und 5 µl Probe mit 20 µl Antikörperlösung in PBS für 15 min im Dunklen inkubiert. Folgende Antikörper wurden verwendet:

Antigen	Konjugat (Hersteller)	Klon	Konzentration
CD42b	PE-Cy7 (BioLegend)	HIP1	0,48 µg/100µl
CD62P	BV421 (BioLegend)	AK4	0,12 µg/100µl

Danach wurde den Proben 975 µl PBS hinzugefügt. Für die Experimente wurden spezifische Reaktionsgefäße verwendet (Costar).

Die Flussgeschwindigkeit während der Messung betrug 0,1 µl/min. Die Leistung des violetten Lasers (405 nm) betrug 120 mW und die des blauen Lasers (488 nm) 200 mW. Es wurden pro Messung 2500 Thrombozyten aufgenommen und analysiert (**Abbildung 7, A**).

---

<sup>16</sup> Die Behandlung erfolgte nach dem ableitenden Behandlungsprotokoll mit 20µl VB.

#### 4.6.2. Messung der gewichteten Thrombozytenaggregation

Die Messbedingungen waren identisch mit denen zur Messung der Thrombozytenaktivierung, es wurden jedoch 5000 Thrombozyten pro Messung aufgenommen.

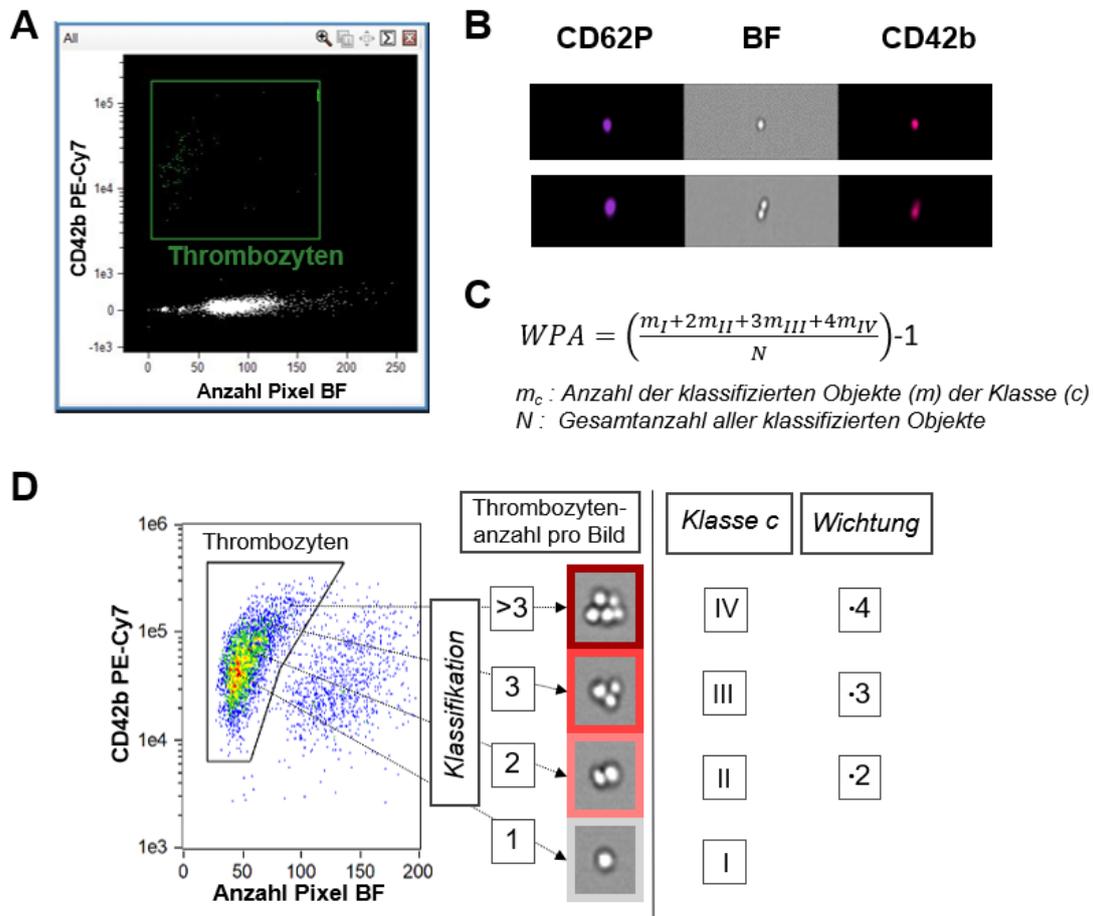
Die gewichtete Thrombozytenaggregation (engl.: *weighted platelet aggregation*, WPA) stellt einen eigens eingeführten Parameter zur Beschreibung von kleinsten Thrombozytenaggregaten dar [110].

Dieser Wert wird dadurch bestimmt, dass aufgenommene Bilder von Thrombozyten anhand ihrer Aggregatgröße klassifiziert werden. Die einzelnen Klassen sind: einzeln, doppelt, dreifach, multipel (größer drei) und geben die Anzahl der Thrombozyten in dem Aggregat wieder. Die Klassen wurden nach physiologischen Gesichtspunkten festgelegt und werden in dem WPA-Parameter anhand der Aggregatgröße gewichtet (**Abbildung 7, C, D**).

Diese Auswertung ist bisher nicht durch kommerzielle Software möglich. Es wurde zu diesem Zweck eigens ein Programm implementiert, welches auf Algorithmen des maschinellen Lernens beruht<sup>17</sup> und die Analyse kleinster Aggregate ermöglicht. Genauere Spezifikationen zum Aufbau des Programms und der Analyse sind in der Patentschrift zu diesem Parameter enthalten [111]. Es besitzt eine Genauigkeit bei der Aggregatklassifikation von ca. 98 % [112].

---

<sup>17</sup> Dieses Programm basiert auf neuronalen Netzen (*convolutional neural networks*), die die Hellfeldaufnahme der Thrombozyten klassifizieren. Durch einen Ausschluss von Erythrozyten wird die Leistung zusätzlich erhöht.



**Abbildung 7: Messung und Auswertungsstrategie**

Es wurden Thrombozyten anhand ihres Rezeptorprofils während der Messung identifiziert und nur diese Population zur weiteren Analyse verwendet (A). Anschließend wurden die Objekte bestimmt, welche ausschließlich aus Thrombozyten bestehen. Dafür wurde die Größe (Anzahl Pixel) in der Hellfeldaufnahme (engl.: *bright field*, BF) genutzt (D, links). Die Auswertung des Oberflächenmarkers CD62P BV421 erfolgte mit dem arithmetischen Mittelwert der Fluoreszenzintensität des entsprechenden Aufnahmekanals aller Thrombozyten. Die Bestimmung der gewichteten Thrombozytenaggregation (WPA) wurde mit Hilfe des repräsentativen Gatings veranschaulicht (D, rechts). Mit steigender Signalintensität des Oberflächenrezeptors CD42b, bzw. mit steigender Pixelanzahl (Größe), steigt die Aufenthaltswahrscheinlichkeit von Aggregaten innerhalb der Thrombozytenpopulation. Jedoch ist es nicht möglich mit Hilfe von konventioneller Auswertungssoftware die genauen Aggregatgrößen zu bestimmen, da die Eigenschaften zwischen den Aggregaten fließend sind. Für die Klassifikation wurde eine auf maschinelles Lernen beruhende Auswertungssoftware verwendet. Pro Bild befindet sich jeweils ein einzelner, bzw. ein abgeschlossener Komplex aus Thrombozyten. Für die Analyse wurden alle Bilder zu einer Klasse zugeordnet. Die Gesamtanzahl der Bilder pro Klasse für alle vier Klassen wurden in dem WPA-Parameter prozentual zusammengefasst. In dem WPA-Parameter finden die einzelnen Klassen gewichtet Betrachtung. Die Einheit der WPA ist % und kann einen Wert zwischen 0 (keine Aggregate) und 300 % (ausschließlich multiple Aggregate) einnehmen (C). Es wurden repräsentative Aufnahmen des Imaging-Cytometry abgebildet (B).

#### 4.7. Temperaturmessung mittels Infrarotkamera

Es wurde die Temperatur bei der Behandlung mit Gas-Plasma unter zur Hilfenahme einer Infrarotkamera untersucht. Vor dem Experiment wurde das VB mit histologischer Farbe (WAK-Chemie Medical GmbH) schwarz gefärbt. Dabei wurden 200  $\mu$ l histologische Färbelösung mit 2,8 ml VB in einer Petrischale (*Falcon „Easy Grip“*, BD Franklin Lakes) vermengt.<sup>18</sup> Die Erhebung der korrekten Temperatur des VB wurde mit einem digitalen Thermometer *TFA Wertheim 30.1040* (TFA Dostmann, Wertheim-Reicholzheim) überprüft und bestätigt.

Die Behandlung mit Gas-Plasma wurde mit dem Fahrtisch *High-Z S-400* durchgeführt, wobei genau 1 cm Abstand zwischen Oberfläche des VB und der Keramik der Düse des *kINPen 11* gelassen wurde. Die Distanz wurde mit einem *IP54* Messschieber (Preciva) auf einem zehntel Millimeter genau bestimmt. Der Gasmengenstrom betrug 1 slm. Für die thermographische Messung der Temperatur wurde die *PI450 G7*-Infrarotkamera (Optris GmbH) verwendet. Es wurde die komplette Behandlung in farbkodierter Falschfarbendarstellung aufgezeichnet. In der Darstellung ist in der Farbe Blau eine kühlere Temperatur repräsentiert, während rötliche Farben wärmere Temperaturen darstellen.

Die Behandlung mit Gas-Plasma wurde wie folgt durchgeführt: Der Fahrtisch fuhr automatisiert in horizontaler Richtung über die Petrischale und senkte sich zuletzt in vertikaler Richtung bis zur Endposition herab. Das Erreichen der Endposition des Plasmajets wurde als Zeitpunkt 0 s festgelegt. Der Mittelpunkt über der Petrischale in horizontaler Ausrichtung wurde bei -3 s erreicht, danach senkte sich der Plasmajet mit einer konstanten Geschwindigkeit von 20 mm/s herab.

Zur Analyse wurde die Temperatur bei -5; -2,5; -1; 0; 1; 2,5; 5; 10; 20 und 30 s bestimmt. Die Messung erfolgte im Behandlungszentrum, weshalb der jeweilige Messwert das Extremum der Temperatur wiedergibt. Das für das menschliche Auge sichtbare Gas-Plasma konnte mit der Kamera nicht aufgezeichnet werden und verfälschte nicht die Messung. Die Experimente wurden in beleuchtungsarmer Umgebung durchgeführt.

---

<sup>18</sup> Dies ist notwendig, um den Emissionsgrad  $\epsilon$  gleich eins anzunehmen, damit bei der Berechnung der Temperatur mit Hilfe des Stefan-Boltzmann-Gesetzes die realen Temperaturen bestimmt werden [113].

#### **4.8. Optische Emissionsspektroskopie**

Die Beschreibung des Gas-Plasmas kann mit Hilfe von optischer Emissionsspektroskopie (OES) durchgeführt werden. Bei dieser Technik werden Emissionsspektren von Gasen in einem Bereich von 300-1000 nm detektiert. Peak-förmige Intensitäten lassen Rückschlüsse auf die Ionisation des Gas-Plasmas zu, wodurch eine qualitative Aussage über die chemischen Spezies in der Gasphase möglich ist. Es wurde das optische Emissionsspektroskop *AvaSpec ULS2048x64-2-USB* (Avantes, Apeldoorn) mit Hilfe der Software *AvaSoft 7.6.1* (Avantes, Apeldoorn) verwendet. Die Messungen erfolgten 3 mm über der Oberfläche des VB bei einem ableitenden Behandlungsregime.

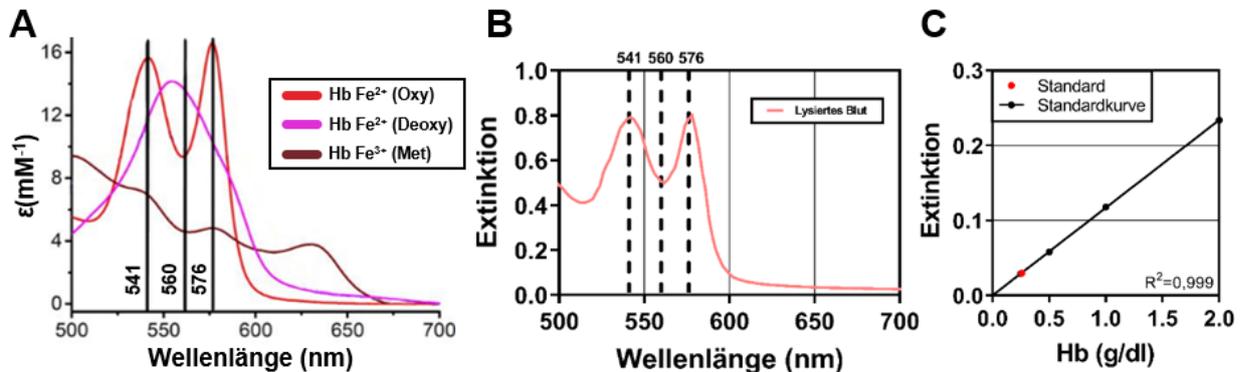
## 4.9. Spektroskopie des Hämoglobins und dessen Analyse

Es wurde eine Methode zur spektroskopischen Messung der Hb-Konzentration mit einer Unterteilung in dessen Derivate (Oxyhämoglobin, Desoxyhämoglobin, Methämoglobin) etabliert. Die Methode wurde bereits in abweichender Form durchgeführt [114]. Die Kernidee ist die Messung der Extinktion einer Probe bei verschiedenen Wellenlängen und die Analyse der Messwerte in einem linearen Gleichungssystem, welches auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz beruht (1).

$$(1) \quad E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot d \cdot c$$

Dabei ist  $E_{\lambda}$  die Extinktion bei der Wellenlänge  $\lambda$ ,  $\varepsilon_{\lambda}$  der Extinktionskoeffizient eines Stoffes bei der Wellenlänge  $\lambda$ ,  $d$  die durchstrahlte Dicke eines Mediums und  $c$  die Konzentration eines Stoffes in dem Medium. Für die Messung der Hb-Konzentration nimmt man an, dass die gesamte Extinktion (tiefgestellt ges) an einer Wellenlänge die Summe der Einzelabsorptionen der Derivate Methämoglobin (tiefgestellt M), oxygeniertem Hb (tiefgestellt O) und desoxygeniertem Hb (tiefgestellt D) ist (2, **Abbildung 8**).

$$(2) \quad E_{ges} = E_O + E_D + E_M$$



**Abbildung 8: Charakteristische Absorptionsspektren des Hämoglobins und dessen Derivate**

Jedes Hb-Derivat besitzt ein charakteristisches Absorptionsspektrum (A, modifiziert nach [115]). Es wurde ein repräsentatives Absorptionsspektrum von lysiertem Blut im Intervall von 500 bis 700 nm dargestellt (B). Man kann das gemessene Spektrum als Addition der einzelnen Hb-Derivate betrachten, dessen Erscheinungsbild maßgeblich von den Konzentrationen der Hb-Derivate bestimmt wird. Charakteristische Absorptionsmaxima von oxygeniertem Hb liegen bei 541 und 576 nm, von desoxygeniertem Hb bei 560 nm und von Methämoglobin bei 630 nm. Zur Kalibrierung der theoretischen Messmethode an laboreigene Bedingungen wurde ein kommerziell verfügbares Nachweiskit verwendet. Die Standardabweichung der Messpunkte ist zu gering, um dargestellt zu werden. Mit Hilfe eines erstellten Standards (roter Punkt) wurde der theoretische Wert mit dem Messwert des kommerziell erhältlichen Kits verglichen (C).

Die Absorptionsmessungen an drei verschiedenen Wellenlängen (541, 560 und 630 nm) liefern ein lineares Gleichungssystem (3).

$$\begin{aligned} \lambda_{541}: E_{ges} &= E_O + E_D + E_M \\ (3) \quad \lambda_{560}: E_{ges} &= E_O + E_D + E_M \\ \lambda_{576}: E_{ges} &= E_O + E_D + E_M \end{aligned}$$

Das Einsetzen des Lambert-Beer'schen Gesetzes (1) liefert:

$$\begin{aligned} \lambda_{541}: \epsilon_{ges(541)} \cdot d \cdot c_{ges} &= \epsilon_{O(541)} \cdot d \cdot c_O + \epsilon_{D(541)} \cdot d \cdot c_D + \epsilon_{M(541)} \cdot d \cdot c_M \\ (4) \quad \lambda_{560}: \epsilon_{ges(560)} \cdot d \cdot c_{ges} &= \epsilon_{O(560)} \cdot d \cdot c_O + \epsilon_{D(560)} \cdot d \cdot c_D + \epsilon_{M(560)} \cdot d \cdot c_M \\ \lambda_{576}: \epsilon_{ges(576)} \cdot d \cdot c_{ges} &= \epsilon_{O(576)} \cdot d \cdot c_O + \epsilon_{D(576)} \cdot d \cdot c_D + \epsilon_{M(576)} \cdot d \cdot c_M \end{aligned}$$

Im Folgenden wird  $d$  eliminiert und  $\frac{E_\lambda}{d}$  für  $\epsilon_\lambda c$  auf der linken Seite des Gleichheitszeichens eingesetzt (5).

$$\begin{aligned} \lambda_{541}: \frac{E_{541}}{d} &= \epsilon_{O(541)} \cdot c_O + \epsilon_{D(541)} \cdot c_D + \epsilon_{M(541)} \cdot c_M \\ (5) \quad \lambda_{560}: \frac{E_{560}}{d} &= \epsilon_{O(560)} \cdot c_O + \epsilon_{D(560)} \cdot c_D + \epsilon_{M(560)} \cdot c_M \\ \lambda_{576}: \frac{E_{576}}{d} &= \epsilon_{O(576)} \cdot c_O + \epsilon_{D(576)} \cdot c_D + \epsilon_{M(576)} \cdot c_M \end{aligned}$$

Die entsprechenden Extinktionskoeffizienten wurden der Literatur entnommen [115].

$$\begin{aligned} \lambda_{541}: \frac{E_{541}}{d} &= 15,54\text{mM}^{-1} \cdot c_O + 11,6\text{mM}^{-1} \cdot c_D + 7,05\text{mM}^{-1} \cdot c_M \\ (6) \quad \lambda_{560}: \frac{E_{560}}{d} &= 9,35\text{mM}^{-1} \cdot c_O + 13,8\text{mM}^{-1} \cdot c_D + 4,64\text{mM}^{-1} \cdot c_M \\ \lambda_{576}: \frac{E_{576}}{d} &= 16,6\text{mM}^{-1} \cdot c_O + 10,44\text{mM}^{-1} \cdot c_D + 4,81\text{mM}^{-1} \cdot c_M \end{aligned}$$

Da sich in der Praxis die Messbedingungen von Labor zu Labor unterscheiden und Geräte unterschiedliche Resultate liefern, ist eine Justierung dieses theoretischen Gleichungssystems an die eigenen Bedingungen notwendig. Die Anpassung der Messabweichung wird repräsentiert durch einen konstanten Faktor  $k$ , der in die Gleichungen eingeht.

$$\begin{aligned} \lambda_{541}: k \frac{E_{541}}{d} &= k(15,54\text{mM}^{-1} \cdot c_O + 11,6\text{mM}^{-1} \cdot c_D + 7,05\text{mM}^{-1} \cdot c_M) \\ (7) \quad \lambda_{560}: k \frac{E_{560}}{d} &= k(9,35\text{mM}^{-1} \cdot c_O + 13,8\text{mM}^{-1} \cdot c_D + 4,64\text{mM}^{-1} \cdot c_M) \\ \lambda_{576}: k \frac{E_{576}}{d} &= k(16,6\text{mM}^{-1} \cdot c_O + 10,44\text{mM}^{-1} \cdot c_D + 4,81\text{mM}^{-1} \cdot c_M) \end{aligned}$$

Die Kalibrierung erfolgte mit Hilfe eines Hämoglobin-Nachweiskits (Thermo Fisher Scientific). Die Messung der Konzentration erfolgt über eine kolorimetrische Absorptionsmessung, nachdem alle Hb-Derivate in eine einheitliche Spezies umgewandelt worden sind [116].

Die Justierung erfolgte mit Hilfe dieser Formel:

$$(8) \quad k = \frac{E_{ges \text{ Kontrollmessung}}}{E_{ges \text{ errechnet}}}$$

Das auf Laborbedingungen justierte und gerundete Gleichungssystem lautet:

$$(9) \quad \begin{aligned} \lambda_{541}: \frac{E_{541}}{d} &= 17,0908 \text{mM}^{-1} \cdot c_O + 12,7576 \text{mM}^{-1} \cdot c_D + 7,7536 \text{mM}^{-1} \cdot c_M \\ \lambda_{560}: \frac{E_{560}}{d} &= 10,2831 \text{mM}^{-1} \cdot c_O + 15,1771 \text{mM}^{-1} \cdot c_D + 5,103 \text{mM}^{-1} \cdot c_M \\ \lambda_{576}: \frac{E_{576}}{d} &= 18,2566 \text{mM}^{-1} \cdot c_O + 11,4819 \text{mM}^{-1} \cdot c_D + 5,29 \text{mM}^{-1} \cdot c_M \end{aligned}$$

Die Dicke  $d$  ist in einem standardisierten Zylinder über folgende Formel definiert:

$$(10) \quad d = \frac{V}{\pi r^2}$$

All diese Berechnungen und die Lösung des linearen Gleichungssystems wurden mit dem Computeralgebrasystem *Maxima 17.10.4* (Sourceforge) durchgeführt. Die Absorption wurde mit dem *Infinite M200 Pro* Mikroplattenphotometer (Tecan, Männedorf) bestimmt. Dabei wurden 110  $\mu\text{l}$  je Probe in einer flachen *96 well* Mikrotiterplatte (Sarstedt, Nümbrecht) versetzt und die Absorption jeder Probe bei 541, 560 und 576 nm gemessen. Zusätzlich wurde ein Absorptionsspektrum gemessen, wobei die Absorption einer Probe im Bereich von 500 bis 700 nm in Abständen von 2 nm bestimmt wurde. Die gemessenen Werte der Extinktionen wurden jeweils vom Leerwert (ddH<sub>2</sub>O) der entsprechenden Wellenlänge abgezogen, bevor sie in die Analyse mitaufgenommen wurden. Dieses Verfahren liefert die Konzentrationen der Subspezies in mM, wobei sich die Stoffmengenkonzentration auf die Hb-Untereinheiten bezieht. Dies ist die Variante, welche häufig bei spektroskopischen Messungen Anwendung findet [117]. Es wurde eine Hb-Lösung gleicher Konzentration zur Kontrolle der Messgenauigkeit über mehrere Messungen mitgeführt.

Wenn mehrere Absorptionsspektren miteinander verglichen werden sollten, dann wurden diese mit der Konzentration aller Hb-Derivate der jeweiligen Probe normalisiert.

#### 4.10. Statistik

Die Statistiksoftware *prism 8.3* (GraphPad Software) wurde zur Erstellung der Graphen und der statistischen Auswertung genutzt. Die Formatierung der Rohdaten wurde mit *Excel* (Microsoft) vorgenommen. Dargestellt wurden Daten aus drei bis sieben unabhängigen Experimenten, mit minimal drei Messwerten pro Gruppe, wobei jeder Einzelmesswert einer individuellen Behandlung entsprach (wenn es nicht anders beschrieben wurde).

Bei einem Vergleich zwischen zwei unabhängigen Stichproben, einer gegebenen Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test  $p \geq 0,05$ ) und homogenen Varianzen (Bartlett-Test auf homogene Varianzen  $p \geq 0,05$ ) wurde ein ungepaarter T-Test durchgeführt. Bei inhomogenen Varianzen wurde ein Welch-Test vollzogen. Wenn diese Voraussetzungen (homogene Varianzen und Normalverteilung) nicht erfüllt wurden, wurde ein Mann-Whitney-U-Test angewandt.

Bei einem Vergleich zwischen drei oder mehr unabhängigen Stichproben wurde bei anzunehmender Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test  $p \geq 0,05$ ) und homogenen Varianzen (Bartlett-Test auf homogene Varianzen  $p \geq 0,05$ ) eine einfaktorische Varianzanalyse durchgeführt (engl.: *analysis of variance*, ANOVA I), dabei diente als Post-Hoc-Test der Tukey-Test. Bei inhomogenen Varianzen diente die Welch-ANOVA mit dem Games-Howell-Post-Hoc-Test als statistischer Vergleich. Wenn diese Bedingungen nicht gegeben waren, wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Als Post-Hoc-Test wurde dabei der Dunn-Test verwendet. Für Varianzanalysen wurde mit angegeben, welche Gruppen im statistischen Test beachtet wurden.<sup>19</sup>

In manchen Fällen wurden zwei Gruppen selektiv miteinander verglichen, obwohl der experimentelle Aufbau mehr als zwei Gruppen umfasst.<sup>20</sup> Der Alpha-Fehlerkumulierung bei wiederholtem Testen einer Stichprobe wurde mit der Bonferroni-Korrektur entgegengewirkt. Mit Hilfe der ROUT-Methode (Q=10 %) wurden Ausreißer identifiziert und entfernt, bevor statistische Tests angewandt wurden. Die Angaben im Fließtext bezeichnen stets den Mittelwert. Das Signifikanzlevel wurde wie folgt festgelegt: \*  $\alpha=0,05$ ; \*\*  $\alpha=0,01$ ; \*\*\*  $\alpha=0,001$ .

---

<sup>19</sup>Da die Varianzanalyse die Quersumme aller Gruppen einbezieht, wird der Vergleich der interessierenden Gruppen beeinflusst. Konkret bedeutet das, dass Kontrollgruppen bei statistischen Tests ausgeschlossen wurden.

<sup>20</sup>Dies wird damit begründet, dass häufig nur der Vergleich dieser zwei Gruppen von Bedeutung ist oder einzelne Gruppen die Voraussetzungen zu einem parametrischen Testsystem nicht erfüllen. In diesem Fall würde die Wahl eines nicht-parametrischen Testverfahrens, welches alle Gruppen des Experiments einbezieht, die Teststärke des Vergleiches verringern.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Gas-Plasma-vermittelte Thrombozytenaktivierung

#### 5.1.1. Nachweis der Thrombozytenaktivierung mittels Durchflusszytometrie

Es sollte untersucht werden, ob die Gas-Plasma-Applikation Thrombozyten aktiviert und sich diese Aktivierung mit einprozentiger PFA-Lösung fixieren lässt. Dies wurde durchflusszytometrisch anhand der Fluoreszenzintensität des Oberflächenmarkes CD62P ermittelt und in zwei Behandlungsregimen durchgeführt.

Die Gas-Plasma-Gruppe zeigte eine um ein Vielfaches höhere Aktivierung der Thrombozyten als die Gas-Argon und die unbehandelte Gruppe. Im Testsystem mit kleinen Volumina und einer ableitenden Behandlung mit Gas-Plasma wurde eine 36-fache höhere Aktivierung im Vergleich zur unbehandelten Gruppe (MFI(Gas-Plasma): 10181, MFI(Unbehandelt): 282,  $p=0,0006$ ) und eine 3-fach höhere Aktivierung zur Gas-Argon behandelten Gruppe gemessen (MFI(Gas-Argon): 3524,  $p=0,008$ ). Die Kontrollgruppe ADP bewirkte eine ähnlich hohe Wirkung wie die Behandlung mit Gas-Plasma (**Abbildung 9 A**, MFI(ADP): 7970;  $p=0,412$ ).

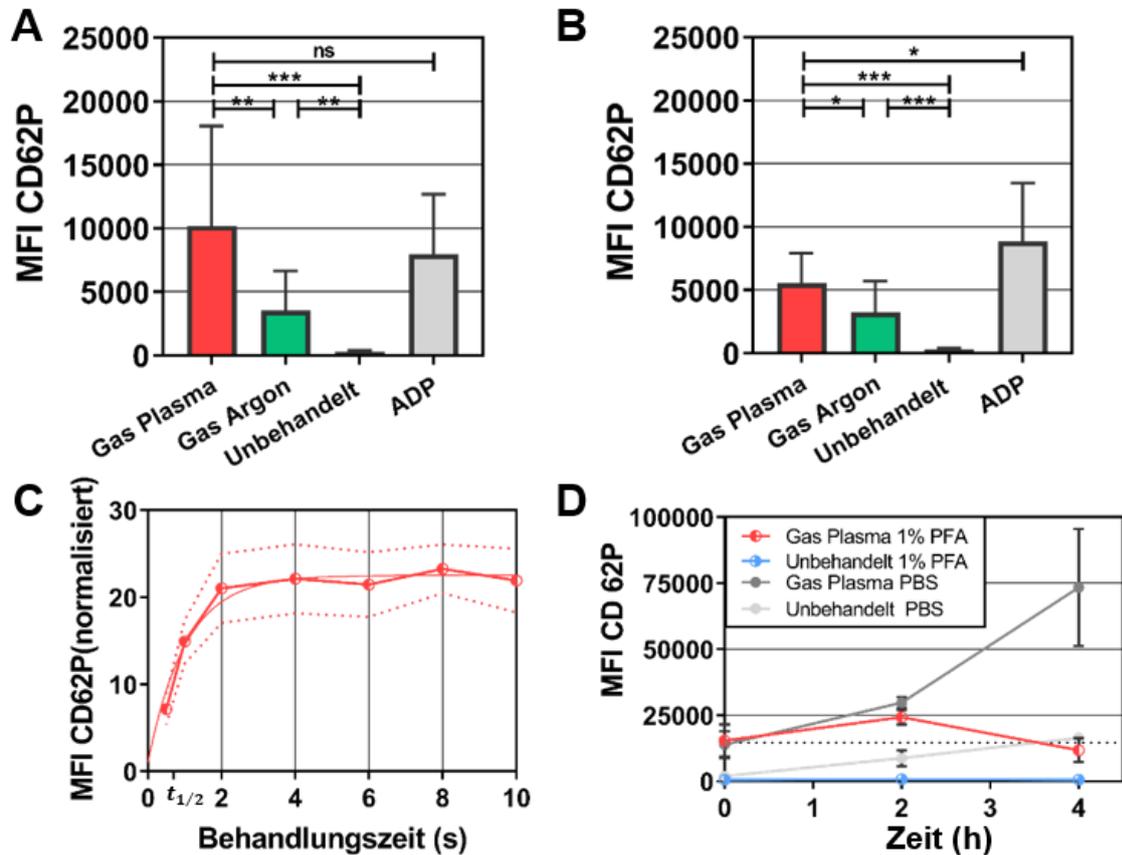
Mit größeren Behandlungsvolumina und einer nicht ableitenden Behandlung mit Gas-Plasma wurden die vorherigen Ergebnisse bestätigt. Die Aktivierung der Thrombozyten war bei der Gas-Plasma-Gruppe geringer (**Abbildung 9 B**, MFI(Gas-Plasma): 5532). Dennoch wurde der Vergleich zu Gas-Argon (MFI(Gas-Argon): 3230,  $p=0,0342$ ) und zur unbehandelten Gruppe signifikant (MFI(Unbehandelt): 283,  $p<0,0001$ ).

Es sollte die Behandlungszeit bestimmt werden, welche benötigt wird, um eine Thrombozytenaktivierung hervorzurufen. Hierfür wurden unterschiedliche Behandlungszeiten zwischen 0,5 und 10 s verwendet. Es wurde eine Regression angewandt<sup>21</sup>, um den Zeitpunkt der halbmaximalen Aktivierung zu bestimmen. Die Zeit beträgt  $t_{1/2}=0,708$  s. Für 90 % der Maximalaktivierung wurden  $t=1,978$  s benötigt (**Abbildung 9, C**).

Durch die Anwendung von einprozentiger PFA-Lösung war es möglich die Oberflächenexpression von CD62P zum Zeitpunkt nach der Behandlung mit Gas-Plasma zu fixieren (**Abbildung 9, D**).

---

<sup>21</sup> Weiterführende Informationen zur statistischen Analyse befinden sich in dem Appendix.



**Abbildung 9: Aktivierung von Thrombozyten in Vollblut durch Gas-Plasma**

Gas-Plasma aktiviert im Testsystem der kleinen (**A**) und großen Volumina (**B**) Thrombozyten. Um den Einfluss der Behandlungszeit zu ermitteln, wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten zur unbehandelten Gruppe normalisiert. Das Maximum der Gas-Plasma-vermittelten Thrombozytenaktivierung ist das ca. 22,5-fache der unbehandelten Gruppe (**C**). Es wurde die fixierende Wirkung von einprozentiger PFA-Lösung auf die Thrombozytenaktivierung nachgewiesen. Die Zeit kennzeichnet die Differenz zum Beginn der ersten Messung. Dabei wurden Proben der gleichen Behandlung mit Gas-Plasma, jedoch nicht dieselben Proben mehrmals gemessen. (**D**). In **C** wurde der Mittelwert  $\pm$  SEM, bei allen anderen Abbildungen der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

### 5.1.2. Nachweis der Thrombozytenaktivierung mittels Imaging-Cytometry

Es wurde die aktivierende Wirkung des Gas-Plasmas mittels Imaging-Cytometry nachgewiesen. Dies wurde zunächst anhand des Oberflächenrezeptors CD62P bestätigt. Die Behandlung mit Gas-Plasma erhöhte die Fluoreszenzintensität um das ca. 11-fache (MFI(Gas-Plasma): 9451, MFI(Unbehandelt): 884,  $p < 0,0001$ ), während die Argon-Behandlung eine 4-fache Erhöhung zur Folge hatte (MFI(Gas-Argon): 3495,  $p = 0,045$ ) (**Abbildung 10 A**).

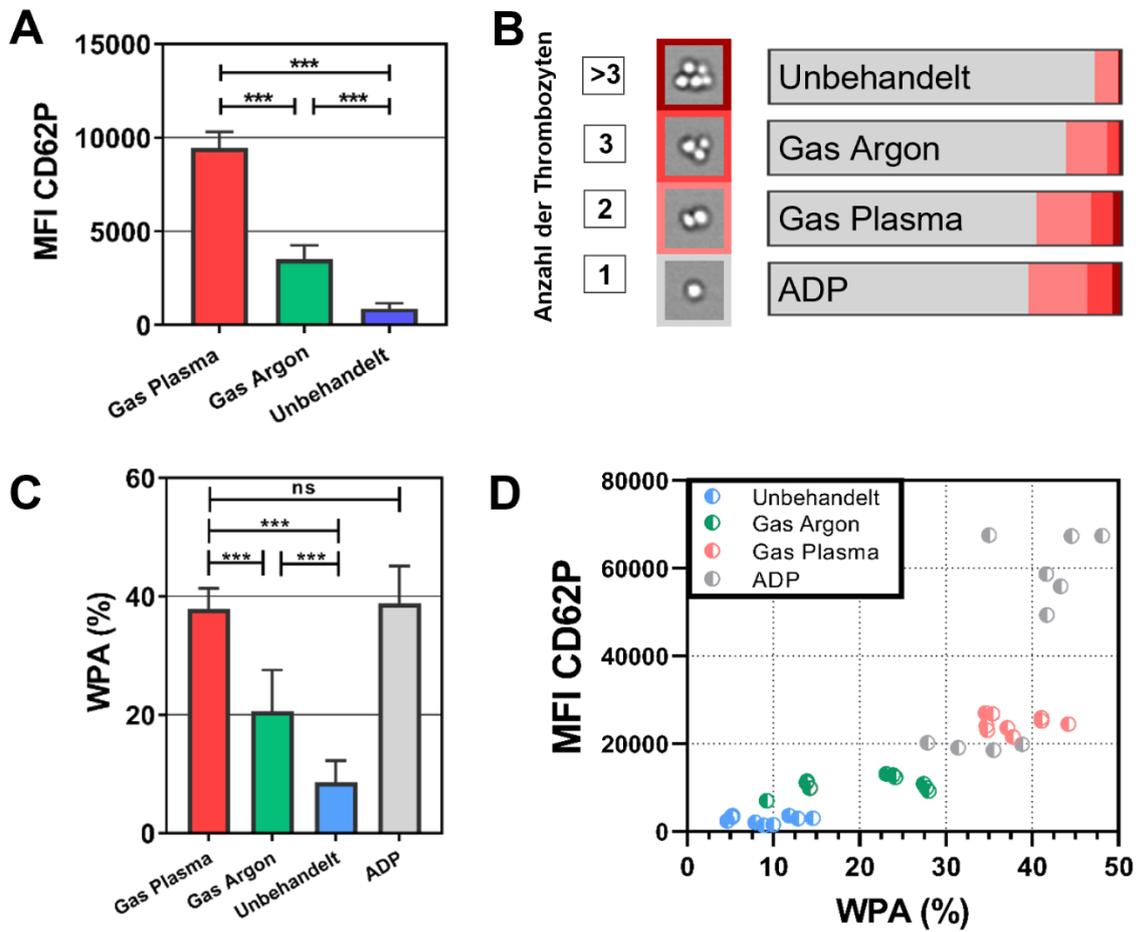
Es wurde außerdem die Thrombozytenaggregation bestimmt. Für die Analyse wurde eine eigens implementierte Software verwendet, die auf künstlichen neuronalen Netzen beruht. Es wurden die Thrombozyten anhand ihrer Größe (1, 2, 3,  $>3$  Thrombozyten) klassifiziert und deren prozentuale Verteilung an allen aufgenommenen Aggregationen<sup>22</sup> dargestellt (**Abbildung 10, B**).

Die prozentuale Verteilung wurde in dem Parameter der WPA zusammengefasst. Dabei wurden signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. Der Vergleich der Thrombozytenaggregation zwischen Gas-Plasma und dem Agonisten ADP wurde nicht signifikant (**Abbildung 10, C**).

Um eine Vorstellung darüber zu bekommen, wie die Thrombozytenaggregation und Aktivierung zusammenhängen, wurde die Fluoreszenzintensität des Oberflächenrezeptors CD62P gegen die WPA aufgetragen (**Abbildung 10, D**).

---

<sup>22</sup> Eine Aggregation bezeichnet eine Aufnahmeeinheit. Eine Aggregation kann die Größen 1, 2, 3,  $>3$  annehmen. Somit beschreibt die Darstellung nicht die Anteile an allen Thrombozyten, sondern an deren einzelnen und aggregierten Erscheinungsformen.



**Abbildung 10: Nachweis der Thrombozytenaktivierung und -aggregation mittels Imaging-Cytometry**

Mit dem Nachweis des Oberflächenrezeptors CD 62P wurde verifiziert, dass Gas-Plasma Thrombozyten aktiviert (A). Ebenso befördert es die Bildung von Thrombozytenaggregaten, welche anhand ihrer Größe klassifiziert wurden (B). Mit Hilfe des WPA-Parameters lassen sich die Größe der Thrombozytenaggregate sowie deren Häufigkeiten beschreiben und vergleichen (C). Es wurde die Thrombozytenaktivierung gegen die Thrombozytenaggregation aufgetragen (D).

## 5.2. Temperatur

Es wurde die Temperatur während der Behandlung mit Gas-Plasma untersucht. Zur Messung der Temperatur mittels Infrarotkamera musste das Blut zunächst schwarz gefärbt werden (**Abbildung 11, A**). Bei der Behandlung wurde der Plasmajet mithilfe eines Fahrtisches an das Blut angenähert. Als Distanz wurde die Entfernung von der Flüssigkeitsoberfläche und der Keramikdüse festgelegt (**Abbildung 11, B**). Es wurde die komplette Behandlung von Gas-Plasma und Gas-Argon in Falschfarbendarstellung aufgezeichnet (**Abbildung 11, C**).

Es konnte eine kühlende Wirkung von Gas-Argon nachgewiesen werden. Gas-Argon bewirkte eine Verringerung der Temperatur um ca. 2 °C. Dies gilt für die Standardbehandlungszeit von 5 s, beginnend vom Zeitpunkt, als die Endposition erreicht wurde.

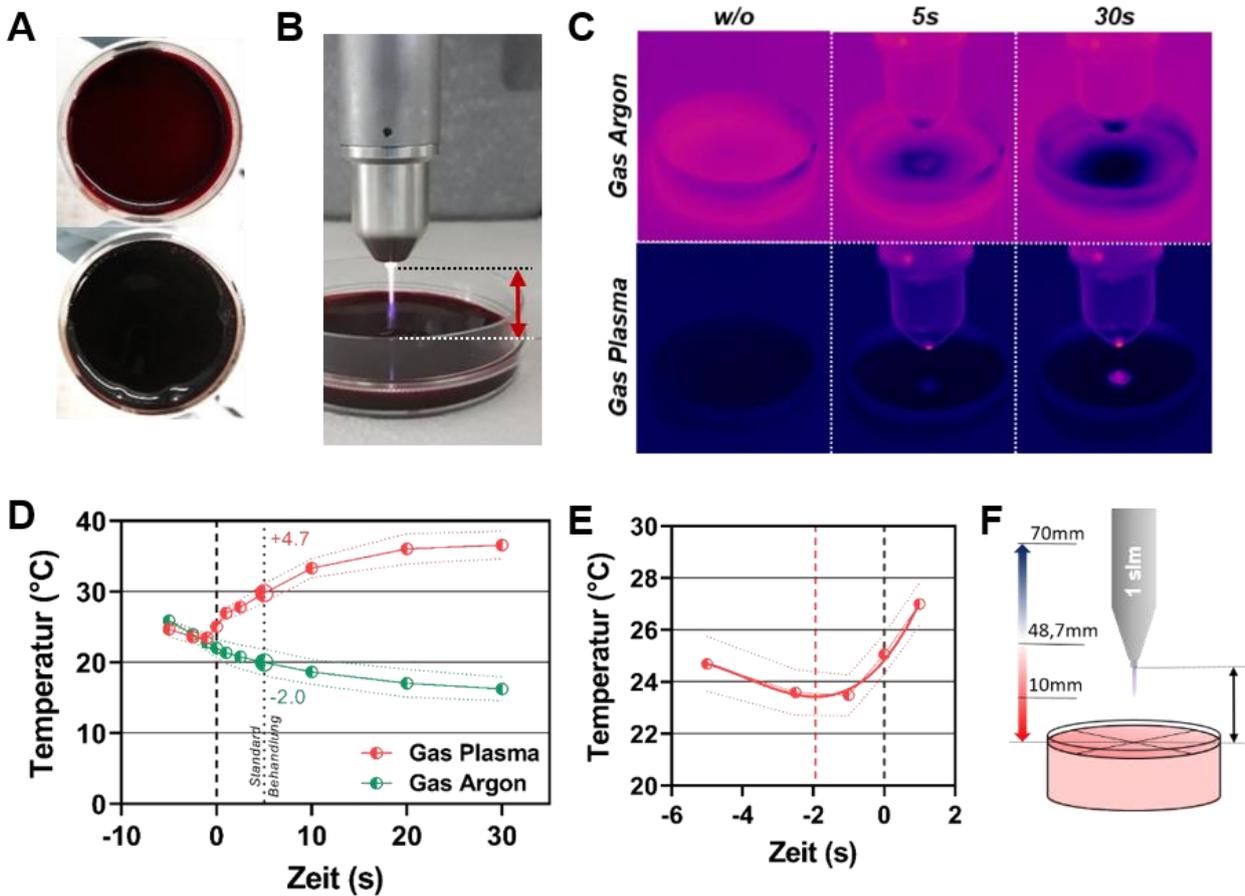
Die Behandlung mit Gas-Plasma führte innerhalb von 5 s zu einer Temperaturerhöhung um 4,8 °C (**Abbildung 11, D**).

Die Temperaturänderung war jedoch von der Entfernung abhängig. Während der Annäherung des Plasmajets besitzt das Plasma zunächst eine abkühlende und in kürzerer Distanz eine erwärmende Wirkung. Für die Abhängigkeit der Temperatur von der Behandlungszeit wurde im Bereich von -5 bis 1 s eine Regression dritten Grades durchgeführt. Es wurde der Tiefpunkt der Regressionsgrade ermittelt, um mit Hilfe der Absinkgeschwindigkeit die Entfernung zu ermitteln, bei welcher die Behandlung mit Gas-Plasma keine Änderung der Temperatur aufweist.<sup>23</sup> Das Minimum der Regression befindet sich bei  $t=-1,937$  s (**Abbildung 11, E**). Damit wurde eine temperaturneutrale Entfernung von 48,74 mm ermittelt (**Abbildung 11, F**). Die Mittelwerte der erhobenen Temperaturen aus 8 Messungen pro Gruppe wurden in einer Tabelle dargestellt (**Tabelle 3**).

**Tabelle 3: Temperaturen bei jeweiliger Behandlungszeit**

Gruppe	Zeit									
	-5 s	-2,5 s	-1 s	0 s	1 s	2,5 s	5 s	10 s	20 s	30 s
Gas-Plasma	24,6 °C	23,6 °C	23,5 °C	25,0 °C	27,0 °C	27,8 °C	29,8 °C	33,3 °C	36,0 °C	36,6 °C
Gas-Argon	25,9 °C	24,0 °C	22,8 °C	22,0 °C	21,4 °C	20,8 °C	19,9 °C	18,6 °C	17,1 °C	16,3 °C

<sup>23</sup> Weitere Informationen zu der Auswertung befinden sich in dem Appendix.



**Abbildung 11: Temperaturmessung mittels Infrarotkamera**

Für die Temperaturmessung musste das Blut zunächst gefärbt (A) und die Behandlungskonditionen definiert werden (B). Es wurde die komplette Behandlung mit Gas-Argon und Gas-Plasma in Falschfarbendarstellung aufgenommen und im Zentrum der Behandlung gemessen (C). Die Temperatur wurde in Abhängigkeit von der Zeit abgebildet (D). Anschließend wurde die Temperatur bei der Annäherung des Plasmajets genauer betrachtet. Bis zum Zeitpunkt von -3 s wurde die Plasmaquelle in horizontaler Richtung über die Petrischale bewegt und danach bis zum Zeitpunkt 0 s herabgesenkt. Zu der Messung wurde eine Regression erstellt, dessen Tiefpunkt mit einer gestrichelten, roten Linie gekennzeichnet ist (E). Die Ergebnisse wurden in einer Grafik dargestellt, welche die Behandlungskonditionen beschreibt und die Entfernung von 48,7 mm ohne thermischen Einfluss kennzeichnet (F). Verwendete Abkürzungen: w/o: entspricht keiner Behandlung (engl.: *without*)

### 5.3. Untersuchung der reaktiven Spezies

Eine Wirkkomponente des Gas-Plasmas sind reaktive Spezies [81].

Es wurden die Spezies der Gasphase mittels optischer Emissionsspektroskopie untersucht und die einzelnen Wellenlängen der reaktiven Spezies der Literatur entnommen [118]. Es wurden reaktive Stickstoff-, Sauerstoff- und Argonspezies in der Gasphase des Plasmajets nachgewiesen (**Abbildung 12, A**).

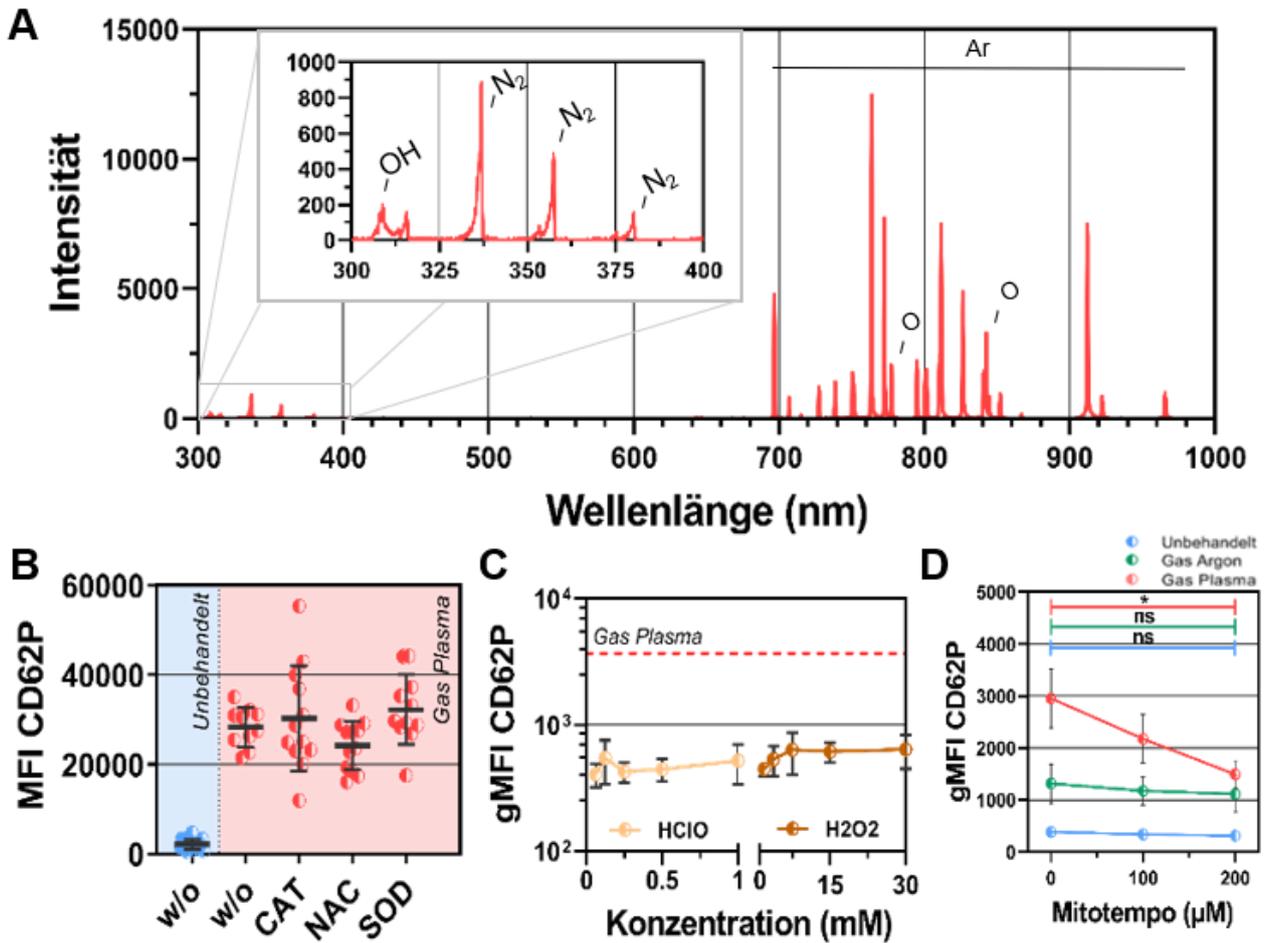
Anschließend wurde versucht die Gas-Plasma-vermittelte Thrombozytenaktivierung mit Hilfe von Antioxidantien zu verringern.

Die Vergleiche von VB mit Zusatz von Katalase (CAT, MFI(CAT): 30231,  $p=0,999$ ), NAC (MFI(NAC): 24183,  $p=0,434$ ) und SOD (MFI(SOD): 32192,  $p=0,797$ ) zu Gas-Plasma ohne Antioxidans (MFI(Gas-Plasma w/o): 28305) ergaben keine statistische Signifikanz. Es wurde jedoch eine Verringerung bei der Hinzugabe von NAC zu Gas-Plasma um ca. 15 % bestimmt (**Abbildung 12, B**).

Anschließend wurde versucht mit Hilfe von Wasserstoffperoxid und hypochloriger Säure Thrombozyten zu aktivieren, um die Gas-Plasma-Wirkung mittels langlebiger und chemisch definierter ROS nachzustellen. Es konnte jedoch bei den höchsten Konzentrationen (HClO: 1 mM und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 30 mM) sowie allen kleineren Konzentrationen keine Wirkung nachgewiesen werden (**Abbildung 12, C**).

Zuletzt wurde ein intrazellulär wirkendes Antioxidans verwendet, um die Wirkung des Gas-Plasmas zu reduzieren und den Nachweis der ROS/RNS-vermittelten Thrombozytenaktivierung zu erbringen. Dabei konnte eine Abnahme der Thrombozytenaktivierung bei steigender Konzentration von Mitotempo beobachtet werden und ist bei Hinzugabe von 200  $\mu$ M Mitotempo signifikant ( $p=0,0392$ ) (**Abbildung 12, D**).

Da Mitotempo sich auch in Mitochondrien anreichert, wurde die Wirkung des Gas-Plasmas auf das mitochondriale Potential untersucht [119, 120].



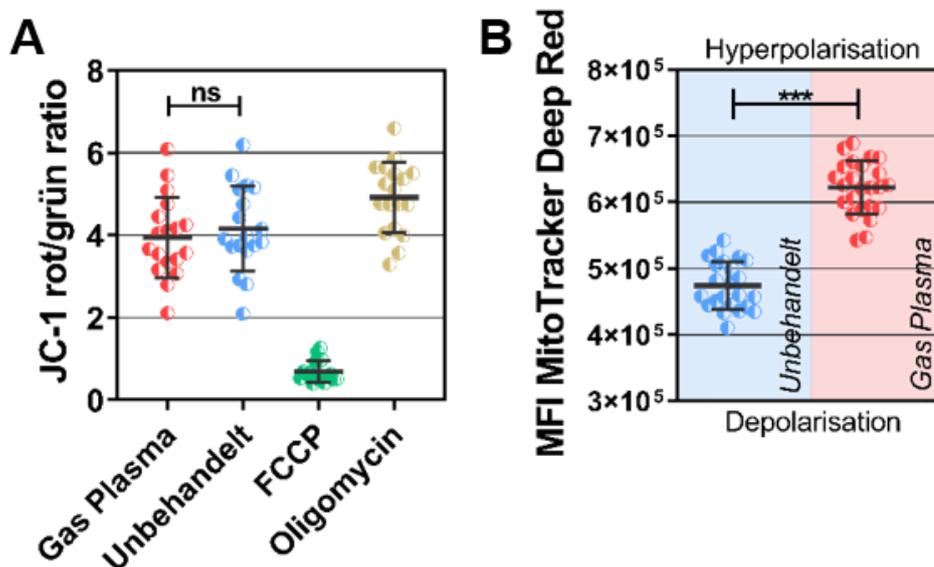
**Abbildung 12: Einfluss von reaktiven Spezies bei der Gas-Plasma-vermittelten Thrombozytenaktivierung**  
 Zum Nachweis der reaktiven Spezies in der Gasphase des Plasmajets wurde eine optische Emissionsspektroskopie durchgeführt (A). Mit Hilfe von Antioxidantien konnte keine Verringerung der durch Gas-Plasma-vermittelten Thrombozytenaktivierung erreicht werden (B). Die Oxidantien Wasserstoffperoxid und hypochlorige Säure hatten keinen Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung (C). Mit Hilfe des intrazellulär wirkenden Antioxidans Mitotempo konnte die Wirkung des Gas-Plasmas reduziert werden.

## 5.4. Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials

Für die Messung des mitochondrialen Membranpotentials mit JC-1 wurde die rote Fluoreszenz mit der grünen Fluoreszenz in ein Verhältnis gesetzt. Eine Abnahme dieses Quotienten kennzeichnet eine Depolarisation und eine Zunahme beschreibt eine Hyperpolarisation.

Die mit Gas-Plasma behandelte Gruppe besitzt ein Verhältnis von 3,95 und die unbehandelte Gruppe ein Verhältnis von 4,16. Es konnte zwischen diesen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p=0,537$ ) (**Abbildung 13, A**). Zur Kontrolle der Depolarisation wurde ein Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette, FCCP, und für die Hyperpolarisation Oligomycin verwendet.

MT Deep Red diffundiert abhängig vom Membranpotenzial durch die mitochondriale Membran und die Fluoreszenzintensität steigt mit dem Membranpotenzial (**Abbildung 13, B**). Es konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p<0,0001$ ), wodurch nachgewiesen wurde, dass die Behandlung mit Gas-Plasma zu einer Hyperpolarisation der Mitochondrien von Thrombozyten führt.



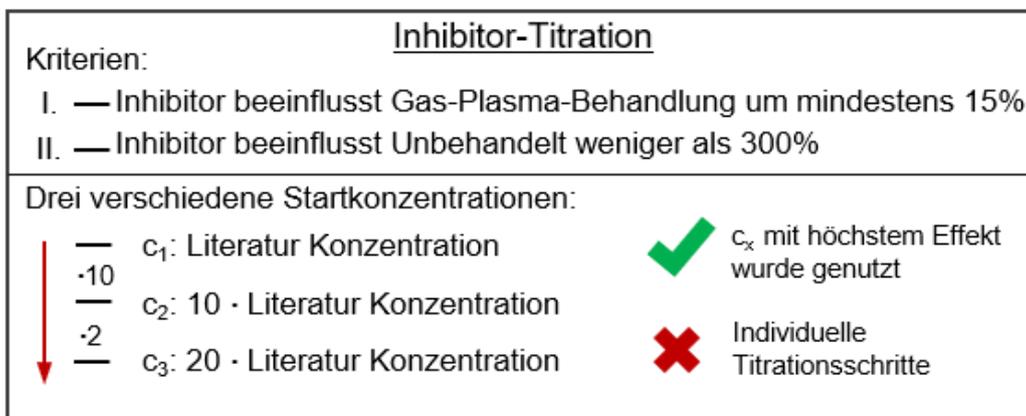
**Abbildung 13: Messung des mitochondrialen Membranpotentials von Thrombozyten**

Es wurde das mitochondriale Membranpotential mittels JC-1 (**A**) und MT Deep Red (**B**) durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrolle dienten FCCP und Oligomycin. Es wurde jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

## 5.5. Untersuchung der Signalkaskade

### 5.5.1. Konzentrationsfindung von Inhibitoren der Signaltransduktion

Um herauszufinden, welche Signalkaskaden bei der Gas-Plasma-vermittelten Thrombozytenaktivierung eine Rolle spielen, wurde das VB vor der Behandlung mit Inhibitoren inkubiert. Es mussten zunächst Konzentrationen für die Inhibitoren gefunden werden. Für die Konzentrationsfindung wurde die Startkonzentration der Literatur entnommen. Die Zielgröße war die durchflusszytometrisch ermittelte Oberflächenexpression von CD62P. Weiterhin wurde ein einheitliches experimentelles Vorgehen zur Titration der Inhibitoren geschaffen (**Abbildung 14**).



**Abbildung 14: Experimentelle Strategie zur Titration der Inhibitoren**

Für die Experimente wurden unbehandelte und mit Gas-Plasma behandelte Gruppen betrachtet. Es wurden zwei Kriterien definiert, um zu ermitteln, welche Inhibitoren mit welcher Konzentration für weitere Experimente verwendet werden.

- I. Der Inhibitor muss den Mittelwert der Gas-Plasma-Behandlung um mindestens 15 % beeinflussen.
- II. Die Änderung der unbehandelten Probe darf bei Zugabe des Inhibitors nicht mehr als 300 % betragen.

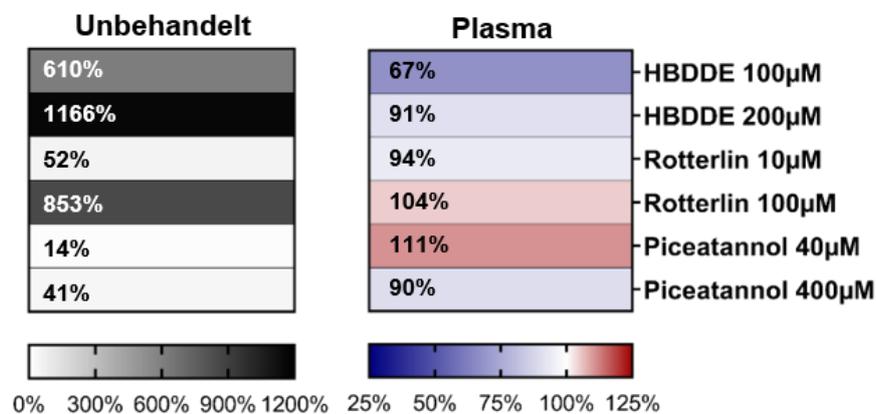
Die Kriterien wurden so definiert, um sicherzugehen, dass ein messbarer Effekt vorliegt (**I**) und dass die Inhibitoren nicht selbst eine Wirkung auf die Umgebung oder sekundäre Prozesse zur Folge haben, die die Messungen beeinträchtigen (**II**).

Neben der Literaturkonzentration wurde die zehnfache und zwanzigfache Konzentration überprüft. Es war anzunehmen, dass die Inhibitoren in VB, aufgrund hoher Zellzahlen, höher konzentriert werden müssen. Wurden zwei Konzentrationen gefunden, die beide Kriterien erfüllen, wurde die genommen, die die größere Änderung in der Gas-Plasma-Behandlung vorweist.

Wenn das I. Kriterium nicht erfüllt worden ist, wurde höher konzentriert. Wenn das II. Kriterium nicht erfüllt wurde, wurde niedriger konzentriert. Dies geschah durch Annäherung, zunächst in Vielfachen der Literaturkonzentration, später durch individuelle Konzentrationsstufen.

Es wurden zu jeder Konzentration jedes Inhibitors drei Messungen für jeweils die mit Gas-Plasma und die unbehandelte Gruppe erstellt, dessen Mittelwert mit Gas-Plasma-Gruppe ohne Zusatz, bzw. der unbehandelten Gruppe ohne Zusatz verglichen wurde.

Es konnte nicht zu jedem Inhibitor eine passende Konzentration ermittelt werden, welche die Kriterien erfüllte (**Abbildung 15**). Folgende Inhibitoren wurden nicht weiter untersucht: D-Erythro-Sphingosine, HBDDE, Piceatannol und Rotterlin.



**Abbildung 15: Repräsentative Inhibitoren, welche die Auswahlkriterien nicht erfüllten**

Es wurden repräsentative Inhibitoren der Signaltransduktion in einer *heatmap* dargestellt, welche nicht die Auswahlkriterien erfüllten.

Es wurde eine Übersicht der untersuchten Inhibitoren und deren Konzentrationen erstellt (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Inhibitoren der Signaltransduktion**

<b>Inhibitor</b>	<b>Ziel</b>	<b>Literatur Konzentration</b>	<b>Genutzte Konzentration</b>
<b>BAPTA</b>	intrazelluläres Ca <sup>2+</sup>	10 µM [62]	100 µM
<b>BML-257</b>	Akt (1, 2, 3)	12.5 µM [63]	12.5 µM
<b>D-Erythro-Sphingosine</b>	PKC	50 µM [64]	-
<b>GF 109203X</b>	PKC (α, βI&II, γ)	10 µM [65]	10 µM
<b>HBDDE</b>	PKC (α, γ)	100 µM [66]	-
<b>Ly294002</b>	PI3K	1 µM [67]	1 mM
<b>MK-2206</b>	Akt (1, 2, 3)	1 µM [68]	10 µM
<b>Piceatannol</b>	Syk	10 µg/ml [69]	-
<b>Rapamycin</b>	mTOR	200 nM [70]	200 µM
<b>Rotterlin</b>	PKC (δ)	10 µM [71]	-
<b>SB-203580</b>	P38 α & β	30 µM [72]	30 µM
<b>Staurosporin</b>	Kinasen	1–400 µM [73]	10 µM
<b>Tricibin</b>	Akt (1, 2, 3)	5 µM [74]	5 µM
<b>Wortmannin</b>	PI3K	100 nM [75]	50 µM
<b>Z-VAD-FMK</b>	Caspasen	1-300 µM [76]	100 µM

### 5.5.2. Inhibition der Signaltransduktion

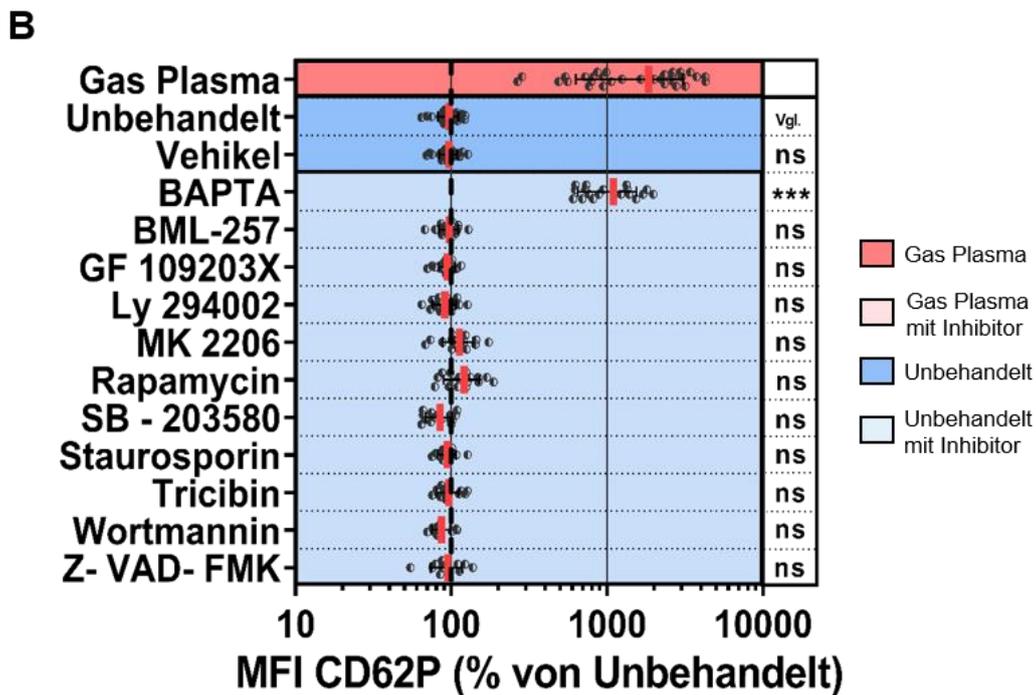
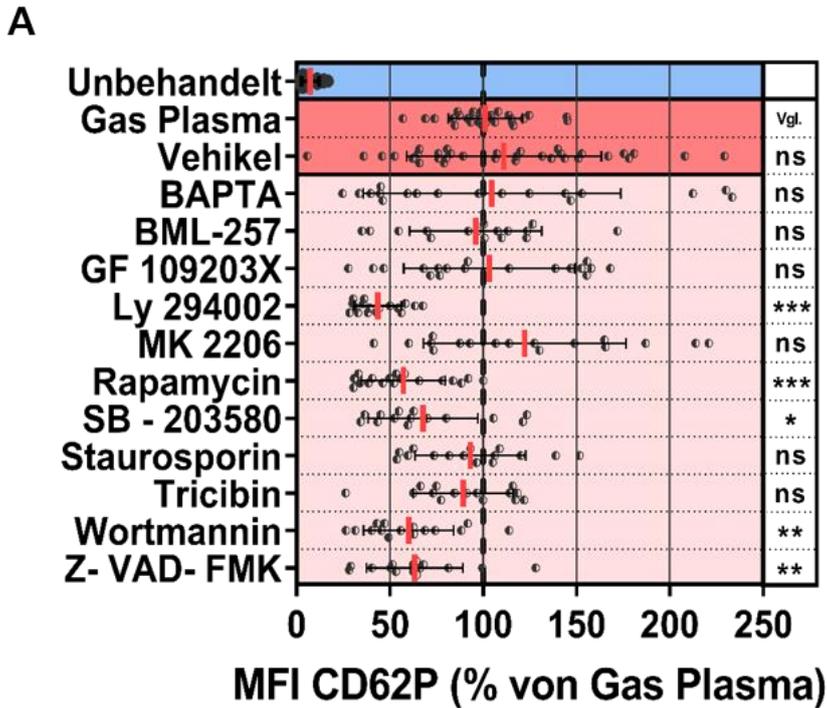
Für die Untersuchung der Signalkaskade wurden die Inhibitoren mit dem VB vor der Behandlung mit Gas-Plasma inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch gemessen. Es wurden die zwei Gruppen Unbehandelt und Gas-Plasma getrennt voneinander betrachtet.

Die Wirkung von Gas-Plasma konnte durch Ly294002 ( $\Delta=-56,4\%$ ;  $p<0,0001$ ), Rapamycin ( $\Delta=-42,8\%$ ;  $p=0,0004$ ), Wortmannin ( $\Delta=-40,0\%$ ;  $p=0,0028$ ), Z-VAD-FMK ( $\Delta=-36,7\%$ ;  $p=0,0084$ ) und SB-203580 ( $\Delta=-32,2\%$ ;  $p=0,0392$ ) signifikant verringert werden. Dies sind Inhibitoren der PI3-Kinase, mTOR, Caspasen und p38  $\alpha/\beta$ .

Die Wirkung wurde nicht verändert durch BAPTA ( $\Delta=4,7\%$ ;  $p>0,999$ ), BML-257 ( $\Delta=-4,0\%$ ;  $p>0,999$ ), GF 109203X ( $\Delta=3,2\%$ ;  $p>0,999$ ), MK-2206 ( $\Delta=22,3\%$ ;  $p>0,999$ ), Staurosporin ( $\Delta=-6,9\%$ ;  $p>0,999$ ) und Tricibin ( $\Delta=-10,67\%$ ;  $p>0,999$ ) (**Abbildung 16, A**).

Die Inhibitoren hatten überwiegend keinen Einfluss auf die unbehandelten Proben. Deswegen ist davon auszugehen, dass die Reaktionen der Inhibitoren selbst eine untergeordnete Rolle spielen.

Die Probe von BAPTA hatte eine starke Änderung der unbehandelten Gruppe zur Folge. Weil der Inhibitor selbst die Thrombozytenaktivierung beeinflusst hat und nicht nur auf den Teil der Gas-Plasma-vermittelten Aktivierung gewirkt hat, sind die Resultate von BAPTA limitiert verwertbar (**Abbildung 16, B**).



**Abbildung 16: Inhibition der Signaltransduktion**

Es wurde die Wirkung der Inhibitoren auf die Gas-Plasma-vermittelte Thrombozytenaktivierung untersucht. Die Fluoreszenzintensität des Oberflächenmarkers CD62P wurde pro Messung zu mit Gas-Plasma behandeltem VB (A) bzw. unbehandeltem VB (B) normalisiert und an der Abszisse aufgetragen. Die Gruppen der unterschiedlichen Inhibitoren wurden an der Ordinate aufgetragen. Jede Einzelmessung ist als Punkt dargestellt und der Mittelwert durch einen roten Strich gekennzeichnet. Als Vehikel diente PBS. Der Hintergrund kennzeichnet die jeweilige Behandlungsgruppe. Bei den statistischen Tests wurden die Gruppen mit Inhibitor mit der Gruppe ohne Inhibitor verglichen.

## 5.6. Hämoglobin-Experimente

### 5.6.1. Hämoglobin-Untersuchungen in Blutüberständen

Es ist bekannt, dass Gas-Plasma zu einer Lyse von Erythrozyten führt. Dies wurde jedoch noch nicht für die verwendete Plasmaquelle nachgewiesen. Um dies zu untersuchen wurde das freie Hämoglobin (Hb) im Überstand (nach Zentrifugation) als Surrogat für lysierte Erythrozyten quantifiziert.

Für die Messung wurden Absorptionsspektren zwischen 500 und 700 nm der Behandlungsgruppen aufgenommen. Es sind charakteristische Absorptionsspektren des Hb und dessen Derivate erkennbar, wobei das Spektrum des Überstands der Gas-Plasma-Gruppe auf oxygeniertes Hb hinweist. Dies ist an den Absorptionsmaxima bei 541 und 576 nm erkennbar. Die niedrige Absorption und die fehlenden Maxima bei 541 bzw. 576 nm kennzeichnen eine niedrige Konzentration von freien oxygeniertem Hb, in der mit Gas-Argon behandelten und unbehandelten Gruppe (**Abbildung 17, A**).

Für die Messung der Hb-Konzentration wurde ein Verfahren etabliert, welches auf einem Gleichungssystem des Lambert-Beer'schen Gesetzes beruht, wodurch es möglich ist, die Konzentrationen der einzelnen Hb-Derivate zu berechnen.<sup>24</sup>

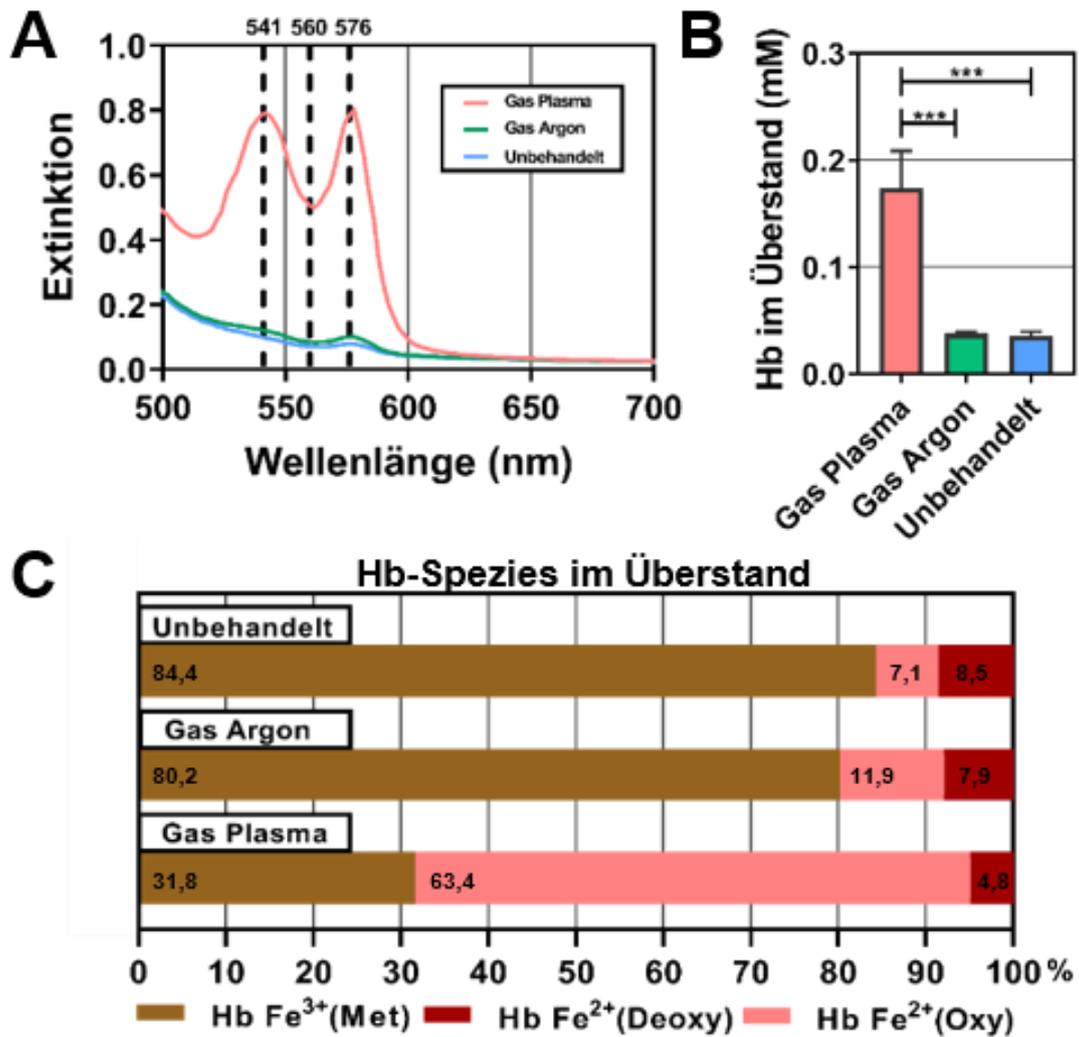
Die freie Konzentration aller Hb-Spezies im Überstand war in der Gas-Plasma-Gruppe ( $c=173,8 \mu\text{M}$ ) signifikant höher als in der Gas-Argon ( $c=37,7 \mu\text{M}$ ,  $p=0,0006$ ) und der unbehandelten Gruppe ( $c=35,3 \mu\text{M}$ ,  $p=0,0005$ ) (**Abbildung 17, B**). Dies beweist die lysierende Wirkung der Gas-Plasma-Behandlung auf die Erythrozyten im VB.

Bei Betrachtung der Hb-Subspezies, fällt ein großer Anteil an Methämoglobin bei der unbehandelten und Gas-Argon-Gruppe auf (**Abbildung 17, C**). Dies ist das Resultat eines physiologischen Methämoglobin-Anteils im menschlichen Blut, welcher sich unter anderem durch Autoxidation des Hb erklären lässt [121].

Obwohl deutlich mehr Hb aus Erythrozyten freigesetzt wurde, gibt es bei den Hb-Spezies der Gas-Plasma-Gruppe einen erhöhten Anteil von Methämoglobin. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde die Wirkung von Gas-Plasma auf Hb untersucht.

---

<sup>24</sup> Die Genauigkeit des Verfahrens wird im Abschnitt 5.7 zusätzlich validiert.



**Abbildung 17: Hämoglobin-Spezies im Blutplasma nach Gas-Plasma-Behandlung**

Es wurden Absorptionsspektren des Blutüberstandes nach Gas-Plasma-Behandlung aufgenommen (A). Aus der Extinktion bei den Wellenlängen 541, 560 und 576 nm wurde die Hb-Konzentration im Überstand ermittelt (B). Durch eine mathematische Analyse ist eine Unterteilung in die Hb-Spezies: Methämoglobin, oxygeniertes Hb und desoxygeniertes Hb möglich (C).

### 5.6.2. Untersuchung der Wirkung von Gas-Plasma auf Blut-Lysate

Es wurde die Wirkung von Gas-Plasma auf Hämoglobin (Hb) untersucht. Dafür wurden Blut-Lysate (BL) hergestellt und jeweils 100 µl BL unterschiedlich lange mit Gas-Plasma behandelt.<sup>25</sup> Darauf folgte eine spektroskopische Untersuchung der Proben.

Die Gas-Plasma-Behandlung bewirkte eine Abnahme von oxygeniertem Hb und eine Zunahme von Methämoglobin. Während einer einminütigen Behandlung sank der Anteil des oxygeniertem Hb von ca. 69 auf 21 %. Umgekehrt erhöhte sich der Anteil von Methämoglobin von ca. 28 auf 75 %. Somit konnte eine oxidierende Wirkung des Gas-Plasmas auf oxygeniertem Hb nachgewiesen werden, welches eine Bildung von Methämoglobin zur Folge hat (**Abbildung 18, A**).

Während der Behandlung mit Gas-Plasma findet eine Verdunstung der Flüssigkeit statt. Dabei nimmt die Konzentration des Hb zu, wodurch es möglich ist, die Evaporation zu berechnen. Während einer einminütigen Behandlung mit Gas-Plasma verdunsteten bei diesem Regimen 17,22 µl. Dieser Wert wurde als Steigung einer linearen Regression der Verdunstung über der Zeit ermittelt (**Abbildung 18, B**).<sup>26</sup>

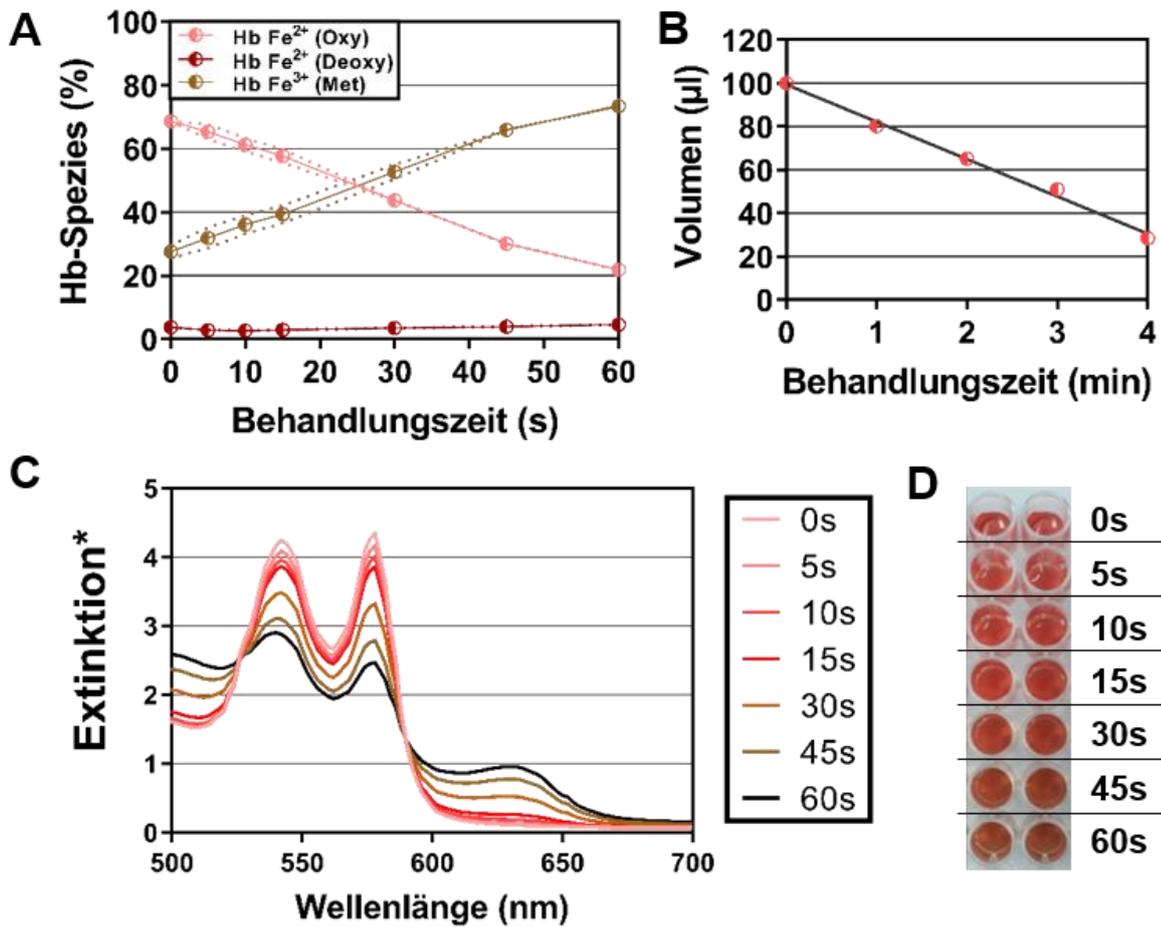
Es wurden die Absorptionsspektren nach unterschiedlich langen Behandlungszeiten gemessen. Bei Zunahme der Behandlungszeit lässt sich eine Abnahme der Absorption bei 541 und 576 nm beobachten, welches durch eine relative Abnahme des oxygenierten Hb begründet wird. Währenddessen steigt die Absorption bei 630 nm, welches das Absorptionsmaximum des Methämoglobins darstellt (**Abbildung 18, C**).

Die Änderungen der Hb-Spezies wurden optisch sichtbar (**Abbildung 18, D**).

---

<sup>25</sup> Es wurde das gleiche Behandlungsregimen wie für große Volumina verwendet, jedoch mit 100 µl BL anstelle von 50 µl VB.

<sup>26</sup> Es ist anzunehmen, dass sich die Verdunstung bei längerer Gas-Plasma-Behandlung verringert. Die lineare Regression dient jedoch als Richtwert.



**Abbildung 18: Gas-Plasma veränderte die Anteile der Hb-Spezies**

Zunächst wurden die Anteile der Hb-Derivate betrachtet. Dabei ist eine Umwandlung des oxygenierten Hb zum Methämoglobin zu betrachten, während das desoxygenierte Hb weitgehend konstant blieb (A). Bei längeren Behandlungszeiten tritt eine relevante Evaporation auf. Hierbei ist zu betonen, dass dies in BL und nicht in VB untersucht wurde (B). Die Änderungen der Anteile der Hb-Derivate lassen sich im normalisierten Absorptionsspektrum (C) und optisch darstellen (D). Die Kennzeichnung „\*“ weist auf die Normalisierung der Extinktion mit der Konzentration aller Hb-Derivate des jeweiligen Spektrums hin.

## 5.7. Hämolysen

### 5.7.1. Quantifizierung der Hämolysen und Stimulation der Thrombozyten

Um die Ergebnisse zur Lyse von Erythrozyten weiter zu untersuchen, wurde die spektroskopische Hb-Messung mit der durchflusszytometrischen Quantifizierung von Erythrozyten kombiniert.

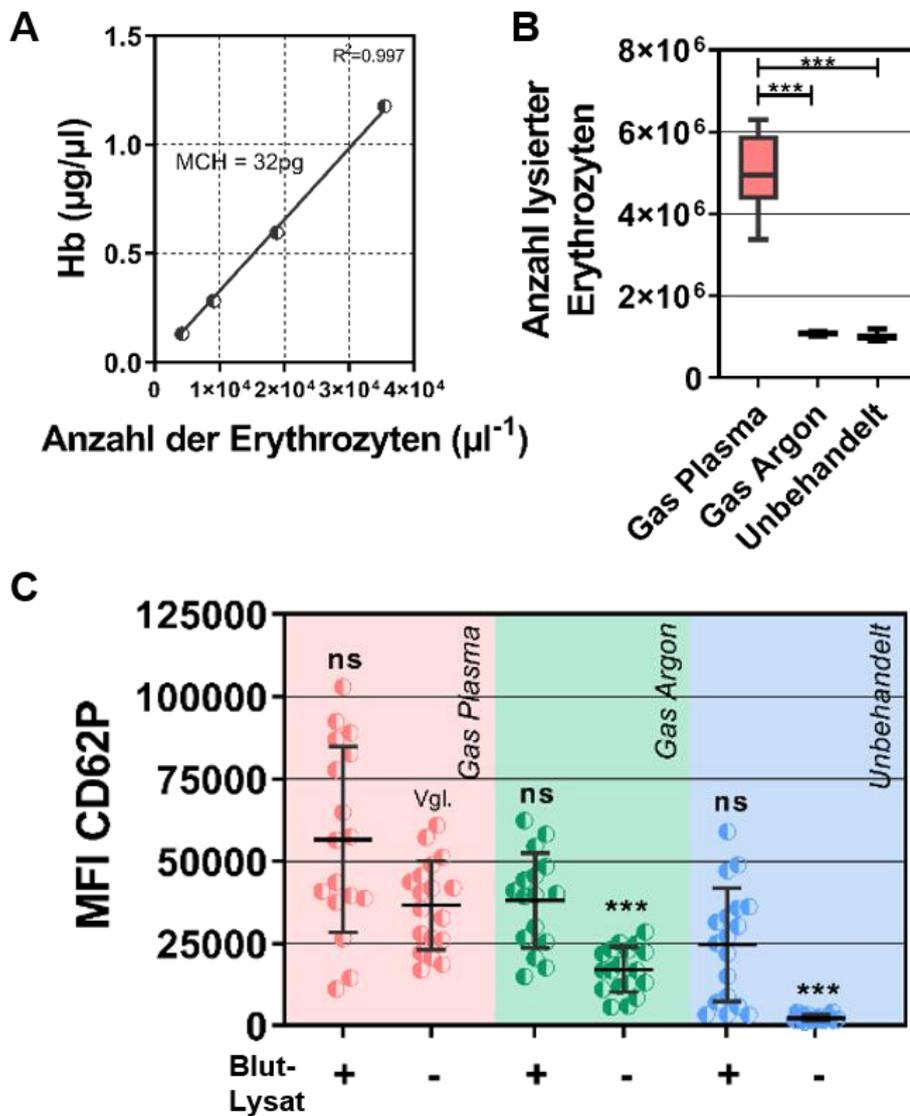
Es wurde eine Verdünnungsreihe erstellt und eine lineare Regression der Erythrozytenanzahl zur Hb-Konzentration durchgeführt. Das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression lautet:  $R^2=0,997$ . Damit konnte der MCH (engl.: *mean corpuscular hemoglobin*, Mittlerer Hämoglobin-Gehalt pro einzelnen Erythrozyten) ermittelt werden. Der ermittelte Wert beträgt ca. 32 pg und liegt im Referenzbereich von 28 bis 33 pg, wodurch die Präzision der Methode bestätigt wird (**Abbildung 19, A**) [122].

Mit Hilfe der Standardkurve wurde die Anzahl der lysierten Erythrozyten bestimmt. Der Median der lysierten Erythrozytenanzahl ist bei der Gas-Plasma behandelten Gruppe ca. 5 Millionen und bei der Gas-Argon bzw. unbehandelten Gruppe ca. 1 Million (**Abbildung 19, B**).

Nachfolgend wurde dem VB die gleiche Konzentration isotones BL hinzugegeben, welches bei diesem Gas-Plasma-Behandlungsregime durchschnittlich freigesetzt wurde und mit der Gas-Plasma-Behandlung kombiniert.<sup>27</sup> Durch die Zugabe des BL wurde in jedem Fall die Aktivierung der Thrombozyten erhöht. Weiterhin ergab die Vergleiche zwischen Gas-Plasma und einer Gruppe, bei welcher das BL hinzugegeben wurde, keinen signifikanten Unterschied. Die Aktivierung der Gas-Argon-Gruppe mit Zugabe von BL war im selben Maße erhöht, wie die des Gas-Plasmas (MFI(Gas-Argon BL): 37971; MFI(Gas-Plasma): 36496;  $p>0,999$ ) (**Abbildung 19, C**).

---

<sup>27</sup> Es wurde das Behandlungsregime der großen Volumina genutzt. Das Volumen, welches hinzugegeben wurde, war 10 % des Gesamtvolumens.



**Abbildung 19: Quantifizierung der Lyse von Erythrozyten und Thrombozytenaktivierung durch Blut-Lysat**

Es konnte mit Hilfe einer kombinierten spektroskopischen und durchflusszytometrischen Messung (A) die genaue Anzahl der lysierten Erythrozyten je Behandlungsgruppe ermittelt werden (B). Anschließend wurde über eine konzentrationsgleiche Zugabe von isotonen BL die Lyse-Eigenschaft des Gas-Plasmas näher untersucht. Dabei wurde ein ähnliches Ausmaß der Aktivierung der Gas-Argon-Gruppe mit BL, wie durch Behandlung mit Gas-Plasma erreicht (C).

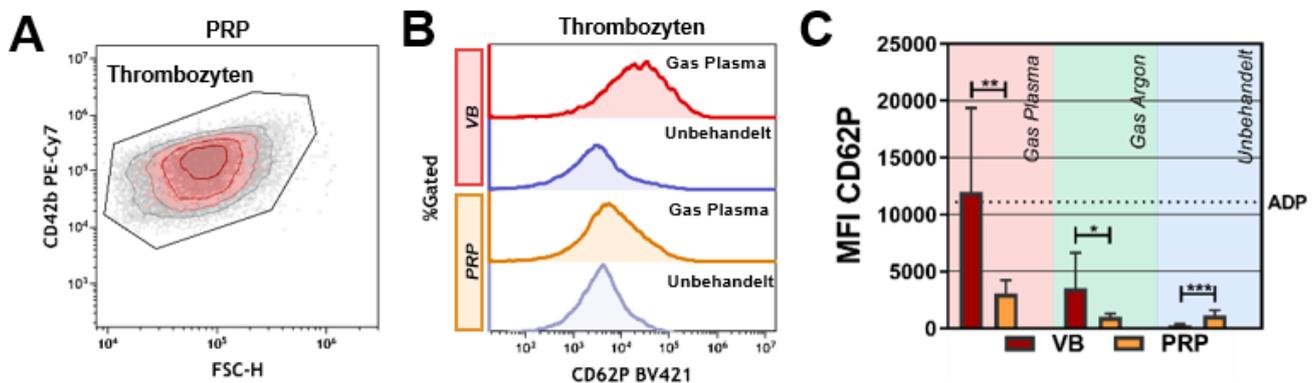
### 5.7.2. Gas-Plasma-Wirkung in PRP

Um die Ergebnisse zur Hämolyse weiter zu bekräftigen und den Einfluss des VB besser einschätzen zu können, wurde die Wirkung des Gas-Plasmas in PRP untersucht.

Bei den Experimenten stammte jeweils das VB und PRP vom selben Spender. Der experimentelle Prozess zwischen den Gruppen war, bis auf die Herstellung des PRP aus VB, komplett identisch. Die Thrombozyten wurden durchflusszytometrisch identifiziert (**Abbildung 20, A**) und deren Aktivierung anhand der Oberflächenexpression von CD62P ermittelt (**Abbildung 20, B**).

Allgemein lassen sich in jeder Behandlungsgruppe signifikante Unterschiede zwischen PRP und VB feststellen. Zwischen den unbehandelten Gruppen wird durch die Aufarbeitung des PRPs ein signifikanter Unterschied in der Aktivierung der Thrombozyten erreicht ( $p < 0,0001$ ). Die Gas-Argon-Gruppe hatte in VB eine höhere Signalintensität für CD62P als in PRP ( $p = 0,0312$ ). Der Grad der Aktivierung veränderte sich in PRP bei Gas-Argon-Behandlung unwesentlich (MFI(Unbehandelt): 1145; MFI(Gas-Argon): 1018).

Es konnte ein großer Unterschied in der Gas-Plasma-Wirkung zwischen VB und PRP festgestellt werden (MFI(VB): 11971; MFI(PRPR): 3046;  $p = 0,004$ ).



**Abbildung 20: Vergleich der Gas-Plasma-Wirkung in VB und PRP**

Es wurden Thrombozyten anhand ihres Rezeptorprofils erkannt (**A**). Anschließend wurde ein Overlay der Aktivierung der Thrombozyten der unterschiedlichen Gruppen vergleichend dargestellt (**B**). Die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Behandlungsgruppen wurden als Balkendiagramm dargestellt und jeweils VB mit PRP verglichen.

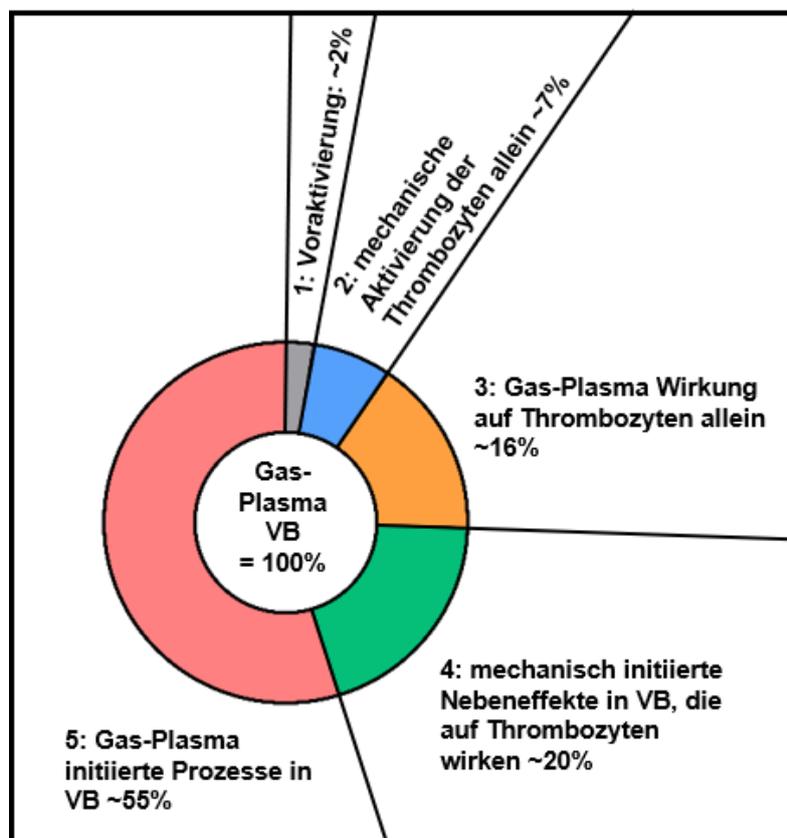
Wenn die Gruppen in Relation zu Gas-Plasma VB gesetzt werden, lassen sich Aussagen darüber treffen, wie sich die einzelnen Wirkkomponenten der Gas-Plasma-Behandlung in der Thrombozytenaktivierung widerspiegeln (**Abbildung 21**).<sup>28</sup>

<sup>28</sup> Dieser Betrachtungsweise liegt eine lineare Beziehung zugrunde, in welcher sich die einzelnen Komponenten aufaddieren und sich nicht gegenseitig beeinflussen, was jedoch nicht der Physiologie der Thrombozyten entspricht. Es kann jedoch dazu dienen, sich ein Überblick über die Komponenten der Gas-Plasma-Wirkung zu verschaffen.

Die Voraktivierung der Thrombozyten spiegelt die physiologische Grundaktivierung bzw. die Manipulation durch die Blutentnahme wider und macht 2 % aus (**Abbildung 21 1**, entspricht MFI(Unbehandelt VB)). Die mechanische Manipulation, welche durch die Zentrifugation bei der PRP-Aufbereitung bzw. der Argon-Behandlung von PRP zustande kommt, hat auf Thrombozyten allein einen Effekt von 7 % (**Abbildung 21 2**, entspricht MFI(Argon PRP)-MFI(Unbehandelt VB)). Dies wird auch dadurch unterstützt, dass Argon PRP und Unbehandelt PRP sich nicht wesentlich unterscheiden.

Die Plasmawirkung auf Thrombozyten ohne VB Einfluss lässt sich mit 16% beziffern (**Abbildung 21 3**, entspricht MFI(Plasma PRP)-MFI(Argon PRP)). Die mechanisch ausgelösten Nebeneffekte in VB machen einen Anteil von ca. 20 % aus (**Abbildung 21 4**, entspricht MFI(Argon VB)-MFI(Argon PRP)).

Der Großteil der Gas-Plasma-Wirkung mit 55 % lässt sich auf die Mechanismen zurückführen, die in VB ausgelöst werden (**Abbildung 21 5**, entspricht MFI(Plasma VB)-MFI(Argon VB)).



**Abbildung 21: Übersicht zu den Wirkungskomponenten Gas-Plasma-vermittelter Thrombozytenaktivierung**

## 6. Diskussion

### 6.1. Hämolyse als Mediator der Gas-Plasma-vermittelten Thrombozytenaktivierung

Ziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen herauszufinden, wie Gas-Plasma auf die Physiologie des Thrombozyten wirkt, sodass eine gerinnungsfördernde Antwort des Thrombozyten folgt. Der Arbeit ging eine Untersuchung im murinen Modell voraus, die Thrombozyten als Hauptmediator in der durch Gas-Plasma-vermittelten Blutgerinnung diagnostizierte [85]. Somit wurde der Fokus der Arbeit auf die Mechanismen gelegt, wie die Thrombozyten aktiviert werden.

Der Großteil der Aktivierung der Thrombozyten ließ sich auf die Hämolyse zurückführen, die durch Gas-Plasma verursacht wurde. Dies wurde dadurch gezeigt, dass die Gas-Plasma-Wirkung in VB größer ist als in PRP. Weiterhin konnte mit einer Zugabe von einer gleichen Konzentration isotonen Hämolysat zu VB und einer Behandlung mit Argongas eine ähnliche Wirkung wie durch Gas-Plasma-Behandlung erreicht werden.

Die Bedeutung der Hämolyse zur Gas-Plasma-vermittelten Blutgerinnung wurde schon vorher betont [96]. Jedoch wurde hierbei eine Membranbildung aus dem Lysat der Erythrozyten als Mechanismus angesehen und nicht weiter auf die Bedeutung der Thrombozyten eingegangen. Während der Hämolyse werden verschiedene Stoffe (engl.: *damage-associated molecular pattern*) freigesetzt, wie Hb, Häm, ATP und ADP [93, 123].

Die Freisetzung von Hb wurde in dieser Arbeit genutzt, um die Höhe der Hämolyse zu ermitteln. Dabei wurden nach 30 s Behandlung mit Gas-Plasma 174  $\mu\text{M}$  Hb in die Umgebung abgegeben. In einem vergleichbaren Experiment wurden bei einer Minute Behandlungszeit 15  $\mu\text{M}$  Hb freigesetzt [96].<sup>29</sup> Somit ist die Hämolyse, welche mit dem *kINPen 11* vermittelt wird, um einiges höher als die von vergleichbaren Plasmageräten. Dadurch, dass die Hämolyse als Hauptmediator der Gas-Plasma-vermittelten Thrombozytenaktivierung erkannt worden ist, ist anzunehmen, dass es große Unterschiede zwischen den Geräten in Bezug auf Blutgerinnung allgemein und deren Wirkung auf Thrombozyten gibt.

Weiterhin wurde eine Verdünnungsreihe von VB erstellt und eine spektroskopische Hb-Messung mit einer durchflusszytometrischen Zählung von Erythrozyten kombiniert. Dabei wurde ein Hb-Referenzwert für einen einzelnen Erythrozyten bestimmt (MCH) und eine genaue Anzahl der lysierten Erythrozyten ermittelt. Es wurden ca. 5 Millionen Erythrozyten bei einer

---

<sup>29</sup> Die Angaben zur Hb-Konzentration in der zitierten Quelle, als auch in dieser Arbeit, beziehen sich auf das einzelne Hb-Monomer, wie es häufig bei der spektroskopischen Messung von Hb vorgenommen wird [117].

30-sekündigen Behandlung mit Gas-Plasma lysiert, welches der Zellzahl in ca. einem  $\mu\text{l}$  reinem VB und 2 % des Gesamtvolumens bei diesem Regime entspricht.<sup>30</sup> Als Vergleich für den Untergang von 5 Millionen Zellen kann die Minderversorgung bei einem Schlaganfall dienen. Es entspricht der Anzahl von Neuronen, die innerhalb von 2,5 min bei totaler Sauerstoffdepletion zerstört werden [125].

Die Hämolyse als Mediator der Thrombozytenaktivierung wurde schon vorher thematisiert und in der Pathogenese von *vaso-okklusiven* Erkrankungen diskutiert [93, 126].

Dadurch, dass die Lyse von Blutzellen als Wirkungskomponente erkannt wurde, wäre es möglich, Plasmageräte anhand dieses Parameters zu optimieren. Denkbar wäre beispielsweise eine Änderung der Gaszusammensetzung [102].

---

<sup>30</sup> Die Rechnung bezieht sich auf eine Konzentration von 5 Millionen Erythrozyten/  $\mu\text{l}$  VB [124].

## 6.2. Untersuchung der Signaltransduktion der Thrombozyten

Die freigesetzten Nukleotide ATP und ADP können direkt an Rezeptoren des Thrombozyten wirken [25, 26, 34]. Zuvor wurde eine Hemmung der Gas-Plasma-Wirkung durch Clopidogrel beschrieben, dessen aktiver Metabolit<sup>31</sup> den ADP-Rezeptor P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> inhibiert [85, 127].

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von verschiedenen Inhibitoren der Signaltransduktion eine PI3K/ Akt/ p38-vermittelte Signalkaskade nachgewiesen. Dies gibt den Teil der Signalkaskade wieder, welcher von der  $\beta/\gamma$ -Untereinheit von G<sub>i</sub> vermittelt wird, welches an P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> gekoppelt ist [41, 50].

Bei der Verwendung von Ly294002, einem PI3K-Inhibitor, wurde eine maximale Hemmung von ca. 56 % nachgewiesen, welches dem prozentualen Anteil entspricht, welcher auf die Hämolyse zurückgeführt wurde [67]. Die Hemmung von Akt konnte jedoch nicht dazu führen, dass die Thrombozyten weniger aktiviert wurden, obwohl die verwendeten Inhibitoren Tricibin und MK-2206 an allen bekannten Akt-Isoformen (1,2,3)<sup>32</sup> wirken [128, 129]. Die Plasmawirkung konnte durch den mTOR-Inhibitor Rapamycin reduziert werden. Die Rolle von mTOR wurde anhand von ADP- und Kollagen- induzierter Thrombozytenaktivierung untersucht [130, 131]. Trotz widersprüchlicher *in-vitro* Ergebnisse kann bei dem Einsatz von mit Rapamycin beschichteten Stents eine verringerte Thrombozytenaggregation beobachtet werden [132].

Weiterhin war es nicht möglich, mit den verwendeten Inhibitoren verschiedener Isoformen der PKC eine signifikante Reduktion der Thrombozytenaktivierung hervorzurufen, sodass Folgereaktionen von G<sub>q</sub> wenig bedeutsam scheinen [40].

Für die Konzentrationsfindung und Vorauswahl der untersuchten Inhibitoren wurden zwei Kriterien definiert. Das erste Kriterium, welches die minimale Beeinflussung der Thrombozytenaktivierung von 15 % bei Gas-Plasma-Behandlung beinhaltet, sollte einschränken, dass nur Inhibitoren untersucht werden, die einen relevanten Einfluss auf die dominierende Signaltransduktion haben. Dies liegt darin begründet, dass Thrombozyten durch Ausschüttung von Mediatoren andere Signalkaskaden initialisieren und diese untereinander stark interagieren [40, 41].

Das zweite Kriterium beinhaltet, dass die Hinzugabe des Inhibitors die Thrombozytenaktivierung um nicht mehr als 300 % variieren darf, bevor davon ausgegangen werden muss, dass das Experiment durch Hinzugabe des Inhibitors verfälscht wurde. Dadurch, dass die Untersuchungen in VB vollzogen wurden und viele unterschiedliche Zellen

---

<sup>31</sup> Clopidogrel ist ein Prodrug [127].

<sup>32</sup> Es sind bisher nur die Isoformen Akt 1 & 2 in Thrombozyten nachgewiesen worden [53].

nebeneinander vorliegen, muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Zellen sich gegenseitig beeinflussen und unterschiedlich auf den Inhibitor reagieren können. Die unterschiedliche Antwort der Umgebung auf den Inhibitor würde sich als Fehler in den Messungen widerspiegeln. Deshalb wurde das zweite Kriterium gewählt, um den Einfluss von sekundären Effekten zu reduzieren bzw. einschätzen zu können.

Das zweite Kriterium war für den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA von Nutzen [62]. Dadurch, dass es eine aktivierende Wirkung auf Thrombozyten vermittelt hat, ist es eine Beeinflussung der Aktivierung durch Gas-Plasma wahrscheinlich.

Es wurde zuvor beschrieben, dass extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  die Gas-Plasma-vermittelte Thrombozytenaktivierung beeinflusst. Dies wurde mit der erhöhten Aktivierung bei Heparin im Vergleich zu EDTA-antikoagulierten Blutproben erkannt [102]. Das EDTA senkt die Konzentration des freien  $\text{Ca}^{2+}$  durch Chelation [133]. Die Wirkung des freien  $\text{Ca}^{2+}$  auf Thrombozyten kann unter anderem über den ligandenabhängigen Ionenkanal  $\text{P}_2\text{X}_1$  vermittelt werden, dessen Öffnungswahrscheinlichkeit durch ATP kontrolliert wird [33, 34]. In einer anderen Studie wurde beschrieben, dass Schwankungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erst bei längeren Behandlungszeiten auftreten und damit nicht zu den frühen Prozessen der Blutgerinnung beitragen können, da sichtbare Gerinnungsprozesse schon vorher eintreten [89]. Somit könnte der Einfluss der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu einem späteren Moment der Gas-Plasma-vermittelten Aktivierung eine Bedeutung zukommen. Das  $\text{Ca}^{2+}$  könnte unter anderem aus den *dense*-Granula stammen, welche in Folge der Thrombozytenaktivierung ausgeschüttet wurden [22].

Neben dem Einfluss des Hämolysats gibt es die Möglichkeit, dass NO über Diffusion selbst eine Reaktion auf die Thrombozyten vermitteln kann [56, 57]. Es ist nachgewiesen, dass der Gas-Plasmajet NO produziert [134]. NO hat eine Aktivierung der sGC, nachfolgend der PKG und p38, zur Folge, welche auch Mechanismen der Thrombozytenaktivierung vermitteln [41, 57, 58]. Dies könnte die Gas-Plasma-Wirkung auf die Thrombozyten allein begründen, auf welche ca. 16 % entfallen. Die Wirkung von NO ist früh aktivierend und subsequent inhibierend [57]. Weiterhin reagiert NO mit freiem oxygeniertem Hb zu Methämoglobin und Nitrat, wodurch das freie NO reduziert wird [135]. Die Oxidation von oxygeniertem Hb zu Methämoglobin als Teil der Gas-Plasmawirkung wurde in dieser Arbeit über ein spektroskopisches Verfahren nachgewiesen, welches auf einem linearen Gleichungssystem und dem Labert-Beer'schen Gesetz aufbaut [114, 115]. Durch die Freisetzung von Hb und die Signaltransduktionsprozesse im Thrombozyten ist die aktivierende Wirkung von NO auf den

Beginn der Gas-Plasma-Behandlung limitiert. Dass freies Hb die Bioverfügbarkeit von NO reduziert, wurde an VB von Patienten mit Sichelzellerkrankung nachgewiesen [136].

Mit Hilfe eines Imaging-Cytometers konnte die Aggregatbildung der Thrombozyten quantifiziert werden. Für die Auswertung wurde ein eigens entwickeltes Programm verwendet, welches auf künstlichen neuronalen Netzen aufbaut und durch die Unterteilung in unterschiedlichen Aggregatgrößen eine höhere Genauigkeit im Vergleich zu bestehenden Auswertungstechniken bietet [112, 137, 138]. Bei diesen Experimenten konnte eine Aggregation nachgewiesen werden, die der von 100  $\mu$ M ADP entspricht. Ähnliche Ergebnisse konnten mit einem Durchflusszytometer in Vergleich zu Convulxin<sup>33</sup> nachgewiesen werden, welches jedoch nicht die Auflösung in unterschiedliche Aggregatgrößen bietet [85]. Die Aggregatmessung in dieser Arbeit wurden mit antikoaguliertem Blut produziert und betrachten Mikroaggregate aus einzelnen wenigen Thrombozyten. Deshalb ist es nicht mit einer Thrombozytenaggregation, wie sie durch ein Aggregometer gemessen wird, vergleichbar [140]. Die Bildung von Mikroaggregaten der Thrombozyten kann über den Einfluss der Thrombozytenaktivierung auf Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 erklärt werden [141]. Während der Aktivierung erhöht das Integrin die Affinität für Fibrinogen oder vWF [142, 143]. An diesen Molekülen können wieder andere Thrombozyten binden, wodurch die Aggregation resultiert.

Bei der Untersuchung von mechanistischen Aspekten der Blutgerinnung muss das Modell, in welchem die Untersuchungen stattfinden, beachtet werden. Bei *in-vitro*-Studien muss zunächst eine primäre Antikoagulation des Blutes erreicht werden, um es weiter zu untersuchen. Die Wahl des Antikoagulans allein kann einen großen Effekt auf die Ergebnisse haben [102]. Jedoch ist der Umstand, dass die Gas-Plasma-Behandlung antikoaguliertes Blut zur Gerinnung bringen kann, ein Indiz dafür, wie stark die gerinnungsfördernde Wirkung ist [89, 97, 102].

Für die durchflusszytometrische Erhebung der Thrombozytenaktivierung wurde der Oberflächenrezeptor CD62P (P-Selektin) genutzt, da es als Goldstandard für *in-vitro*-Untersuchungen gilt [23, 144]. Für die Messung wurde ein Verfahren weiterentwickelt, wodurch viele Messungen in kurzer Zeit möglich wurden und welches die Wirkung der Thrombozyten zu einem gewünschten Zeitpunkt fixiert [23, 102]. Weiterhin wurde durch die Verwendung von motorisierten Fahrtischen eine hohe zeitliche und örtliche Präzision bei der Gas-Plasma-Behandlung erreicht.

In dem Modell wurde darauf geachtet, dass möglichst VB verwendet wurde, um die Antwort der Thrombozyten im natürlichen Milieu zu untersuchen und um die mechanische Manipulation

---

<sup>33</sup> Convulxin ist das Gift der Schauer-Klapperschlange (*crotalus durissus terrificus*), welches seine Wirkung am GPVI Rezeptor der Thrombozyten entfaltet [139].

möglichst gering zu halten [23, 145]. Häufig finden Untersuchungen zu der Physiologie von Thrombozyten in PRP statt [90]. Jedoch gibt es viele verschiedene Aufbereitungsvarianten zur Herstellung von PRP, wodurch sich die Zellzahlen und der Gehalt von Thrombozyten stark unterscheiden [104]. So wird in der Literatur je nach Anzahl der Thrombozyten im Blutplasma zwischen *platelet-poor plasma* (PPP) und *platelet-rich plasma* (PRP) differenziert [104]. In Bezug auf Blutgerinnung durch Gas-Plasma wurde ein Effekt auf PRP, aber nicht auf PPP berichtet [90].

### 6.3. Reaktive Spezies als Vermittler der Wirkung von Gas-Plasma

Hauptmediator der Gas-Plasma-Wirkung sind reaktive Spezies, wobei neben NO, unter anderem Wasserstoffperoxid, hypochlorige Säure, Superoxidanion, atomares Sauerstoff und Singulett-Sauerstoff vorkommen [81, 146].

Wasserstoffperoxid und hypochlorige Säure konnte bei alleiniger, direkter Zugabe zu VB keine Thrombozytenaktivierung bewirken. Weiterhin konnte die Gas-Plasma-Wirkung nicht mit Katalase reduziert werden, welches Wasserstoffperoxid neutralisiert [147]

Es gab zwar eine Reduktion der Thrombozytenaktivierung in Anwesenheit des Antioxidans NAC, jedoch war diese nicht signifikant.<sup>34</sup> NAC neutralisiert vielfältige ROS-Entitäten, vor allem Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale [148, 149]. Deshalb kann eine Beteiligung von diesen ROS vermutet werden.

Es wurde nachgewiesen, dass Singulett-Sauerstoff, wenn es einzeln auf Erythrozyten wirkt, eine Hämolyse verursachen kann [150]. Singulett-Sauerstoff wurde als Wirkkomponente des *kINPen*-Gas-Plasmas identifiziert und kommt als Initiator der Gas-Plasma-vermittelten Thrombozytenaktivierung in Frage [80]. Weiterhin ist bekannt, dass Singulett-Sauerstoff aus einer Reaktion von Wasserstoffperoxid und hypochloriger Säure hervorgehen kann [151]. Somit ließe sich die vermutete Beteiligung von Wasserstoffperoxid oder hypochloriger Säure begründen, die nicht auf das jeweilige Agens allein zurückgeführt werden konnte.

Es ist eine Bedeutung von Superoxidanionen bei der Thrombin-vermittelten Thrombozytenaktivierung dokumentiert, welche ebenfalls von der Gas-Plasmajet-Quelle produziert werden [152, 153]. Da die Experimente im heparinisiertem VB stattfanden, wurde die Wirkung von Thrombin gehemmt [154]. Durch den Einsatz von Superoxiddismutase (SOD), welches Superoxidanionen neutralisiert, konnte die Gas-Plasma-vermittelte Thrombozytenaktivierung nicht reduziert werden [155]. Somit kommt Superoxidanionen bei der Gas-Plasma-vermittelten Thrombozytenaktivierung ein geringer Stellenwert zu. Es wurde ebenfalls kein Anhaltspunkt in der Signalkaskade gefunden, die aus einer Thrombin-ähnlichen Wirkung resultiert.

Die Teilchendichte von Ozon im Gas-Plasma-Effluenten ist verglichen mit anderen Spezies sehr hoch [80, 81]. Ozon reagiert unter anderem mit ungesättigten Fetten aus dem Blut zu Wasserstoffperoxid [156]. Weiterhin wurde schon 1999 eine vermehrte Thrombozytenaggregation beobachtet, wenn Ozon als Gas auf PRP geleitet wurde. Bemerkenswerterweise wurde zu diesem Zeitpunkt schon eine  $Ca^{2+}$ -Abhängigkeit der Ozon-

---

<sup>34</sup> Als Begleiterkenntnis dieser Arbeit wurde festgestellt, dass NAC selbst Reaktionen mit Hb eingeht, die jedoch nicht weiter untersucht wurden. Diese werden in dem Appendix vorgestellt.

induzierten Thrombozytenaggregation publiziert [157]. Weiterhin wurde eine ozonabhängige Hämolyse beschrieben, welche zu diesem Zeitpunkt als unerheblich eingestuft wurde, da die Ozonkonzentrationen bei diesen *in-vitro*-Experimenten für deren eigentliche Intention viel zu hoch war [158, 159]. Die Mechanismen, wie die Hämolyse chemisch zu erklären ist, wurden nicht aufgeklärt. Für die Behandlung mit Ozon wurde eine sehr geringe Bildung von Methämoglobin beschrieben. Jedoch lässt sich damit nicht das Ausmaß der Methämoglobin-Bildung erklären, welches in dieser Arbeit erhoben wurde [158].

Eine weitere reaktive Spezies ist atomarer Sauerstoff [80]. Die Herstellung von atomarem Sauerstoff als einzelne Entität ist sehr schwierig, wodurch es einen Mangel an Literatur gibt, die potenzielle Reaktionsweisen erklären könnten.

Mitotempo akkumuliert in der mitochondrialen Membran und wurde zur Neutralisation von intrazellulären ROS genutzt [119, 120]. Dadurch, dass es die Wirkung des Gas-Plasmas reduzieren konnte, wurde eine Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials angeschlossen. Dabei wurde nach einer 35-minütigen Inkubation eine Hyperpolarisation festgestellt. Eine frühe Hyperpolarisation wurde schon für andere Agonisten beschrieben [160]. Bei Patienten mit Sichelzellerkrankung konnte freies Hb, zu einer Thrombozytenaktivierung führen, welche mit einer Hyperpolarisation der mitochondrialen Membran und erhöhten intrazellulärer ROS-Produktion vergesellschaftet ist. Dies wurde auf eine Hemmung von der Aktivität von Komplex-V der Atmungskette zurückgeführt [161]. Ob eine ähnliche Wirkungsweise für die Gas-Plasma-induzierte Thrombozytenaktivierung in Frage kommt, wäre Gegenstand weiterer Forschung.

#### **6.4. Physikalische Änderungen bei Gas-Plasma-Behandlung**

Bei der Untersuchung der Mechanismen von Gas-Plasma kommt der Veränderung der Temperatur eine besondere Rolle zu, da die bereits klinisch eingesetzte Argon-Plasma-Koagulation mit heißen Plasmen arbeitet [162, 163]. In dieser Arbeit wurde eine Messung mittels einer Infrarotkamera durchgeführt. Für die Untersuchung wurde das VB schwarz gefärbt, um die Temperatur an der Oberfläche des VB bei der Gas-Plasma-Behandlung zu ermitteln. Dies war notwendig, damit bei der Berechnung der wahren Temperatur der Emissionsgrad  $\epsilon$  des Stefan-Boltzmann-Gesetzes gleich eins angenommen werden kann, was nur für schwarze Körper der Fall ist [113].

Dies war die erste Infrarot-Temperatur-Messung der behandelten Flüssigkeit bei einer Gas-Plasma Anwendung. Die Methode liefert bei der Gas-Plasma-Behandlung eine orts aufgelöste Temperatur der Oberfläche der Flüssigkeit in Abhängigkeit der Behandlungszeit. Es wurden geringe Temperaturänderungen nachgewiesen, welche sich bei der Standardbehandlung mit Gas-Plasma im Bereich von  $+5^{\circ}\text{C}$  beliefen. Für die Argon-Kontrolle konnte ein kühlender Effekt nachgewiesen werden. Durch diesen Unterschied wäre es in Zukunft sinnvoll, erwärmtes Argongas als Negativkontrolle zu nutzen, da die kühlenden Effekte des Argongases eventuell andere Reaktionen bedingen.

Gleichzeitig konnte mit diesem Experiment eine temperaturneutrale Entfernung des Plasmajets ermittelt werden, welche sich auf ca. 49 mm beläuft.

Die bisherigen Experimente zum Ausschluss der Temperatur im Bereich der Gas-Plasma-vermittelten Blutgerinnung wurden mit einer Abschirmung durch Alufolie und einem Heißluftföhn mit anschließender makroskopischen Begutachtung vollzogen [89, 90]. Bei der Abschirmung mit Alufolie, sollte nur die Temperaturkomponente des Gas-Plasmas wirken, wodurch sich die Wirkung des Gas-Plasmas nicht reproduzieren ließ.

Bei der Untersuchung der Temperatur an PBS bei Gas-Plasma-Behandlung überwog der abkühlende Effekt, wobei eine Verringerung von  $1,5^{\circ}\text{C}$  bei 120 s Behandlung nachgewiesen wurde. Dabei wurde die Gesamttemperatur der Flüssigkeit erhoben. Dieser Effekt wurde mit der erhöhten Evaporation der Flüssigkeit begründet [81]. Dass die Temperatur in VB ansteigt, lässt sich auf die Blutgerinnung und die Entstehung eines Blutgerinnsels zurückführen, wodurch eine Oberfläche entsteht, die erwärmt werden kann.

Die Evaporation wurde in dieser Arbeit nicht an VB, sondern an einer Hb Lösung nachgewiesen. Über dem Anstieg der Konzentration in der Lösung wurde eine Verdunstung von ca.  $17 \mu\text{l}/\text{min}$  nachgewiesen. Somit ist die Verdunstung bei einer Standardbehandlungszeit von 5 s und einer Evaporation von  $0,85 \mu\text{l}$  als gering einzuordnen.

Die Verdunstung während der Gas-Plasma-Behandlung scheint jedoch stark von dem Gasfluss abzuhängen. So wurde bei einem Gasmengenstrom von 5 slm und destilliertem Wasser eine Verdunstung von ca. 1400 µl nach 20 min Behandlung festgestellt. Dies entspricht 70 µl/min [164]. In dieser Arbeit wurden 1 slm verwendet. Die Evaporation bei 5 slm war 4,1-mal höher. Die Plasmaquelle war mit der zitierten identisch [164].

Gas-Plasmajets generieren Ultraviolettstrahlung (UV) [165]. Weiterhin ist bekannt, dass UV-Strahlung in hohen Dosen DNA-Doppelstrangbrüche verursachen kann, die nachweislich karzinogen sind. Für den *kINPen* Gas-Plasmajet wurde die UV-Strahlung, die bei einer medizinischen Anwendung abgegeben wird, mit der UV-Strahlung verglichen, die benötigt wird, um einen Sonnenbrand auszulösen. Dabei wurde ein Bruchteil der benötigten UV-Strahlung an die Haut abgegeben [83].

Die definierten Grenzwerte müssen jedoch kritisch betrachtet werden. Bei der Anwendung an Wunden und Narben wird aufgrund von fehlenden Schutzmechanismen (Melanosomen) weniger UV-Strahlung benötigt, um bleibende Schäden hervorzurufen.

Die Mutagenität von Gas-Plasma wurde über die Bildung von Micronuklei in einem Zellkulturmodell untersucht. Micronuklei gelten als Surrogat für DNA-Schäden [166]. Es konnte nur ein gering erhöhtes Auftreten von Micronuklei nachgewiesen werden, welche jedoch nicht signifikant waren. Dadurch ist die karzinogene Wirkung des Gas-Plasmas als sehr gering zu werten [167].

In klinischer Anwendung wird Gas-Plasma als nebenwirkungsarm und gut verträglich beschrieben [168, 169].

## 6.5. Gas-Plasma zur Blutgerinnung in klinischer Praxis

Die Blutgerinnung mit Gas-Plasma besitzt hohes klinisches Potential. Die Vorteile sind eine punktgenaue Applikation ohne Körperkontakt, eine gleichzeitige Desinfektion und eine Förderung der Wundheilung [83, 170, 171]. Im Gegensatz zur häufig angewandten Kauterisation wird das Gewebe weniger tief zerstört [85, 172]. Somit stellt es eine schonende Methode zur Blutgerinnung dar.

Es wurde im Tiermodell die suffiziente Blutstillung an Lebern von Ratten und Mäusen beschrieben [85, 94, 98, 103]. Weiterhin konnte bei Hasen eine Blutung der Milz gestoppt werden [99]. Am Menschen wurde die Blutgerinnung an einer entnommenen Milz untersucht und es wurden in einem Case-Report an 9 Patienten intraoperative Erfahrung im Rahmen einer Endarteriektomie der Carotis gesammelt [88, 100]. Damit wurde der Hauptfokus in der Viszeral- und Gefäßchirurgie gelegt. Dabei war es möglich, Blutungen zu stillen, welche als schwierig behandelbar gelten.

Einen weiteren möglichen Nutzen könnte die Anwendung von Gas-Plasma bei akuten, unsterilen Hautwunden bieten. Die klinische Praxis sieht vor, dass unsterile Wunden häufig offen belassen oder mit einer Drainage versorgt werden müssen [173]. Durch die desinfizierende Wirkung, die Blutgerinnung und die Wundheilungsförderung wäre es denkbar, eine geschlossene Wundversorgung vorzunehmen [174]. Es wurde bereits die Koagulation von Hautwunden und von Venen im Tiermodell beschrieben, welche steril versorgt wurden. Die Untersuchungen haben sich nur der akuten Blutstillung, jedoch nicht dem kompletten Heilungsprozess gewidmet [95, 97, 175].

Langzeituntersuchungen nach Blutgerinnung mit Gas-Plasma an der Leber und Milz haben eine Wiederherstellung der physiologischen Gewebestruktur und nebenwirkungsarme Verläufe offengelegt [98, 99]. Ebenso wurde auf eine positive Modulation des Heilungsprozesses eingegangen, wobei einzelne Phasen des physiologischen Entzündungsprozesses verkürzt scheinen [99].

Die Nachteile von Gas-Plasma sind überwiegend in der Anwendungspraxis, der Geräte selbst und im wirtschaftlichen Bereich zu finden. Für Jet-Systeme muss eine kontinuierliche Versorgung mit einem Edelgas (z. B.: Argon) gewährleistet werden, was zu laufenden Kosten und zusätzlichen personellen Aufwand führt.

Daneben gibt es hohe Unterschiede in der Plasmaqualität der verfügbaren Geräte [82, 174]. Beispielsweise ist die Chemie des *kINPen MED* (neoplas tools GmbH, Deutschland) von O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> dominiert und die des *SteriPlas* (Adtec Healthcare, Groß Britannien) von NO<sub>2</sub> [80, 81, 176].

Somit sind die untersuchten Wirkungen und Anwendungen von einem Gerät nur bedingt auf ein anderes übertragbar.

Ebenso spielt der Wirkradius des Plasmagerätes eine Rolle. Die Wirkungsfläche des *kINPen MED* ist auf 1 cm<sup>2</sup> beschränkt [174]. Somit ergibt sich für größere Wunden eine lange Behandlungszeit und die Handhabung gestaltet sich als schwierig, um eine gleichmäßige Applikation von Gas-Plasma zu gewährleisten.

Für den Einsatz im chirurgischen Bereich ist die Sterilisation der Gas-Plasma-Applikatoren eine zwingende Grundlage, um eine breite Anwendung zu finden. Bisher gibt es jedoch keine Empfehlungen zur Sterilisation des *kINPen MED*-Plasmagerätes und keine Untersuchung dazu, wie sich eine wiederkehrende Sterilisation auf die Langlebigkeit auswirkt.

Eine Ausnahme unter den Plasmageräten ist der *J-Plasma* (Apyx Medical, USA), ein für die Chirurgie optimiertes Kaltplasmagerät, welches mit Helium als Trägergas arbeitet [177]. Es kombiniert einen Plasmajet mit den bekannten Funktionen eines monopolen Elektrokauters [101]. In dem Gerät wird eine Elektrode gleichzeitig zum Schneiden, zum Kauterisieren und zur Herstellung von Gas-Plasma zum Koagulieren verwendet. Ermöglicht wird dies durch eine verschiebbliche Elektrode, die eine auf die jeweilige Funktion abgestimmte Spannung, Stromstärke und einen entsprechenden Gasfluss aufweist [178, 179]. Dies ist in offenen und laparoskopischen Regimen möglich [179]. Mit diesem Gerät wird die Anwendung von Gas-Plasma sinnvoll in das bestehende Instrumentarium des Chirurgen integriert. Eine Sterilisation wird nach der Verwendung nicht vorgenommen, da das Handstück zum Einmalgebrauch vorgesehen ist [179]. Als hervorzuhebende Nebenwirkung wird von Hersteller eine Helium-Embolie genannt, die durch das Einbringen von Trägergas in Gefäße entstehen kann [180]. Die Plasmaquelle wurde bisher insbesondere im Bereich der ästhetischen Chirurgie angewandt. Es sind weitere Studien nötig, um eine ausreichende Sicherheit des Gerätes im klinischen Umfeld zu demonstrieren [181].

Bei Betrachtung von wirtschaftlichen Aspekten, ist anzumerken, dass die Gas-Plasma-Behandlung im Bereich der chronischen Wunden bisher nicht erstattungsfähig ist, obwohl seit 2010 positive klinische Erfahrungen gemacht wurden und die bessere Wirkung in einer prospektiven, randomisierten Studie im Vergleich zur Standardtherapie gesichert wurde [168, 169, 171, 182, 183]. Eine Aufnahme als neue Untersuchungs- und Behandlungsmethode (§ 6 Abs. 2 KHEntgG) wurde zuletzt 2021 vom Institut für das Entgeltsystem im Krankenhaus (InEK) abgelehnt [184].

Im Februar 2023 wurde eine Richtlinie zur Erprobung der Kaltplasmabehandlung bei chronischen Wunden vom gemeinsamen Bundesausschuss (GBA) herausgegeben. In der

Richtlinie wird ein Studienprotokoll zur Behandlung von chronischen Wunden beschrieben, welches eine Standard-Wundbehandlung mit Kaltplasmatherapie und eine Standard-Wundbehandlung ohne Kaltplasmatherapie vergleichen soll. In dieser Studie sollen GBA die notwendigen Erkenntnisse für die Bewertung des Nutzens der Methode gewonnen werden [185]. Die Anwendung des für die Chirurgie entwickelten Plasmageräts, *J-Plasma*, gilt als Off-Label-Prozedur in Deutschland [180].

Der Einsatz von Gas-Plasma für die Blutgerinnung besitzt großes Potential mit vielen Vorteilen gegenüber bestehenden Verfahren. Es gibt konkrete Anwendungsgebiete, welche umfangreich untersucht wurden und die Mechanismen der Koagulation werden zunehmend besser verstanden. In Hinblick darauf, dass Thrombozyten als Mediator der Blutgerinnung durch Gas-Plasma erkannt wurden, sollte die Indikation zur Verwendung von Gas-Plasma zur Blutgerinnung bei Patienten, die Thrombozytenaggregationshemmern einnehmen, vorsichtig erfolgen und es wäre in diesem Bereich weitere Forschung nötig [85, 110].

Ein nächster möglicher Schritt wäre der Vergleich zwischen der Gas-Plasma-Anwendung und der Standardtherapie zur intraoperativen Blutungskontrolle, bzw. chirurgischen Wundversorgung am Menschen im Rahmen einer klinischen Studie. Es sollten die Mängel in der Anwendungspraxis bei den bestehenden Argon-Systemen beseitigt werden, damit die Überführung in den Operationssaal und zur sterilen Wundversorgung erleichtert wird. Daneben sollte eine Untersuchung der Wirtschaftlichkeit erfolgen, damit Gas-Plasma breite Anwendung im Bereich der chirurgischen Blutgerinnung finden kann.

## 7. Zusammenfassung

Im Jahr 2020 wurden die 50-häufigsten Operationen insgesamt 15.823.464 mal durchgeführt und das entspricht rechnerisch ca. einer Operation auf fünf Einwohnern in Deutschland [186]. Bei jeder dieser Operationen ist die Blutungsstillung eine therapeutische Notwendigkeit. Intraoperativ wird dafür häufig die Elektrokauterisierung verwendet, die aber mit einem Risiko der Nachblutung, Perforation und Gewebeerstörung einhergeht [187–189]. Eine neue Variante zum Blutungsmanagement kann kaltes physikalisches Plasma (Gas-Plasma) darstellen. Dies ist ein energiereiches Gas, welches durch verschiedene Mechanismen, wie Temperatur, angeregte chemische Spezies, UV- und Wärmestrahlung, wechselwirkt. Zuvor wurde im Mausmodell bei der Verwendung von Gas-Plasma eine suffiziente Blutgerinnung erreicht und es wurden Thrombozyten als Hauptmediator der Koagulationswirkung identifiziert [85]. Daneben finden sich einzelne Fallstudien zur intraoperativen Anwendung von Gas-Plasma [100, 101]. Dies kennzeichnet den Beginn des Transfers der Grundlagenforschung in den klinischen Alltag („bench-to-bedside-transfer“). Es wurden *in-vitro* Untersuchungen an menschlichem Blut durchgeführt, um einen Wirkungsmechanismus von Gas-Plasma zu demaskieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass ein Großteil der Thrombozytenaktivierung durch Gas-Plasma (ca. 55 %) auf eine Lyse der Erythrozyten zurückzuführen ist. Die Hämolyse wurde spektroskopisch nachgewiesen und in Abhängigkeit von der Behandlungszeit quantifiziert. Die Thrombozyten reagieren mit einer PI3K/Akt/p38-vermittelten Signalkaskade, welche schließlich zu deren Aktivierung führt. Bei der Signaltransduktion wurde eine Bedeutung von intrazellulären ROS und eine Hyperpolarisation der Mitochondrien der Thrombozyten festgestellt. Die Signaltransduktion kann über den Einfluss von ADP auf den P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>-Rezeptor erklärt werden [85]. Es wurde ein auf künstliche Intelligenz basierender Auswertungsalgorithmus angewandt, welcher den Nachweis von vermehrten Thrombozytenaggregaten nach Applikation von Gas-Plasma erbrachte. Gas-Plasma wirkt über eine Vielzahl an reaktiven Spezies und es wurde ein alleiniger Einfluss von Wasserstoffperoxid, hypochloriger Säure und Superoxidanionen ausgeschlossen [81]. Die Erklärung der Hämolyse wurde auf Singulett-Sauerstoff und Ozon zurückgeführt [150, 158, 159]. Daneben kann NO direkt auf Thrombozyten wirken [57, 136]. Es wurde die erste Messung der oberflächlichen Temperatur einer Flüssigkeit bei Behandlung mit Gas-Plasma vollzogen. Dabei wurde eine geringe Änderung der Temperatur festgestellt. Weiterhin wurde der Einfluss der Evaporation als gering gewertet. Da die Anwendung von Gas-Plasma körpereigene Gerinnungsmechanismen beschleunigt, desinfizierend wirkt und nebenwirkungsarm ist, besitzt Gas-Plasma großes klinisches Potential im Bereich der chirurgischen Blutgerinnung [170, 171].

## 8. Appendix

### 8.1. Nomenklatorische Hinweise und Übersicht der reaktiven Spezies

In diesem Abschnitt sollen einige nomenklatorische Schwierigkeiten von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) besprochen werden.

Die Bezeichnung ROS bezieht sich auf Sauerstoffverbindungen, welche reaktiver<sup>35</sup> sind als O<sub>2</sub> [191]. Radikale sind Atome oder Moleküle mit mindestens einem ungepaarten Elektron, welche in der schriftlichen Bezeichnung durch einen „Punkt“ gekennzeichnet werden [192, 193].

In der Literatur wird häufig betont, dass alle Sauerstoffradikale ROS, aber nicht alle ROS Radikale des Sauerstoffs sind [191].

Diese Vereinfachung ist jedoch nicht allgemeingültig, da Disauerstoff (O<sub>2</sub>, „Normalform“ des Sauerstoffs) selbst durch eine besondere Elektronenkonfiguration im Grundzustand zwei ungepaarte Elektronen besitzt und damit ein Diradikal ist. Weiterhin ist es nicht besonders reaktiv [194].

Ozon (O<sub>3</sub>) ist selbst kein Radikal, aber sehr reaktiv. So können bei Folgereaktionen mit Ozon Radikale entstehen [195]. Somit sollte der Begriff Radikal nur verwendet werden, wenn eine chemische Eigenschaft gemeint wird.

Durch Energiezufuhr zum Disauerstoff lässt sich Singulett-Sauerstoff herstellen. Dieser Singulett-Sauerstoff kann nun in zwei unterschiedlichen Elektronenkonfigurationen vorliegen: O<sub>2</sub><sup>1</sup> Σg<sup>+</sup> und O<sub>2</sub><sup>1</sup> Δg. Dabei ist O<sub>2</sub><sup>1</sup> Σg<sup>+</sup> radikalisch und wandelt sich in O<sub>2</sub><sup>1</sup> Δg um. Deswegen wird meist bei der Bezeichnung Singulett-Sauerstoff auf O<sub>2</sub><sup>1</sup> Δg referenziert [196].

Singulett-Sauerstoff<sup>36</sup> ist jedoch nicht zu verwechseln mit atomarem Sauerstoff, welches aus einem einzelnen Sauerstoffatom besteht.

---

<sup>35</sup> Reaktivität ist ein qualitativer Ausdruck dafür, welches Vermögen ein Stoff besitzt, chemische Reaktionen einzugehen [190].

<sup>36</sup> Singulett-Sauerstoff erhält seine Bezeichnung aus der Betrachtung der Elektronenzustände. Wobei der Elektronenzustand „*singlet state*“ bezeichnend für Singulett-Sauerstoff ist [197]. Für weitere Informationen zu diesem Thema werden folgende Quellen empfohlen [191, 196, 198].

Es wurden zwei tabellarische Übersichten zu reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiven Stickstoffspezies (RNS) erstellt<sup>37</sup>.

**Tabelle 5: Übersicht wichtiger ROS und Sauerstoffverbindungen**

Spezies	Radikalisch	Deutsche Bezeichnung
$O^{\bullet}$	Ja	Atomarer Sauerstoff
$O_2^1 \Sigma g^+$	Ja	Singulett-Sauerstoff
$O_2^1 \Delta g$	Nein	Singulett-Sauerstoff
$O_2^{\bullet -}$	Ja	Superoxid-Anion/ Hyperoxid Anion
$O_3$	Nein	Ozon
$HO^{\bullet}$	Ja	Hydroxy-Radikal
$HOO^{\bullet}$	Ja	Hydroperoxyl-Radikal
$H_2O_2$	Nein	Wasserstoffperoxid
$HOCl$	Nein	Hypochlorige Säure
$R-O^{\bullet}$	Ja	Alkoxy-Radikal
$R-OO^{\bullet}$	Ja	Peroxy-Radikal

**Tabelle 6: Übersicht wichtiger RNS und Stickstoffverbindungen**

Spezies	Radikalisch	Deutsche Bezeichnung
$NO^{\bullet}$	Ja	Stickstoffmonooxid
$NO_2^{\bullet}$	Ja	Stickstoffdioxid
$NO_3^{\bullet}$	Ja	Nitrat-Radikal
$NO_2^-$	Nein	Nitrit
$NO_3^-$	Nein	Nitrat
$HNO_2$	Nein	Salpetrige Säure
$HNO_3$	Nein	Salpeter Säure
$NO^+$	Nein	Nitrosylkation
$ONOO^-$	Nein	Peroxinitrit-Anion
$O_2NOO^-$	Nein	Peroxinitrat-Anion

<sup>37</sup> Die Tabellen wurden modifiziert nach [191].

## 8.2. Fahrtischprogramm

Für die wissenschaftliche Auseinandersetzung mit Gas-Plasma zur Anwendung an lebender Materie ist eine standardisierte und reproduzierbare Behandlung notwendig. Dies wird durch Fahrtische (engl.: XYZ-Table), wie dem Fahrtisch *High-Z S-400* oder *High-Z S-150T* (CNC-Step), gewährleistet. Zur Bedienung dient die Software WinPC-NC 2.50/17 (Burkhard Lewetz). Die Software entnimmt die Behandlungskoordinaten, in diesem Fall die Wells, auf der Mikrotiterplatte und die Schrittfolge sowie die Zeiten aus einer Datei.

Zur Erstellung dieser Datei wurde ein Programm implementiert, dass es dem Anwender erleichtert, schnell und fehlerlos ein Behandlungsregime für Mikrotiterplatten zu entwerfen (Abbildung 22).

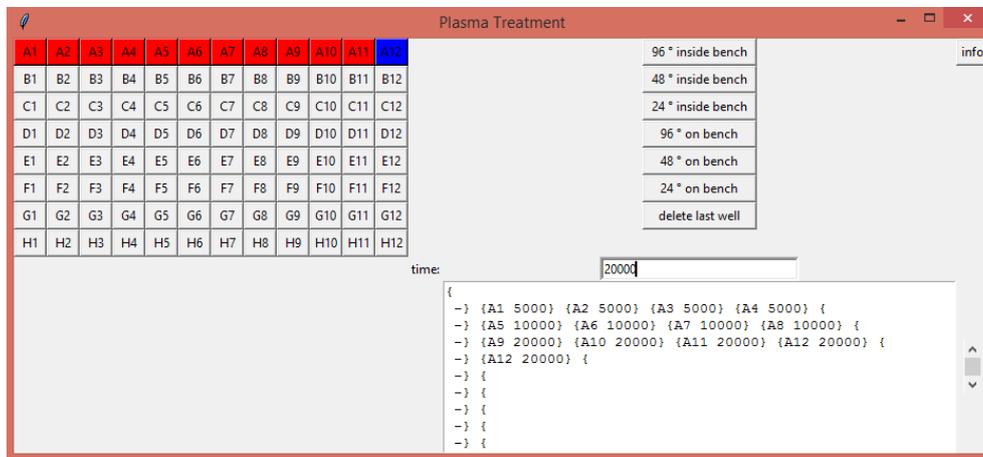


Abbildung 22: Programm zur Erstellung von Behandlungsregimen

Das Programm ist in der Programmiersprache Python (Version 3.9.0) geschrieben. Die Kernidee des Programmes ist eine Listenbearbeitung über eine graphische Benutzeroberfläche (engl.: *graphical user interface*, GUI) des Tk Toolkits.

Resultat des Programmes ist eine Textdatei, welche den G-Code zur Ansteuerung der CNC-Maschine enthält und für die Software lesbar ist. Dadurch wird eine standardisierte Behandlung (in ms Bereichen) gewährleistet.

### 8.3. Erweiterte statistische Informationen

#### 8.3.1. Zeitabhängigkeit der Thrombozytenaktivierung

Für die Analyse der Zeitabhängigkeit wurde eine Regression des Typs der einphasigen exponentiellen Assoziationsfunktion erstellt.

Die Regression wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$MFI(CD\ 62P) = 22,51(1 - e^{-0,9779 t}) + 1$$

Die Zeit  $t$  wird in Sekunden angegeben. Die Regression startet bei  $y=1$ , weil sie normalisiert wurde und der Wert  $y=1$  der Fluoreszenzintensität der unbehandelten Gruppe entspricht.

Zur Berechnung der halb-maximalen Aktivierung wurde folgende Formel verwendet:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln(2)}{0,9779}$$

#### 8.3.2. Untersuchung der Temperatur bei Behandlung mit Gas-Plasma

Für die Abhängigkeit der Temperatur von der Behandlungszeit wurde im Bereich von -5 bis 1 s eine Regression dritten Grades durchgeführt. Dieser Regressionstyp wurde ausgewählt, weil es möglich ist, damit die gemessenen Werte in diesem Bereich ausreichend gut anzunähern.

Die Kurve wird mit folgender Gleichung beschrieben ( $t$  in s):

$$\vartheta\ (\text{in } ^\circ\text{C}) = 0,04771 t^3 + 0,5586 t^2 + 1,627 t + 24,83$$

Es wurde der Tiefpunkt der Regressionsgrade ermittelt, um mit Hilfe der Absinkgeschwindigkeit die Entfernung zu ermitteln, bei welcher der Gas-Plasmajet keinen Temperatureffekt aufweist. Der Tiefpunkt dieser Gleichung befindet sich bei  $t=-1,937$  s. Der Tiefpunkt wurde mit Hilfe des Computeralgebrasystems *Maxima 17.10.4 (Sourceforge)* kontrolliert.

Der Fahrtisch *High-Z S-400* besaß eine konstante Absenkungsgeschwindigkeit von 20 mm/s. Es wurde noch die Entfernung der Flüssigkeitsoberfläche zum Gas-Plasmajet berücksichtigt. Die Näherung zur temperaturneutralen Entfernung beträgt 48,74 mm.

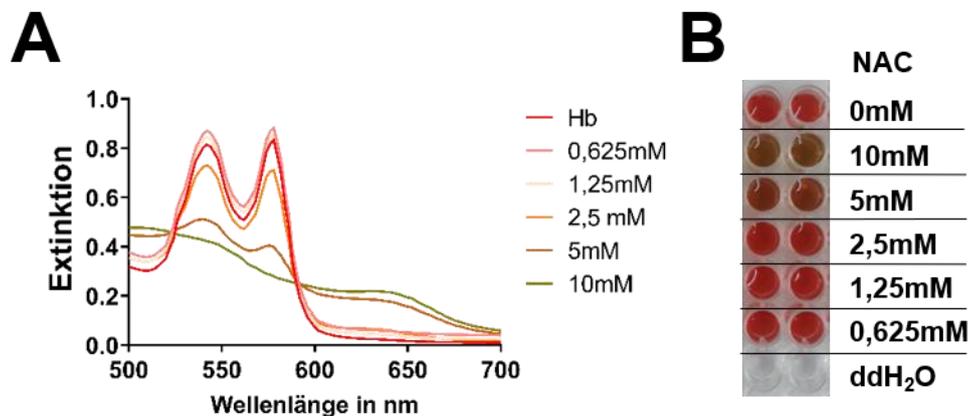
#### 8.4. Einfluss von N-Acetylcystein auf Hämoglobin

Es wurde während der Experimente eine Wirkung von NAC auf Hb nachgewiesen, die einen Einfluss auf die Untersuchungen zur Verringerung der Gas-Plasma-Wirkung durch Antioxidantien gehabt haben könnte.

Es wurde jeweils 100µl BL mit unterschiedlichen Konzentrationen NAC versetzt, 10 min inkubiert und anschließend das Absorptionsspektrum gemessen. Es wurden die Werte aus drei Einzelmessungen je Konzentration NAC gemittelt und aufgetragen (**Abbildung 23, A**).

Dabei wurde eine konzentrationsabhängige Wirkung des NAC festgestellt. Die Absorptionsspektren lassen durch die Zunahme im Bereich von 630 nm eine Umwandlung des Hb in Methämoglobin vermuten.

Die Veränderung der Absorption konnte optisch durch die Veränderung der Farbe des BL wahrgenommen werden (**Abbildung 23, B**).



**Abbildung 23: NAC-Wirkung auf Hb**

Es wurden die Absorptionsspektren von 500 bis 700 nm von BL nach Hinzugabe unterschiedlicher Konzentration von NAC dargestellt (**A**). Es wurde eine optisch sichtbare Verfärbung des BL ins braun-grünliche wahrgenommen (**B**).

## 9. Bibliografie

- [1] Boron WF, Boulpaep EL (2012). Medical Physiology, 2e Updated Edition: With STUDENT CONSULT Online Access. 448-455. London, Elsevier Health Sciences.
- [2] J.M. Stassen, J. Arnout, H. Deckmyn (2004). The Hemostatic System. Current Medicinal Chemistry;2245–2260.
- [3] Michelson AD (2013). Platelets: Third Edition. 367–369. Amsterdam, Elsevier.
- [4] Lefrançois E, Ortiz-Muñoz G, Cadrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, Thornton EE, Headley MB, David T, Coughlin SR, Krummel MF, Leavitt AD, Passegué E, Looney MR (2017). The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. Nature;544:105–109.
- [5] Scurfield G, Radley JM (1981). Aspects of platelet formation and release. Am J Hematol;10:285–296.
- [6] Lebois M, Josefsson EC (2016). Regulation of platelet lifespan by apoptosis. Platelets;27:497–504.
- [7] Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW, Zimmerman GA (2009). Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. J Thromb Haemost;7:241–246.
- [8] Lüllmann-Rauch R (2003). Histologie: Verstehen - Lernen - Nachschlagen. 232ff. Stuttgart, Thieme.
- [9] Yadav S, Storrie B (2017). The cellular basis of platelet secretion: Emerging structure/function relationships. Platelets;28:108–118.
- [10] Kaufmann E, Staemmler M (1969). Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie. 483ff. Berlin, De Gruyter; Walter de Gruyter GmbH.
- [11] White JG, Krumwiede M, Burris SM, Heagan B (1986). Isolation of microtubule coils from platelets after exposure to aggregating agents. Am J Pathol;125:319–326.
- [12] White JG, Clawson CC (1980). The surface-connected canalicular system of blood platelets--a fenestrated membrane system. Am J Pathol;101:353–364.
- [13] White JG (2005). Platelets are coverocytes, not phagocytes: uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system. Platelets;16:121–131.
- [14] Rosado JA (2011). Acidic Ca(2+) stores in platelets. Cell Calcium;50:168–174.
- [15] Vieira-de-Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, Zimmerman GA (2012). Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. Semin Immunopathol;34:5–30.
- [16] Farndale RW, Sixma JJ, Barnes MJ, Groot PG de (2004). The role of collagen in thrombosis and hemostasis. J Thromb Haemost;2:561–573.

- [17] Siediecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE (1996). Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood*;88:2939–2950.
- [18] Di Stasio E, Cristofaro R de (2010). The effect of shear stress on protein conformation: Physical forces operating on biochemical systems: The case of von Willebrand factor. *Biophys Chem*;153:1–8.
- [19] Rana A, Westein E, Niego B, Hagemeyer CE (2019). Shear-Dependent Platelet Aggregation: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Front Cardiovasc Med*;6:141.
- [20] Reininger AJ, Heijnen HFG, Schumann H, Specht HM, Schramm W, Ruggeri ZM (2006). Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood*;107:3537–3545.
- [21] Yun S-H, Sim E-H, Goh R-Y, Park J-I, Han J-Y (2016). Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *Biomed Res Int*;2016:9060143.
- [22] Archibald McNicol, Sara J. Israels (1999). Platelet Dense Granules: Structure, Function and Implications for Haemostasis. *Thromb Res*:1–18.
- [23] Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL, Furman MI (2000). Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods*;21:259–270.
- [24] Harper MT, Poole AW (2010). Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation. *J Thromb Haemost*;8:454–462.
- [25] Kim S, Kunapuli SP (2011). P2Y12 receptor in platelet activation. *Platelets*;22:56–60.
- [26] Murugappa S, Kunapuli SP (2006). The role of ADP receptors in platelet function. *Front Biosci*;11:1977–1986.
- [27] Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH (2004). Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol*;36:1187–1205.
- [28] Huang J-S, Ramamurthy SK, Lin X, Le Breton GC (2004). Cell signalling through thromboxane A2 receptors. *Cell Signal*;16:521–533.
- [29] Brass LF (2003). Thrombin and platelet activation. *Chest*;124:18S-25S.
- [30] Covic L, Gresser AL, Kuliopulos A (2000). Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry*;39:5458–5467.
- [31] Keularts IM, van Gorp RM, Feijge MA, Vuist WM, Heemskerk JW (2000). alpha(2A)-adrenergic receptor stimulation potentiates calcium release in platelets by modulating cAMP levels. *J Biol Chem*;275:1763–1772.

- [32] Newman KD, Williams LT, Bishopric NH, Lefkowitz RJ (1978). Identification of alpha-adrenergic receptors in human platelets by 3Hdihydroergocryptine binding. *J Clin Invest*;61:395–402.
- [33] Mahaut-Smith MP, Tolhurst G, Evans RJ (2004). Emerging roles for P2X1 receptors in platelet activation. *Platelets*;15:131–144.
- [34] Kahner BN, Shankar H, Murugappan S, Prasad GL, Kunapuli SP (2006). Nucleotide receptor signaling in platelets. *J Thromb Haemost*;4:2317–2326.
- [35] Ezumi Y, Uchiyama T, Takayama H (2000). Molecular cloning, genomic structure, chromosomal localization, and alternative splice forms of the platelet collagen receptor glycoprotein VI. *biochemical and biophysical research communications*;277:27–36.
- [36] Moroi M, Jung SM (2004). Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res*;114:221–233.
- [37] Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Whisstock JC, Berndt MC (2003). Glycoprotein Ib–IX–V. *Int J Biochem Cell Biol*;35:1170–1174.
- [38] Li R, Emsley J (2013). The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *J Thromb Haemost*;11:605–614.
- [39] Ozaki Y, Asazuma N, Suzuki-Inoue K, Berndt MC (2005). Platelet GPIb-IX-V-dependent signaling. *J Thromb Haemost*;3:1745–1751.
- [40] Stalker TJ, Newman DK, Ma P, Wannemacher KM, Brass LF (2012). Platelet signaling. *Handb Exp Pharmacol*:59–85.
- [41] Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X (2010). Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;30:2341–2349.
- [42] Hunter RW, Mackintosh C, Hers I (2009). Protein kinase C-mediated phosphorylation and activation of PDE3A regulate cAMP levels in human platelets. *J Biol Chem*;284:12339–12348.
- [43] Konopatskaya O, Gilio K, Harper MT, Zhao Y, Cosemans JMEM, Karim ZA, Whiteheart SW, Molkentin JD, Verkade P, Watson SP, Heemskerk JWM, Poole AW (2009). PKC $\alpha$  regulates platelet granule secretion and thrombus formation in mice. *J Clin Invest*;119:399–407.
- [44] Bergmeier W, Stefanini L (2009). Novel molecules in calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost*;7 Suppl 1:187–190.
- [45] Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH (2010). The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol*;11:288–300.

- [46] Smolenski A (2012). Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets. *J Thromb Haemost*;10:167–176.
- [47] El-Daher SS, Patel Y, Siddiqua A, Hassock S, Edmunds S, Maddison B, Patel G, Goulding D, Lupu F, Wojcikiewicz RJ, Authi KS (2000). Distinct localization and function of (1,4,5)IP(3) receptor subtypes and the (1,3,4,5)IP(4) receptor GAP1(IP4BP) in highly purified human platelet membranes. *Blood*;95:3412–3422.
- [48] Butt E, Gambaryan S, Göttfert N, Galler A, Marcus K, Meyer HE (2003). Actin binding of human LIM and SH3 protein is regulated by cGMP- and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation on serine 146. *J Biol Chem*;278:15601–15607.
- [49] Jantzen HM, Milstone DS, Gousset L, Conley PB, Mortensen RM (2001). Impaired activation of murine platelets lacking G alpha(i2). *J Clin Invest*;108:477–483.
- [50] Hirsch E, Bosco O, Tropel P, Laffargue M, Calvez R, Altruda F, Wymann M, Montrucchio G (2001). Resistance to thromboembolism in PI3Kgamma-deficient mice. *FASEB J*;15:2019–2021.
- [51] Watanabe N, Nakajima H, Suzuki H, Oda A, Matsubara Y, Moroi M, Terauchi Y, Kadowaki T, Suzuki H, Koyasu S, Ikeda Y, Handa M (2003). Functional phenotype of phosphoinositide 3-kinase p85alpha-null platelets characterized by an impaired response to GP VI stimulation. *Blood*;102:541–548.
- [52] Wang L, Liu G, Wu N, Dai B, Han S, Liu Q, Huang F, Chen Z, Xu W, Xia D, Gao C (2021). mTOR regulates GPVI-mediated platelet activation. *J Transl Med*;19:201.
- [53] Woulfe DS (2010). Akt signaling in platelets and thrombosis. *Expert Rev Hematol*;3:81–91.
- [54] Guidetti GF, Canobbio I, Torti M (2015). PI3K/Akt in platelet integrin signaling and implications in thrombosis. *Adv Biol Regul*;59:36–52.
- [55] Pasquet JM, Bobe R, Gross B, Gratacap MP, Tomlinson MG, Payraastre B, Watson SP (1999). A collagen-related peptide regulates phospholipase Cgamma2 via phosphatidylinositol 3-kinase in human platelets. *Biochem J*;342:171–177.
- [56] Lancaster JR (1997). A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide*;1:18–30.
- [57] Li Z, Xi X, Gu M, Feil R, Ye RD, Eigenthaler M, Hofmann F, Du X (2003). A Stimulatory Role for cGMP-Dependent Protein Kinase in Platelet Activation. *Cell*;112:77–86.

- [58] Dangel O, Mergia E, Karlisch K, Groneberg D, Koesling D, Friebe A (2010). Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is the only nitric oxide receptor mediating platelet inhibition. *J Thromb Haemost*;8:1343–1352.
- [59] Li Z, Zhang G, Feil R, Han J, Du X (2006). Sequential activation of p38 and ERK pathways by cGMP-dependent protein kinase leading to activation of the platelet integrin  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3. *Blood*;107:965–972.
- [60] Kramer RM, Roberts EF, Um SL, Börsch-Haubold AG, Watson SP, Fisher MJ, Jakubowski JA (1996). p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *J Biol Chem*;271:27723–27729.
- [61] Tomaiuolo M, Brass LF, Stalker TJ (2017). Regulation of Platelet Activation and Coagulation and Its Role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis. *Interv Cardiol Clin*;6:1–12.
- [62] Olga A. Cabello, William P. Schilling (1993). Vectorial  $\text{Ca}^{2+}$  flux from the extracellular space to the endoplasmic reticulum via a restricted cytoplasmic compartment regulates inositol 1,4,5-trisphosphate-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$  release from internal stores in vascular endothelial cells. *Biochem. J.*:357–366.
- [63] Molina-Holgado F, Rubio-Araiz A, García-Ovejero D, Williams RJ, Moore JD, Arévalo-Martín A, Gómez-Torres O, Molina-Holgado E (2007). CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation. *Eur J Neurosci*;25:629–634.
- [64] Wasiuddin A. Khan, Rick Dobrowsky, Samia El Touny, Yusuf A. Hannun (1990). protein kinase c and platelet inhibition by d-erythro-sphingosine: comparison with n,n-dimethylsphingosine and commercial preparation. *biochemical and biophysical research communications*:683–691.
- [65] Kim S, Jin J, Kunapuli SP (2004). Akt activation in platelets depends on  $G_i$  signaling pathways. *J Biol Chem*;279:4186–4195.
- [66] Yacoub D, Théorêt J-F, Villeneuve L, Abou-Saleh H, Mourad W, Allen BG, Merhi Y (2006). Essential role of protein kinase C delta in platelet signaling,  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 activation, and thromboxane A2 release. *J Biol Chem*;281:30024–30035.
- [67] Sapey E, Greenwood H, Walton G, Mann E, Love A, Aaronson N, Insall RH, Stockley RA, Lord JM (2014). Phosphoinositide 3-kinase inhibition restores neutrophil accuracy in the elderly: toward targeted treatments for immunosenescence. *Blood*;123:239–248.

- [68] Zhang J, Zhang P, Wei Y, Piao H-L, Wang W, Maddika S, Wang M, Chen D, Sun Y, Hung M-C, Chen J, Ma L (2013). Deubiquitylation and stabilization of PTEN by USP13. *Nat Cell Biol*;15:1486–1494.
- [69] Shih C-H, Chiang T-B, Wang W-J (2014). A critical role for the regulation of Syk from agglutination to aggregation in human platelets. *biochemical and biophysical research communications*;443:580–585.
- [70] Wang X, Fu Y-F, Liu X, Feng G, Xiong D, Mu G-F, Chen F-P (2018). ROS Promote Ox-LDL-Induced Platelet Activation by Up-Regulating Autophagy Through the Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR Pathway. *Cell Physiol Biochem*;50:1779–1793.
- [71] Murugappan S, Tuluc F, Dorsam RT, Shankar H, Kunapuli SP (2004). Differential role of protein kinase C delta isoform in agonist-induced dense granule secretion in human platelets. *J Biol Chem*;279:2360–2367.
- [72] Uematsu K, Enomoto Y, Onuma T, Tsujimoto M, Doi T, Matsushima-Nishiwaki R, Tokuda H, Ogura S, Iida H, Kozawa O, Iwama T (2018). Rac Regulates the TRAP-Induced Release of Phosphorylated-HSP27 from Human Platelets via p38 MAP Kinase but Not JNK. *Cell Physiol Biochem*;49:1523–1538.
- [73] I. M. B. Francischetti C. R. Carlini J. A. Guimaraes. Human platelets activation by convulxin is accompanied by tyrosyl-phosphorylation of PLCgamma2 and occurs independently of integrin alphaIIbbeta3.
- [74] Sassoli C, Vallone L, Tani A, Chellini F, Nosi D, Zecchi-Orlandini S (2018). Combined use of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) and platelet rich plasma (PRP) stimulates proliferation and differentiation of myoblasts in vitro: new therapeutic perspectives for skeletal muscle repair/regeneration. *Cell Tissue Res*;372:549–570.
- [75] Haixia Niu, Xue Chen, Ralph A. Gruppo, Ding Li (2012). Integrin aIIb-Mediated PI3K/Akt Activation in Platelets. *PLOS*.
- [76] Cowburn AS, White JF, Deighton J, Walmsley SR, Chilvers ER (2005). z-VAD-fmk augmentation of TNF alpha-stimulated neutrophil apoptosis is compound specific and does not involve the generation of reactive oxygen species. *Blood*;105:2970–2972.
- [77] Goldston RJ, Rutherford PH (2003). Introduction to plasma physics. : 1. Bristol, Inst. of Physics Publ.
- [78] Metelmann H-R, Woedtke T von, Weltmann K-D, eds. (2016). *Plasmamedizin: Kaltplasma in der medizinischen Anwendung*. Berlin, Heidelberg, s.l., Springer Berlin Heidelberg.

- [79] Woedtke T von, Reuter S, Masur K, Weltmann K-D (2013). Plasmas for medicine. *Physics Reports*;530:291–320.
- [80] Helena Jablonowski, Joao Santos Sousa, Klaus-Dieter Weltmann, Kristian Wende, Stephan Reuter (2018). Quantification of the ozone and singlet delta oxygen produced in gas and liquid phases by a non-thermal atmospheric plasma with relevance for medical treatment. *Sci Rep*;8:1–12.
- [81] Wende K, Williams P, Dalluge J, van Gaens W, Aboubakr H, Bischof J, Woedtke T von, Goyal SM, Weltmann K-D, Bogaerts A, Masur K, Bruggeman PJ (2015). Identification of the biologically active liquid chemistry induced by a nonthermal atmospheric pressure plasma jet. *Biointerphases*;10:29518.
- [82] Schmidt-Bleker A, Bansemer R, Reuter S, Weltmann K-D (2016). How to produce an NO<sub>x</sub> - instead of O<sub>x</sub> -based chemistry with a cold atmospheric plasma jet. *Plasma Process. Polym*;13:1120–1127.
- [83] Bekeschus S, Schmidt A, Weltmann K-D, Woedtke T von (2016). The plasma jet kINPen – A powerful tool for wound healing. *Clinical Plasma Medicine*;4:19–28.
- [84] Kramer A, Bekeschus S, Matthes R, Bender C, Stope MB, Napp M, Lademann O, Lademann J, Weltmann K-D, Schauer F (2015). Cold Physical Plasmas in the Field of Hygiene-Relevance, Significance, and Future Applications. *Plasma Process. Polym*;12:1410–1422.
- [85] Bekeschus S, Brüggemeier J, Hackbarth C, Woedtke T von, Partecke L-I, van der Linde J (2017). Platelets are key in cold physical plasma-facilitated blood coagulation in mice. *Clinical Plasma Medicine*;7-8:58–65.
- [86] Metelmann H-R, Nedrelow DS, Seebauer C, Schuster M, Woedtke T von, Weltmann K-D, Kindler S, Metelmann PH, Finkelstein SE, Hoff DD von, Podmelle F (2015). Head and neck cancer treatment and physical plasma. *Clinical Plasma Medicine*;3:17–23.
- [87] Fridman G, Peddinghaus L, Vinovrski T, Jah A, Fridman A, Balasubramanian M, Gutsol A, Friedman G (2005). Use of Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Discharge for Coagulation and Sterilization of Surface Wounds. Edited by Institute of Electrical and Electronics Engineers, IEEE Nuclear and Plasma Sciences Society, IEEE International Conference on Plasma Science, ICOPS. Piscataway, NJ, IEEE Operations Center, p. 257.
- [88] Fridman G, Peddinghaus M, Balasubramanian M, Ayan H, Fridman A, Gutsol A, Brooks A (2006). Blood Coagulation and Living Tissue Sterilization by Floating-Electrode Dielectric Barrier Discharge in Air. *Plasma Chem Plasma Process*;26:425–442.

- [89] Kalghatgi SU, Fridman G, Cooper M, Nagaraj G, Peddinghaus M, Balasubramanian M, Vasilets VN, Gutsol AF, Fridman A, Friedman G (2007). Mechanism of Blood Coagulation by Nonthermal Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge Plasma. *IEEE Trans. Plasma Sci*;35:1559–1566.
- [90] Chen C-Y, Fan H-W, Kuo SP, Chang J, Pedersen T, Mills TJ, Huang C-C (2009). Blood Clotting by Low-Temperature Air Plasma. *IEEE Trans. Plasma Sci*;37:993–999.
- [91] Baik KY, Kim YH, Hur E-H (2012). Selective toxicity on canine blood cells by using atmospheric-pressure plasma jets. *Journal of the Korean Physical Society*;60:965–969.
- [92] Gremmel T, Fedrizzi S, Weigel G, Eichelberger B, Panzer S (2017). Underlying mechanism and specific prevention of hemolysis-induced platelet activation. *Platelets*;28:555–559.
- [93] Helms CC, Marvel M, Zhao W, Stahle M, Vest R, Kato GJ, Lee JS, Christ G, Gladwin MT, Hantgan RR, Kim-Shapiro DB (2013). Mechanisms of hemolysis-associated platelet activation. *J Thromb Haemost*;11:2148–2154.
- [94] Ikehara Y, Sakakita H, Shimizu N, Ikehara S, Nakanishi H (2013). Formation of Membrane-like Structures in Clotted Blood by Mild Plasma Treatment during Hemostasis. *J. Photopol. Sci. Technol*;26:555–557.
- [95] 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 Process. Polym*;12:1348–1353.
- [96] Miyamoto K, Ikehara S, Takei H, Akimoto Y, Sakakita H, Ishikawa K, Ueda M, Ikeda J, Yamagishi M, Kim J, Yamaguchi T, Nakanishi H, Shimizu T, Shimizu N, Hori M, Ikehara Y (2016). Red blood cell coagulation induced by low-temperature plasma treatment. *Arch Biochem Biophys*;605:95–101.
- [97] Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN, Fridman A (2008). Applied Plasma Medicine. *Plasma Process. Polym*;5:503–533.
- [98] Aleinik A, Baikov A, Dambaev G, Semichev E, Bushlanov P (2017). Liver Hemostasis by Using Cold Plasma. *Surg Innov*;24:253–258.
- [99] Aleinik A, Baikov A, Shevtsova N, Semichev E, Bushlanov P, Turgunova N (2018). Application of cold plasma for performing a typical resection of the spleen. *Biomed. Phys. Eng. Express*;4:55026.

- [100] Filis K, Galyfos G, Sigala F, Zografos G (2020). Utilization of low-temperature helium plasma (J-Plasma) for dissection and hemostasis during carotid endarterectomy. *J Vasc Surg Cases Innov Tech*;6:152–155.
- [101] Gentile RD (2018). Cool Atmospheric Plasma (J-Plasma) and New Options for Facial Contouring and Skin Rejuvenation of the Heavy Face and Neck. *Facial Plast Surg*;34:66–74.
- [102] Bekeschus S, Brüggemeier J, Hackbarth C, Weltmann K-D, Woedtke T von, Partecke L-I, van der Linde J (2018). The feed gas composition determines the degree of physical plasma-induced platelet activation for blood coagulation. *Plasma Sources Sci. Technol*;27:34001.
- [103] YAN K, JIN Q, ZHENG C, DENG G, YIN S, LIU Z (2018). Pulsed cold plasma-induced blood coagulation and its pilot application in stanching bleeding during rat hepatectomy. *Plasma Sci. Technol*;20:44005.
- [104] Dhurat R, Sukesh M (2014). Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *J Cutan Aesthet Surg*;7:189–197.
- [105] Reuter S, Woedtke T von, Weltmann K-D (2018). The kINPen—a review on physics and chemistry of the atmospheric pressure plasma jet and its applications. *J. Phys. D: Appl. Phys*;51:233001.
- [106] Tung JW, Heydari K, Tirouvanziam R, Sahaf B, Parks DR, Herzenberg LA, Herzenberg LA (2007). Modern flow cytometry: a practical approach. *Clin Lab Med*;27:453-68, v.
- [107] Verhoeven AJ, Verhaar R, Gouwerok EGW, Korte D de (2005). The mitochondrial membrane potential in human platelets: a sensitive parameter for platelet quality. *Transfusion*;45:82–89.
- [108] Reers M, Smiley ST, Mottola-Hartshorn C, Chen A, Lin M, Chen LB (1995). Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Meth Enzymol*;260:406–417.
- [109] Xiao B, Deng X, Zhou W, Tan E-K (2016). Flow Cytometry-Based Assessment of Mitophagy Using MitoTracker. *Front Cell Neurosci*;10:76.
- [110] Bekeschus S, Poschkamp B, van der Linde J (2020). Medical gas plasma promotes blood coagulation via platelet activation. *Biomaterials*:120433.
- [111] Poschkamp B, Bekeschus S. METHOD FOR CLASSIFICATION OF PLATELET AGGREGATION. EP20190204113 (2019;G01N15/14). <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/068296132/publication/EP3809115A1?q=EP3809115%20A1>.

- [112] Broder Poschkamp (2019). Bachelorarbeit: Convolutional Neural Networks für einen Image Cytometry-basierten Thrombozytenfunktionstest. Greifswald.
- [113] Giancoli DC (2010). Physik: Lehr- und Übungsbuch. 678. München, Boston, San Francisco, Harlow, England, Don Mills, Ontario, Sydney, Mexico City, Madrid, Amsterdam, Pearson Studium.
- [114] Ki SH, Sin S, Shin J-H, Kwon YW, Chae MW, Uhm HS, Baik KY, Choi EH (2018). Hemoglobin as a Diagnosing Molecule for Biological Effects of Atmospheric-Pressure Plasma. *Plasma Chem Plasma Process*;38:937–952.
- [115] Meng F, Alayash AI (2017). Determination of extinction coefficients of human hemoglobin in various redox states. *Anal Biochem*;521:11–19.
- [116] Thermo Fisher Scientific. Hemoglobin Colorimetric Detection Kit (2019). <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EIAHGBC>. Accessed 1 August 2019.
- [117] Lodemann P, Schorer G, Frey BM (2010). Wrong molar hemoglobin reference values—a longstanding error that should be corrected. *Ann Hematol*;89:209.
- [118] Cullen PJ, Milosavljevi V (2015). Spectroscopic characterization of a radio-frequency argon plasma jet discharge in ambient air. *Progress of Theoretical and Experimental Physics*;2015:63J01-0.
- [119] Du K, Farhood A, Jaeschke H (2017). Mitochondria-targeted antioxidant Mito-Tempo protects against acetaminophen hepatotoxicity. *Arch Toxicol*;91:761–773.
- [120] Trnka J, Blaikie FH, Smith RAJ, Murphy MP (2008). A mitochondria-targeted nitroxide is reduced to its hydroxylamine by ubiquinol in mitochondria. *Free Radic Biol Med*;44:1406–1419.
- [121] Christine C. Winterbourn (1985). Free-Radical Production and Oxidative Reactions of Hemoglobin. *Environmental Health Perspectives*:321–330.
- [122] Gressner AM, Arndt T (2013). *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 460. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- [123] Mendonça R, Silveira AAA, Conran N (2016). Red cell DAMPs and inflammation. *Inflamm Res*;65:665–678.
- [124] Laborlexikon. Blutbild, klein: Norm (2016). [http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Infotrame/b/Blutbild\\_klein.htm](http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Infotrame/b/Blutbild_klein.htm). Accessed 26 April 2020.
- [125] Saver JL (2006). Time is brain—quantified. *Stroke*;37:263–266.

- [126] Gladwin MT, Kato GJ (2008). Hemolysis-associated hypercoagulability in sickle cell disease: the plot (and blood) thickens! *Haematologica*;93:1–3.
- [127] Savi P, Herbert J-M (2005). Clopidogrel and ticlopidine: P2Y<sub>12</sub> adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis. *Semin Thromb Hemost*;31:174–183.
- [128] Yang L, Dan HC, Sun M, Liu Q, Sun X, Feldman RI, Hamilton AD, Polokoff M, Nicosia SV, Herlyn M, Sebti SM, Cheng JQ (2004). Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt. *Cancer Res*;64:4394–4399.
- [129] Aghanoori M-R, Smith DR, Shariati-Ievari S, Ajisebutu A, Nguyen A, Desmond F, Jesus CHA, Zhou X, Calcutt NA, Aliani M, Fernyhough P (2019). Insulin-like growth factor-1 activates AMPK to augment mitochondrial function and correct neuronal metabolism in sensory neurons in type 1 diabetes. *Mol Metab*;20:149–165.
- [130] Aslan JE, Tormoen GW, Loren CP, Pang J, McCarty OJT (2011). S6K1 and mTOR regulate Rac1-driven platelet activation and aggregation. *Blood*;118:3129–3136.
- [131] Babinska A, Markell MS, Salifu MO, Akoad M, Ehrlich YH, Kornecki E (1998). Enhancement of human platelet aggregation and secretion induced by rapamycin. *Nephrol Dial Transplant*;13:3153–3159.
- [132] Pan CJ, Tang JJ, Weng YJ, Wang J, Huang N (2007). Preparation and characterization of rapamycin-loaded PLGA coating stent. *J Mater Sci Mater Med*;18:2193–2198.
- [133] Banfi G, Salvagno GL, Lippi G (2007). The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clin Chem Lab Med*;45:565–576.
- [134] Lackmann J-W, Bruno G, Jablonowski H, Kogelheide F, Offerhaus B, Held J, Schulz-von der Gathen V, Stapelmann K, Woedtke T von, Wende K (2019). Nitrosylation vs. oxidation - How to modulate cold physical plasmas for biological applications. *PLoS ONE*;14:e0216606.
- [135] Gow AJ, Luchsinger BP, Pawloski JR, Singel DJ, Stamler JS (1999). The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*;96:9027–9032.
- [136] Christopher D. Reiter, Xunde Wang, Jose E. Tanus-Santos, Neil Hogg, Richard O. Cannon, Alan N. Schechter, Mark T. Gladwin (2002). Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med*;8:1383–1389.
- [137] Jiang Y, Lei C, Yasumoto A, Kobayashi H, Aisaka Y, Ito T, Guo B, Nitta N, Kutsuna N, Ozeki Y, Nakagawa A, Yatomi Y, Goda K (2017). Label-free detection of aggregated

- platelets in blood by machine-learning-aided optofluidic time-stretch microscopy. *Lab Chip*;17:2426–2434.
- [138] Satoh K, Yatomi Y, Kubota F, Ozaki Y (2002). Small aggregates of platelets can be detected sensitively by a flow cytometer equipped with an imaging device: mechanisms of epinephrine-induced aggregation and antiplatelet effects of beraprost. *Cytometry*;48:194–201.
- [139] Jandrot-Perrus M, Lagrue AH, Okuma M, Bon C (1997). Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involve glycoprotein VI and integrin  $\alpha 2\beta 1$ . *J Biol Chem*;272:27035–27041.
- [140] Born GVR (1962). Aggregation of Blood Platelets by Adenosine Diphosphate and its Reversal. *Nature*;194:927–929.
- [141] Stegner D, Nieswandt B (2011). Platelet receptor signaling in thrombus formation. *J Mol Med*;89:109–121.
- [142] Ruggeri ZM, Dent JA, Saldívar E (1999). Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. *Blood*;94:172–178.
- [143] Suh TT, Holmbäck K, Jensen NJ, Daugherty CC, Small K, Simon DI, Potter S, Degen JL (1995). Resolution of spontaneous bleeding events but failure of pregnancy in fibrinogen-deficient mice. *Genes Dev*;9:2020–2033.
- [144] Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI (2001). Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation*;104:1533–1537.
- [145] Michelson AD (1994). Platelet activation by thrombin can be directly measured in whole blood through the use of the peptide GPRP and flow cytometry: methods and clinical applications. *Blood Coagul Fibrinolysis*;5:121–131.
- [146] Schmidt-Bleker A, Winter J, Iseni S, Dünnbier M, Weltmann K-D, Reuter S (2014). Reactive species output of a plasma jet with a shielding gas device—combination of FTIR absorption spectroscopy and gas phase modelling. *J. Phys. D: Appl. Phys*;47:145201.
- [147] Aebi H (1990). *Catalase in vitro*. Edited by Packer L. San Diego, Calif., Academic Press, pp. 121–126.
- [148] Battin EE, Brumaghim JL (2009). Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochem Biophys*;55:1–23.

- [149] Ates B, Abraham L, Ercal N (2008). Antioxidant and free radical scavenging properties of N-acetylcysteine amide (NACA) and comparison with N-acetylcysteine (NAC). *Free Radic Res*;42:372–377.
- [150] Gao M, Hu A, Sun X, Wang C, Dong Z, Feng L, Liu Z (2017). Photosensitizer Decorated Red Blood Cells as an Ultrasensitive Light-Responsive Drug Delivery System. *ACS Appl Mater Interfaces*;9:5855–5863.
- [151] Sayuri M, Graziella E. Ronsein, Fernanda M. Prado, Miriam Uemi, Thais C. Corrêa, Izaura N. Toma, Agda Bertolucci, Mauricio C. B. Oliveira, Flávia D. Motta, Marisa H. G. Medeiros, Paolo Di Mascio (2007). Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation. *IUBMB Life*;59:322–331.
- [152] Bekeschus S, Schmidt A, Niessner F, Gerling T, Weltmann K-D, Wende K (2017). *Basic Research in Plasma Medicine - A Throughput Approach from Liquids to Cells. J Vis Exp.*
- [153] Salvemini D, Nucci G de, Sneddon JM, Vane JR (1989). Superoxide anions enhance platelet adhesion and aggregation. *Br J Pharmacol*;97:1145–1150.
- [154] Oduah EI, Linhardt RJ, Sharfstein ST (2016). Heparin: Past, Present, and Future. *Pharmaceuticals (Basel)*;9.
- [155] Joe M. McCord, Irwin Fridovich (1969). Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem*;244:6049–6055.
- [156] Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M (1995). The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Radic Biol Med*;19:935–941.
- [157] V. Bocci, G. Valacchi, R. Rossi, D. Giustarini, E. Paccagnini, A.M. Pucci (1999). Studies on the biological effects of ozone: 9. Effects of ozone on human platelets. *Platelets*:110–116.
- [158] Bocci V (2002). *Oxygen-Ozone Therapy*. 121–124. Dordrecht, Springer Netherlands.
- [159] Travagli V, Zanardi I, Bocci V (2006). A realistic evaluation of the action of ozone on whole human blood. *Int J Biol Macromol*;39:317–320.
- [160] Garcia-Souza LF, Oliveira MF (2014). Mitochondria: biological roles in platelet physiology and pathology. *Int J Biochem Cell Biol*;50:156–160.
- [161] Cardenes N, Corey C, Geary L, Jain S, Zharikov S, Barge S, Novelli EM, Shiva S (2014). Platelet bioenergetic screen in sickle cell patients reveals mitochondrial complex V inhibition, which contributes to platelet activation. *Blood*;123:2864–2872.
- [162] Grund KE, Storek D, Farin G (1994). Endoscopic argon plasma coagulation (APC) first clinical experiences in flexible endoscopy. *Endosc Surg Allied Technol*;2:42–46.

- [163] Johanns W, Luis W, Janssen J, Kahl S, Greiner L (1997). Argon plasma coagulation (APC) in gastroenterology: experimental and clinical experiences. *Eur J Gastroenterol Hepatol*;9:581–587.
- [164] Freund E, Liedtke KR, Gebbe R, Heidecke AK, Partecke L-I, Bekeschus S (2019). In Vitro Anticancer Efficacy of Six Different Clinically Approved Types of Liquids Exposed to Physical Plasma. *IEEE Trans. Radiat. Plasma Med. Sci*;3:588–596.
- [165] Jablonowski H, Bussiahn R, Hammer MU, Weltmann K-D, Woedtke T von, Reuter S (2015). Impact of plasma jet vacuum ultraviolet radiation on reactive oxygen species generation in bio-relevant liquids. *Physics of Plasmas*;22:122008.
- [166] Fenech M (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*;2:1084–1104.
- [167] Bekeschus S, Schmidt A, Kramer A, Metelmann H-R, Adler F, Woedtke T von, Niessner F, Weltmann K-D, Wende K (2018). High throughput image cytometry micronucleus assay to investigate the presence or absence of mutagenic effects of cold physical plasma. *Environ Mol Mutagen*;59:268–277.
- [168] Daeschlein G, Scholz S, Ahmed R, Majumdar A, Woedtke T von, Haase H, Niggemeier M, Kindel E, Brandenburg R, Weltmann KD, Jünger M (2012). Cold plasma is well-tolerated and does not disturb skin barrier or reduce skin moisture. *J Dtsch Dermatol Ges*;10:509–515.
- [169] Emmert S, Brehmer F, Hänßle H, Helmke A, Mertens N, Ahmed R, Simon D, Wandke D, Maus-Friedrichs W, Däschlein G, Schön MP, Viöl W (2013). Atmospheric pressure plasma in dermatology: Ulcus treatment and much more. *Clinical Plasma Medicine*;1:24–29.
- [170] Daeschlein G, Scholz S, Ahmed R, Woedtke T von, Haase H, Niggemeier M, Kindel E, Brandenburg R, Weltmann K-D, Juenger M (2012). Skin decontamination by low-temperature atmospheric pressure plasma jet and dielectric barrier discharge plasma. *J Hosp Infect*;81:177–183.
- [171] Stratmann B, Costea T-C, Nolte C, Hiller J, Schmidt J, Reindel J, Masur K, Motz W, Timm J, Kerner W, Tschoepe D (2020). Effect of Cold Atmospheric Plasma Therapy vs Standard Therapy Placebo on Wound Healing in Patients With Diabetic Foot Ulcers: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open*;3:e2010411.
- [172] Carus T, Rackebrandt K (2011). Collateral tissue damage by several types of coagulation (monopolar, bipolar, cold plasma and ultrasonic) in a minimally invasive, perfused liver model. *ISRN Surg*;2011:518924.

- [173] Siewert JR, Brauer RB (2010). *Basiswissen Chirurgie*. 33. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [174] Arndt S, Schmidt A, Karrer S, Woedtke T von (2018). Comparing two different plasma devices kINPen and Adtec SteriPlas regarding their molecular and cellular effects on wound healing. *Clinical Plasma Medicine*;9:24–33.
- [175] Dobrynin D, Wu A, Kalghatgi S, Park S, Shainsky N, Wasko K, Dumani E, Ownbey R, Joshi S, Sensenig R, Brooks AD (2011). Live Pig Skin Tissue and Wound Toxicity of Cold Plasma Treatment. *Plasma Med*;1:93–108.
- [176] Shimizu T, Steffes B, Pompl R, Jamitzky F, Bunk W, Ramrath K, Georgi M, Stolz W, Schmidt H-U, Urayama T, Fujii S, Morfill GE (2008). Characterization of Microwave Plasma Torch for Decontamination. *Plasma Process. Polym*;5:577–582.
- [177] Apyx Medical. J-Plasma - Apyx Medical (2021). <https://apyxmedical.com/jplasma/>. Accessed 10 November 2021.
- [178] Rencher J, Konesky G, Simeonov B. Electrosurgical apparatus with retractable blade (2011). <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/045002512/publication/EP2449992A1?q=EP%202910214%20A1%2020150826%20>. Accessed 10 November 2011.
- [179] Apyx Medical Corporation (2020). Renuvion®/J-Plasma® Handstück - Gebrauchsanweisung: Catalogue number: APYX-044-BPS, Product name: Renuvion/J-Plasma Precise Open 44mm, UDI: 00607151050030:50–60.
- [180] Apyx Medical. Product Indications - Apyx Medical (2020). <https://apyxmedical.com/product-indications/>. Accessed 10 November 2021.
- [181] Pedroso JD, Gutierrez MM, Volker KW, Howard DL (2017). Thermal Effect of J-Plasma® Energy in a Porcine Tissue Model: Implications for Minimally Invasive Surgery. *Surg Technol Int*;30:19–24.
- [182] Isbary G, Morfill G, Schmidt HU, Georgi M, Ramrath K, Heinlin J, Karrer S, Landthaler M, Shimizu T, Steffes B, Bunk W, Monetti R, Zimmermann JL, Pompl R, Stolz W (2010). A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. *Br J Dermatol*;163:78–82.
- [183] FAQ - neoplas tools (DE): Ist die Kaltplasmatherapie erstattungsfähig? (2020.000Z). <https://www.neoplas-tools.eu/de/faq.html>. Accessed 2 May 2020.
- [184] InEK GmbH. Aufstellung der Informationen nach § 6 Abs. 2 KHEntgG für 2021, InEK GmbH (2021). Accessed 10 April 2021.

- [185] Gemeinsamer Bundesausschuss (2023). Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Richtlinie zur Erprobung gemäß § 137e des Fünften Buches Sozialgesetzbuch: Kaltplasmabehandlung bei chronischen Wunden.
- [186] Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Häufigste Operationen in Krankenhäusern: Die 50 häufigsten Operationen der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern (Rang, Anzahl, Anteil in Prozent). Gliederungsmerkmale: Jahre, Deutschland, Geschlecht, Art der Operation (2020). [https://www.gbe-bund.de/gbe/pkg\\_olap\\_tables.prc\\_remove\\_sort\\_ind?p\\_uid=gast&p\\_aid=67886897&p\\_sprache=D&p\\_help=2&p\\_indnr=666&p\\_ansnr=74923507&p\\_version=5#LINKS](https://www.gbe-bund.de/gbe/pkg_olap_tables.prc_remove_sort_ind?p_uid=gast&p_aid=67886897&p_sprache=D&p_help=2&p_indnr=666&p_ansnr=74923507&p_version=5#LINKS). Accessed 20 November 2021.
- [187] Jung Y, Chung IK, Cho YS, Lee TH, Park S-H, Lee JS, Kim SJ (2015). Do We Perform a Perfect Endoscopic Hemostasis Prophylactically with Argon Plasma Coagulation in Colonic Endoscopic Mucosal Resection? *Dig Dis Sci*;60:3100–3107.
- [188] Manner H, Enderle MD, Pech O, May A, Plum N, Riemann JF, Ell C, Eickhoff A (2008). Second-generation argon plasma coagulation: two-center experience with 600 patients. *J Gastroenterol Hepatol*;23:872–878.
- [189] van Eck CF, van Meel TAC, van den Bekerom MPJ, Zijl JAC, Kooistra B (2021). Heat-Related Complications from Radiofrequency and Electrocautery Devices Used in Arthroscopic Surgery: A Systematic Review. *Arthrosc Sports Med Rehabil*;3:e605-e613.
- [190] (2009). reactive (reactivity). Edited by Nič M, Jirát J, Košata B, Jenkins A, McNaught A. Research Triagle Park, NC, IUPAC.
- [191] Halliwell B, Gutteridge JM (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 31. Oxford, OUP Oxford.
- [192] Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Löffler G (2014). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 21, 889. Berlin, Springer.
- [193] (2009). radical (free radical). Edited by Nič M, Jirát J, Košata B, Jenkins A, McNaught A. Research Triagle Park, NC, IUPAC.
- [194] Borden WT, Hoffmann R, Stuyver T, Chen B (2017). Dioxygen: What Makes This Triplet Diradical Kinetically Persistent? *J Am Chem Soc*;139:9010–9018.
- [195] Pryor WA (1994). Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. *Free Radical Biology and Medicine*;17:451–465.
- [196] Foote CS, Clennan EL (1996). *Properties and Reactions of Singlet Dioxygen*. Edited by Foote CS, Valentine JS, Greenberg A, Liebman JF. Dordrecht, Springer Netherlands, pp. 105–140.

[197] (2009). singlet state. Edited by Nič M, Jiráť J, Kořata B, Jenkins A, McNaught A.  
Research Triagle Park, NC, IUPAC.

[198] Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC (1998). Inside the neutrophil phagosome:  
oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*;92:3007–3017.

## **10. Erklärung an Eides statt**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades *Doktor der Medizin* mit dem Titel

***Die Wirkung physikalischen Plasmas  
auf die Hämostase und Physiologie des Thrombozyten  
in humanem Vollblut***

eigenständig und ausschließlich unter Zuhilfenahme entsprechend gekennzeichnete Hilfsmittel verfasst habe. Weiterhin wurden Textstellen, die inhaltlich auf Publikationen basieren, unter Nennung des Autors sowie Titels der Arbeit angegeben. Zudem erkläre ich, dass diese Arbeit noch nicht im Rahmen eines anderen Prüfungsverfahrens eingereicht wurde.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## **11. Danksagung**

Ich möchte mich bei Dr. rer. nat. Sander Bekeschus bedanken, der mir die Möglichkeit gab, ohne Hindernisse die wissenschaftliche Welt zu erkunden. Insbesondere seinen positiven Einfluss auf meine wissenschaftliche Arbeitsweise möchte ich würdigen und mich für viele Gespräche bedanken, die weit mehr als den Umfang dieser Dissertation betreffen. Darüber hinaus möchte ich mich beim Team des damaligen ZIK-Plasma-Redox-Effekte bedanken. Ich möchte insbesondere Eric Freund und Lea Miebach nennen, mit denen ich viele Nächte an Experimenten und deren Datenauswertung verbracht habe.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Stephan Kersting und bei Dr. med. Julia van der Linde bedanken, deren Fokus auf klinische Anwendung und Patientenzentriertheit mich bei Forschungsfragen deutlich geprägt hat. Prof. Dr. med. Stephan Kersting gebührt ein großer Dank zur Betreuung der Arbeit und zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses, trotz des hohen wirtschaftlichen Druckes und des hohen Patientenaufkommens der Klinik.

Weiterhin möchte ich dem Gerhard-Domagk-Nachwuchsförderungsprogramm danken, ohne dessen Unterstützung es mir nicht möglich gewesen wäre, frühzeitig Forschungserfahrung zu sammeln.

Meinen Eltern kommt der größte Dank zu. Ohne ihre Unterstützung wäre weder der Abschluss meines Medizinstudiums, meines Bachelor-Studiums oder meine Forschung neben den täglichen Arbeiten möglich gewesen.