

Aus dem Leibniz Institut für Plasmaforschung und Technologie (INP) Greifswald

(Direktor: Professor Dr. Klaus-Dieter Weltmann)

und dem Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Universitätsmedizin Greifswald

(Direktor: Prof. Dr. Axel Kramer)

Einfluss der Plasmabehandlung auf das transepidermale Penetrationsverhalten von Arzneistoffen

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

(Dr. med.)

der Universitätsmedizin

der Universität Greifswald

2021

vorgelegt von:

Paula Sophie Marx

geboren am 31.12.1995

in Weimar/Thüringen

Dekan: Prof. Dr. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas von Woedtke

2. Gutachter: Prof. Dr. Steffen Emmert

Tag der Disputation: 21.02.2024

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Stefan Engeli

Prof. Dr. Thomas von Woedtke

Prof. Dr. Gabriele Jedlitschky

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Motivation.....	1
1.2	Grundlagen.....	1
1.2.1	Der Aufbau der menschlichen Haut.....	1
1.2.1.1	Das <i>Stratum corneum</i> und seine Lipide.....	2
1.2.1.2	Die transdermale Penetration und Applikation von Arzneistoffen.....	4
1.2.2	Kaltes Atmosphärendruckplasma (CAP).....	6
1.2.2.1	Anwendungsmöglichkeiten von CAP in der Medizin.....	7
1.2.2.2	Plasma-Haut-Interaktion.....	8
1.2.2.3	Plasma-Lipid-Interaktion.....	9
1.2.2.3.1	Plasma und Modelllipide.....	10
1.2.2.3.2	Plasma und Hautlipide.....	10
1.2.3	Das Hautmodell Schweineohr.....	11
1.3	Zielstellung und Arbeitsaufgaben.....	13
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Material.....	14
2.1.1	Chemikalien.....	14
2.1.2	Gebrauchsfertige Kits.....	15
2.1.3	Zellkulturmedium.....	15
2.1.4	Verbrauchsmaterial.....	15
2.1.5	Tiermaterial.....	16
2.1.6	Laborgeräte.....	17
2.1.7	Software.....	17
2.2	Methoden.....	18
2.2.1	Vorbereitung der Schweineohren.....	18
2.2.2	Aufbau des kINPen 09.....	19
2.2.3	Plasmabehandlung mit dem kINPen 09.....	20
2.2.4	Histologische Methoden und Mikroskopie.....	22
2.2.4.1	Morphologische Untersuchung mittels Hellfeld-Mikroskopie.....	22
2.2.4.1.1	HE-Färbung.....	22
2.2.4.1.2	Sudanschwarz B – Färbung.....	23
2.2.4.1.3	Durchführung Hellfeldmikroskopie.....	24
2.2.4.2	Penetrationsuntersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	25
2.2.4.2.1	Curcumin-Penetrationsexperiment.....	25
2.2.4.2.2	DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)-Färbung.....	26
2.2.4.2.3	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM).....	27
2.2.4.2.4	Fluoreszenzintensitäts-Messung und Auswertung der Bilder.....	28

2.2.4.3	Untersuchung der Gewebeviabilität	29
2.2.4.3.1	Inkubation im Medium	29
2.2.4.3.2	Immunhistochemie: TUNEL-Färbung	30
2.2.4.3.3	Auswanderung von Zellen.....	32
2.2.5	Biochemische Methoden.....	33
2.2.5.1	Die <i>Tape stripping</i> -Methode.....	33
2.2.5.2	Lipidextraktion	34
2.2.5.3	Ibuprofen-Penetrationsexperiment	35
2.2.5.4	Analytische Methoden	36
2.2.5.4.1	MS- und HLPC-Messung der Ibuprofen-Proben	36
2.2.5.4.2	MS- und UHLPC-Messung der Lipid-Proben.....	37
2.2.6	Statistische Auswertung	39
3	Ergebnisse	40
3.1	CAP-Effekte auf den morphologischen Aufbau des <i>Stratum corneum</i>	40
3.1.1	HE-Färbung.....	40
3.1.2	Sudanschwarz B-Färbung	41
3.1.3	Gasflusskontrolle	42
3.1.4	Einfluss der Rasur	43
3.2	Einfluss der Plasmabehandlungsdauer auf die Apoptoserate epidermaler Zellen	44
3.3	Viabilität ausgewanderter Zellen	47
3.4	Curcumin-Penetration	48
3.5	Ibuprofen-Penetration	53
3.6	Lipidomics-Ergebnisse.....	56
4	Diskussion.....	62
4.1	Morphologische Veränderungen des <i>Stratum corneum</i> nach Plasmabehandlung.....	62
4.2	Auswirkung der Plasmabehandlung auf die Apoptoserate epidermaler Zellen	65
4.3	Einfluss der Plasmabehandlung auf die Penetration von Substanzen durch das <i>Stratum corneum</i>	66
4.4	Einfluss der Plasmabehandlung auf das Lipidom des <i>Stratum corneum</i>	71
4.4.1	Ceramide	72
4.4.2	Triacylglycerole	75
4.5	Vor- und Nachteile des <i>in vitro</i> Hautmodells Schweineohr	76
5	Zusammenfassung und Ausblick	79
6	Abbildungsverzeichnis.....	82
7	Tabellenverzeichnis.....	83
8	Abkürzungsverzeichnis	83
9	Literatur.....	83

1 Einleitung

1.1 Motivation

Das medizinische Forschungsfeld der Plasmamedizin hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Große Fortschritte erzielt wurden besonders im Bereich der Dermatologie bei der Heilung chronischer Wunden sowie in der Krebsforschung. Plasmageräte wie der kINPen Med (neoplas med GmbH Greifswald) werden bereits erfolgreich im klinischen Alltag eingesetzt.

Kaltes Atmosphärendruckplasma scheint auch bei der Anwendung auf intakter und gesunder Haut einen Effekt zu erzielen. Speziell wurde in ersten Studien eine penetrationssteigernde Wirkung untersucht, wobei in den bisher veröffentlichten Arbeiten verschiedene, teils divergierende Ergebnisse beobachtet wurden. Sollte sich der penetrationssteigernde Effekt von kaltem Atmosphärendruckplasma bestätigen, könnte dies neue Anwendungsmöglichkeiten in der medizinischen Praxis schaffen und die Bedeutung der Plasmamedizin im klinischen Alltag stärken. Die Rolle der transdermalen Applikation von Medikamenten könnte durch eine vorherige Plasmabehandlung eine wichtigere Bedeutung erlangen und dadurch andere risikobehaftetere Applikationswege ersetzen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll daher der Einfluss der Plasmabehandlung auf das transepidermale Penetrationsverhalten von Arzneistoffen mit Fokus auf das *Stratum corneum* untersucht werden.

1.2 Grundlagen

1.2.1 Der Aufbau der menschlichen Haut

Die Haut als größtes Organ des Menschen erfüllt zahlreiche Funktionen. Sie schützt den Organismus vor schädigenden äußeren Einflussfaktoren wie Hitze, Kälte, Strahlung, mechanischer Schädigung, chemischen Noxen und dem Eintritt von Krankheitserregern. Gleichzeitig erlaubt die Haut auch einen beidseitig gerichteten Austausch von Stoffen, zum Beispiel die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten oder die transkutane Applikation von Wirkstoffen.

Die menschliche Haut ist aus den drei Schichten Subcutis, Dermis und Epidermis aufgebaut.

Die Epidermis als äußerer Bestandteil der Haut besteht selbst aus vier verschiedenen Zonen: dem innen liegenden *Stratum basale*, dem *Stratum spinosum*, dem *Stratum granulosum* und dem außenliegenden und in dieser Arbeit näher untersuchten *Stratum corneum* (siehe Abbildung 1). Im Bereich der Leistenhaut (an den Handflächen und Fußsohlen) gibt es zudem zwischen *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* ein *Stratum lucidum*. Die am häufigsten vorkommenden Zellen

der Epidermis sind die Keratinozyten. Diese werden im *Stratum basale* durch Mitose gebildet und wandern anschließend in Richtung des *Stratum corneum*. Während des Cornificationsprozesses (Verhornungsprozesses) differenzieren sie sich auf ihrem Weg über Wachstum und anschließenden Verlust der Zellorganellen und schließlich auch des Zellkerns zu Korneozyten. Diese abgestorbenen Zellen bestehen hauptsächlich aus ihren protein- und lipidreichen Zellmembranen und sind umgeben von einer hauptsächlich aus Lipiden bestehenden extrazellulären Matrix. Durch mechanische Beanspruchung werden sie mit der Zeit abgetragen, neue Zellen können von basal ausgehend ihren Platz einnehmen und das *Stratum corneum* erneuert sich. Dieser Differenzierungsprozess (von der Neubildung der Keratinozyten im *Stratum basale* bis zur Abschilferung der Korneozyten im *Stratum corneum*) läuft bei menschlicher Haut im Durchschnitt in einem Zeitraum von vier Wochen ab [1].

An die Epidermis als äußerste Hautschicht schließt sich die Dermis an, welche vorwiegend aus lockerem kollagenem Bindegewebe besteht und in welcher sich unter anderem Hautanhangsgebilde wie Talg- und Schweißdrüsen und Haarfollikel sowie Nervenbahnen und Blut- und Lymphgefäße befinden.

Die unter der Dermis liegende Subcutis als innere und dickste Schicht der Haut besteht vorwiegend aus Fett und Bindegewebe und verhindert als isolierende Schicht einen Verlust der Körperwärme an die Umgebung [1].

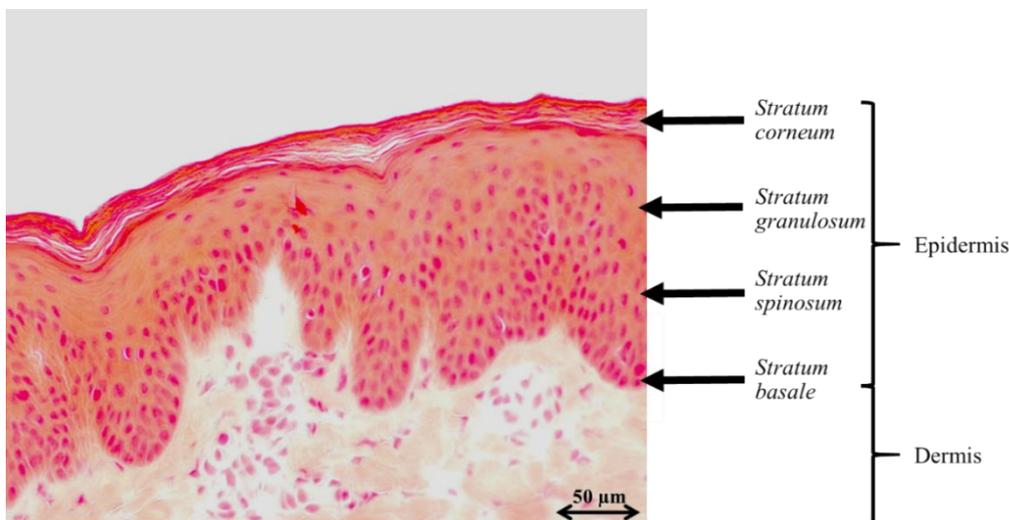


Abbildung 1: Aufbau der Haut (Cutis der Schweineohrhaut, ähnlich der humanen Haut, HE-Färbung)

1.2.1.1 Das *Stratum corneum* und seine Lipide

Das *Stratum corneum* als äußerster Bestandteil der Epidermis und damit der gesamten Hautbarriere interagiert direkt mit der Umgebung und ist allen Umweltfaktoren unmittelbar ausgesetzt. Beim Menschen beträgt seine Dicke (abhängig vom Ort und der mechanischen Beanspruchung der

jeweiligen Region) 16 µm bis 38 µm [2].

Die Struktur des *Stratum corneum* wird häufig mit dem „bricks in mortar“- (Ziegelstein in Mörtel)-Modell verglichen. Wie in Abbildung 2 gezeigt, stellen 10 bis 15 Reihen von parallel zur Hautoberfläche zueinander versetzt angeordneten Kerneozyten hierbei die „Ziegelsteine“ dar, welche von der extrazellulären Matrix, dem „Mörtel“, umgeben werden [3].

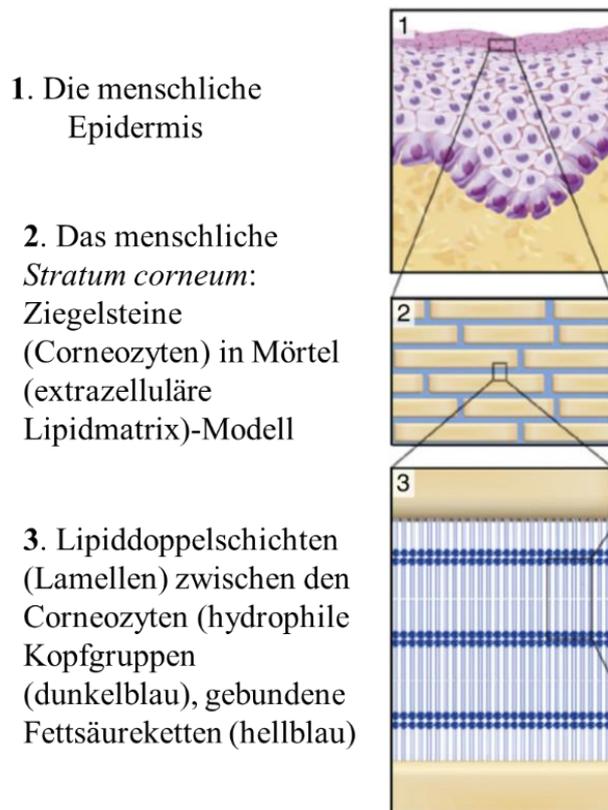


Abbildung 2: Das menschliche *Stratum corneum* (Abbildung modifiziert nach van Smeden et al. [3])

Diese extrazelluläre Matrix setzt sich vornehmlich aus Lipiden unterschiedlichen Ursprungs, den epidermalen Lipiden und den Talgdrüsenlipiden, zusammen. Bei den Experimenten in dieser Arbeit ist besonders die biochemische Zusammensetzung des *Stratum corneum* und die Modifikation von Biomolekülen im *Stratum corneum* durch Plasmabehandlung von Bedeutung.

Die epidermalen Lipide sind im gesamten *Stratum corneum* verteilt und bestehen aus Ceramiden (50 %), freien Fettsäuren (25 %) und Cholesterol (25 %). Ihre Vorläuferlipide sind Glucosylceramide, Sphingomyelin und Phospholipide, welche im *Stratum granulosum* in den *lamellar bodies* (Lamellenkörperchen) gebildet und anschließend via Exocytose an das *Stratum corneum* abgegeben werden. Gemeinsam mit den exozytotischen Vesikeln werden aus den Keratinozyten des *Stratum granulosums* hydrolytische Enzyme freigesetzt, welche die Vorläuferlipide in ihre endgültigen Formen spalten [3].

Bei den Talgdrüsenlipiden handelt es sich vornehmlich um Triacylglyceride (45 %) sowie Wachsester

(25 %), Squalen (12 %), freie Fettsäuren (10 %), Cholesterol und Cholesterolester (4 %) und Diacylglyceride (2 %). Sie werden in den Talgdrüsen der Dermis gebildet und dann über ein Gangsystem an die Oberfläche abgegeben, wo sie als dünner Talgfilm das *Stratum corneum* bedecken und die epidermalen Lipide umgeben [4].

Trotz der unterschiedlichen Lokalisation, Abstammung und Zusammensetzung der zwei Lipidgruppen tragen sie gemeinsam in Form einer Lipidbarriere zum Schutz des Organismus vor schädigenden Umwelteinflüssen bei.

1.2.1.2 Die transdermale Penetration und Applikation von Arzneistoffen

Durch die menschliche Haut gibt es verschiedene Penetrationswege: Substanzen können direkt durch das *Stratum corneum* in tiefere Hautschichten diffundieren oder transglandulär (durch die Hautanhangsdrüsen) in tiefere Hautschichten gelangen. Da nur 0,1 % bis 1 % der Hautoberfläche von Hautanhangsdrüsen bedeckt ist, spielt der transglanduläre Transport für die Penetration von Substanzen eine eher untergeordnete Rolle. Innerhalb des *Stratum corneum* verläuft die Penetration der Substanzen entweder interzellulär (nur im Bereich der Lipidmatrix, zwischen den Korneozyten) oder transzellulär (sowohl durch die Lipidmatrix als auch durch die Korneozyten hindurch) (siehe Abbildung 3). Der direkte transzelluläre Penetrationsweg findet jedoch sehr selten statt, da Substanzen hier abwechselnd durch lipo- und hydrophile *Stratum corneum*-Strukturen penetrieren müssen [5]. Am wichtigsten ist der interzelluläre Transport durch das *Stratum corneum*. Auf dieser Penetrationsroute penetrieren leicht lipophile Substanzen wie Glucokortikoide am besten, da sie im Gegensatz zu hydrophilen Stoffen gut durch die Lipidbarriere diffundieren können und im Gegensatz zu stark lipophilen Substanzen nicht im *Stratum corneum* akkumulieren [6].

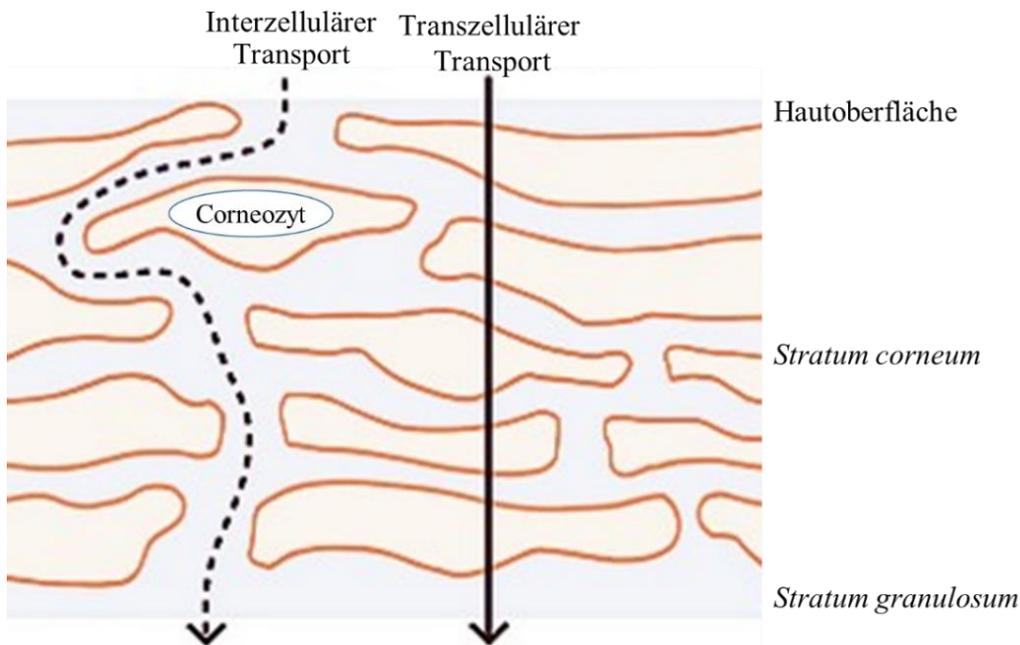


Abbildung 3: Interzelluläre und transzelluläre Penetration durch das Stratum corneum (Abbildung verändert nach Neubert et al. [6])

In der Dermatologie und auch in anderen medizinischen Bereichen hat die transdermale Applikation von Wirkstoffen einen hohen Stellenwert (zum Beispiel bei der transdermalen Opioidtherapie bei Schmerzpatienten oder bei der postmenopausalen Hormontherapie durch Hormonpflaster in der Gynäkologie). Transdermal applizierte Arzneimittel entfalten ihre Wirkung im Vergleich zu oral eingenommenen Arzneimitteln wesentlich langsamer, weshalb sie sich eher für eine Langzeittherapie als für eine Akuttherapie eignen. Ein unnatürlich hoher punktueller Anstieg der Arzneistoffkonzentration im Blut wie nach oraler Gabe wird durch die langsame Penetration und die damit verbundene Depotfunktion der Haut verhindert, jedoch können nach 24 h Penetrationszeit gleiche Serumkonzentrationen wie bei oral eingenommenen Medikamenten erreicht werden (abhängig von den Stoffeigenschaften (lipophil/ hydrophil) [7]). Während oral verabreichte Arzneistoffe während ihrer Resorption zu Nebenwirkungen im Magen-Darm-Trakt führen können und sich nicht zur Einnahme für bewusstlose oder sich erbrechende Patienten eignen, stellt die transdermale Therapie eine kostengünstige, leicht anwendbare, nicht-invasive Ausweichmöglichkeit dar. Für Patienten mit Resorptionsstörungen im Magen-Darm-Trakt oder einem hohen First-Pass-Effekt des Medikamentes in der Leber eignet sich die transdermale Medikamentenapplikation ebenfalls [8].

Auf Grund der effektiven Barrierefunktion der Haut ist die Bioverfügbarkeit der transdermal applizierten Substanzen jedoch relativ niedrig und nur ein geringer Prozentsatz der Arzneistoffe erreicht tiefere Gewebeschichten. Das *Stratum corneum* ist ein wichtiger Bestandteil dieser Hautbarriere und seine Beschaffenheit beeinflusst die Penetration von Substanzen maßgeblich. In den letzten Jahren wurden viele verschiedene physikalische Methoden (Mikronadeln, Elektrophorese,

Sonophorese, ...) und chemische Methoden (Nanocarrier, ...) entwickelt, um die Penetration von Substanzen durch die Haut zu verbessern [8].

Mikronadeln werden beispielsweise vor der Arzneimittelapplikation auf die Haut gedrückt und zerstören das *Stratum corneum* mechanisch. Durch ihre kurze Länge erreichen sie die Nozizeptoren in der Dermis nicht, wodurch die Behandlung nicht schmerzhaft ist. Jedoch hinterlassen sie verhältnismäßig große Löcher im *Stratum corneum* (abhängig von Hersteller und Produkt 10 µm bis 25 µm Nadelspitzendurchmesser [8],[9]) was ein Eindringen von Bakterien zur Folge haben kann. Elektroporation beschreibt ein Verfahren, bei welchem ein Hautbereich für einige Millisekunden mit kurzen elektrischen Impulsen (Gleichstrom, > 100 V) behandelt wird, um über die Bildung von wasserhaltigen Poren die Penetration von Substanzen durch das lipophile *Stratum corneum* zu ermöglichen. Sonophorese oder Phonophorese beschreibt eine Technik, bei welcher mittels Ultraschallwellen (Frequenz über 20 kHz) die Fluidität von Hautlipiden gesteigert wird, wodurch sich im *Stratum corneum* ebenfalls Poren bilden, durch welche im Nachhinein applizierte Substanzen leichter penetrieren können. Nanocarrier stellen eine chemische Methode zur Penetrationsbeschleunigung von Stoffen durch die Haut dar. Sie transportieren Stoffe in ihrem Inneren und verändern durch die Interaktion mit interzellulären Lipiden ebenfalls die Barriereigenschaften der Haut [8],[10].

Einige dieser Methoden (besonders die Mikronadel-Methode) können jedoch zu verschiedenen Nebenwirkungen wie Dehydration, einer gesteigerten Infektionsgefahr durch Bakterien und Pilze, Schwellungen, Verbrennungen und Einblutungen, sowie Narbenbildung der Haut führen [8],[9] weshalb die Suche nach einer sicheren Methode zur Beschleunigung der transdermalen Penetration von Arzneistoffen immer noch eine wichtige Bedeutung in der medizinischen Forschung hat.

1.2.2 Kaltes Atmosphärendruckplasma (CAP)

Ein sehr vielversprechender Ansatz zur Beeinflussung der Hautbarriere ist die Verwendung von physikalischem Plasma.

Physikalisches Plasma, auch als der vierte Aggregatzustand bekannt, ist ein ionisiertes, elektrisch leitfähiges, sich in einem hoch angeregten Zustand befindliches Gas. Dieser Zustand kann durch Energiezufuhr mit Hilfe eines elektrischen Feldes oder in Form von Wärme zu einem Gas erreicht werden (siehe Abbildung 4). Plasma enthält ionisierte Atome und Moleküle, freie Elektronen sowie radikale und nichtradikale niedermolekulare reaktive Spezies und sendet verschiedene Strahlungsarten (in Form von sichtbarem Licht, UV-Strahlung und elektromagnetischer Strahlung) aus [11].

In der Natur kommen physikalische Plasmen in Form von Blitzen und Nordlichtern und im Kosmos als Sonne oder Sterne vor [12],[13]. In der Technik kommen Plasmen zum Beispiel in der Beleuchtungstechnik, in der Halbleiterindustrie, bei der Veredelung und Härtung von Oberflächen und bei der Oberflächendesinfektion zum Einsatz [11]. In seinem hoch energetischen Zustand interagiert Plasma leicht mit seiner Umgebung und wird gleichzeitig selbst von ihr beeinflusst. Plasmen können auf Grundlage ihrer Temperatur, ihres Ionisierungsgrades und ihres Druckes klassifiziert werden. Abhängig von ihrer Temperatur werden Plasmen in thermische und nicht-thermische Plasmen eingeteilt. Thermische Plasmen weisen eine hohe Partikeldichte auf und alle Plasmakomponenten befinden sich in einem thermischen Gleichgewicht [14]. Nicht-thermische Plasmen, welche wiederum in kalte und heiße nicht-thermische Plasmen unterteilt werden können, befinden sich im thermischen Ungleichgewicht, da Ionen, Atome, Moleküle und Radikale eine niedrigere Temperatur als die Elektronen besitzen [15]. Kalte nicht-thermische Atmosphärendruck-Plasmen (cold atmospheric plasma – CAP) finden unter anderem in der Medizin Verwendung, da diese bei Normaldruck in atmosphärischer Umgebung angewendet werden können und auf Grund ihrer niedrigen Temperatur (bis zu 40 °C) hitzeempfindliche biologische Oberflächen nicht schädigen [11],[16].

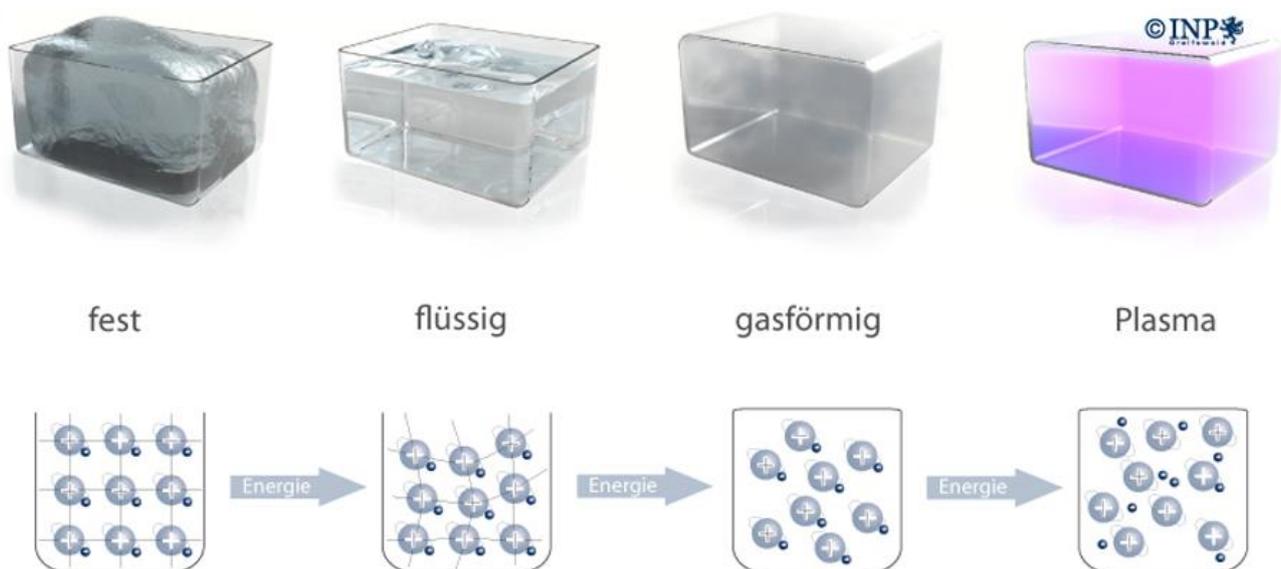


Abbildung 4: Die Struktur und molekulare Formation der vier Aggregatzustände fest, flüssig, gasförmig und Plasma (Abbildung INP Greifswald e.V.)

1.2.2.1 Anwendungsmöglichkeiten von CAP in der Medizin

Die zwei in der Biomedizin am häufigsten angewendeten Verfahren zur Erzeugung von CAP sind die dielektrisch behinderte Barriereentladung (DBD = Dielectric Barrier Discharge) und die Atmosphärendruck-Plasma-Jets (APPJ = atmospheric pressure plasma jet). DBD-Plasmen werden

entweder über die dielektrisch behinderte Volumentladung (Volumen-DBD) oder über die dielektrisch behinderte Oberflächenentladung (Oberflächen-DBD) erzeugt, wobei mindestens eine der zwei für die Plasmagenerierung verwendeten Elektroden dielektrisch isoliert sein muss. Bei dem für die Erzeugung von DBD-Plasmen genutzten Arbeitsgas handelt es sich meist um Umgebungsluft. Im Gegensatz dazu erzeugen Plasmajets, wie zum Beispiel der am Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP) entwickelte kINPen, kaltes Atmosphärendruckplasma innerhalb einer gasdurchströmten Kapillare. Dieses Gas (meist Edelgas (Helium, Argon) oder Luftbestandteile (Sauerstoff, Stickstoff)) wird innerhalb der Kapillare zwischen zwei Elektroden angeregt beziehungsweise ionisiert und das so entstehende Plasma (auch als Effluent bezeichnet) wird über den Gasstrom in Richtung des zu behandelnden Objekts ausgetragen [17].

Im medizinischen Bereich wurden in den letzten Jahren mehrere vielversprechende Anwendungsfelder für CAP identifiziert. So weist CAP antimikrobielle Eigenschaften auf [18] und besitzt auf verschiedene humane Zellen dosis- und zeitabhängig proliferationsfördernde bis hin zu Apoptose einleitende Eigenschaften [11],[17],[19]. Diese Eigenschaften werden zum Beispiel im Rahmen der Krebsforschung genutzt. Unter anderem konnten *in vitro* und *in ovo* erhöhte Apoptoseraten in Krebszellen [20] und in klinischen Studien eine leichte Rückbildung von Kopf-Hals-Tumoren nach Plasmabehandlung beobachtet werden [21]. Der Effekt von CAP auf die Blutkoagulation wird derzeit untersucht und gerinnungsfördernde Plasmaeigenschaften konnten nachgewiesen werden [22].

Eines der in den letzten Jahren am intensivsten erforschten Felder ist die Anwendung von CAP in der Dermatologie. Im Rahmen der Heilung chronischer Wunden konnten signifikant verkürzte Wundheilungszeiten sowohl in Tierstudien [23], als auch in klinischen Studien nachgewiesen werden [24],[25],[26].

1.2.2.2 Plasma-Haut-Interaktion

Die Effekte von Plasma auf die gesunde Haut wurden bisher nur teilweise erforscht.

Heinlin *et al.* konnten mittels Hellfeldmikroskopie keine Veränderung der Haut *ex vivo* vor und nach Plasmabehandlung feststellen [27]. Daeschlein *et al.* untersuchten drei unterschiedliche Plasmaquellen (gepulste und nicht gepulste APPJs und DBD) und konnten mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie ebenfalls keine Schädigung der Hautbarriere nach Plasmabehandlung diagnostizieren [28].

Van der Linde *et al.* untersuchten das Hautsensibilisierungspotential von CAP (kINPen Med) auf murine Haut *in vivo* mit Hilfe des lokalen Lymphknotentests (*lokal lymph node assay*) und konnten weder histologisch eine Schädigung der Haut, noch Lymphknotenproliferation im Rahmen eines

pathogenen Geschehens beobachten [29].

Im Gegensatz dazu untersuchten Fluhr *et al.* die Wirkung von Plasma (kINPen) auf verschiedene Hautparameter *in vivo* und stellten nach Plasmabehandlung eine leichte Temperaturerhöhung der Hautoberfläche, eine gesenkte Carotenoid-Konzentration in den obersten Schichten des *Stratum corneum* mittels Ramanspektroskopie, eine leichte Dehydration des *Stratum corneum* mit Hilfe eines Corneometers, sowie eine leicht eingeschränkte Barrierefunktion der Haut mit Hilfe eines Tewameters fest [30].

Lademann *et al.* konnten nach Plasmabehandlung von Hautproben *ex vivo* mit dem kINPen mittels Laser-Scanning-Mikroskopie ebenfalls eine eingeschränkte Barrierefunktion der Haut und eine daraus resultierende gesteigerte Penetration von Substanzen durch die Haut feststellen, sie allerdings nicht quantifizieren [9],[31].

Choi *et al.* untersuchten Keratinozytenzelllinien und murine Hautproben nach Plasmabehandlung mit besonderem Fokus auf lebendigen Hautschichten wie dem *Stratum granulosum*. Dabei stellten sie eine verringerte Expression von speziellen Proteinen (E-Cadherinen) fest, welche eine wichtige Rolle für den interzellulären Zusammenhalt und damit für die Barrierefunktion der Haut spielen [32].

Eine Veränderung der Barrierefunktion der Haut nach Plasmabehandlung wurde auch von Gelker *et al.* [33],[34] Shimizu *et al.* [35] und Kristof *et al.* [36] festgestellt. Sie verwendeten in ihren Experimenten hauptsächlich DBD-Plasmaquellen und analysierten die Penetration durch die Haut *ex vivo* mit Hilfe von Frans-Diffusionszellen. Die Resultate der verschiedenen Arbeitsgruppen variieren sehr stark hinsichtlich des Betrages der Penetrationssteigerung nach Plasmabehandlung.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die bisher durchgeführten Experimente zur Interaktion von Plasma mit gesunder Haut zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. Auch die molekularen Mechanismen der plasmavermittelten Effekte auf die Haut wurden noch nicht vollständig aufgedeckt.

1.2.2.3 Plasma-Lipid-Interaktion

Plasma enthält hoch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) wie Ozon, Singulett-Sauerstoff, Hydrogenperoxid, Hydroxylradikale, Stickoxide und Superoxide [11],[19],[37]. Diese reaktiven Spezies spielen eine Schlüsselrolle in der Plasmamedizin und vermitteln über ihre Interaktion mit verschiedenen Substanzen, Geweben und Organismen unterschiedliche Plasmawirkungen, zum Beispiel antibakterielle Eigenschaften oder die Geweberegeneration im Rahmen der Wundheilung, sowie Apoptose fördernde Eigenschaften bei Krebszellen [19],[38],[39]. RONS beeinflussen über die Oxidation von Aminosäuren, Proteinen und Lipiden verschiedene zelluläre Reaktionen und Signalwege lebender Organismen und haben beispielsweise einen Effekt auf den mitochondrialen Stoffwechsel und das Transkriptom sowie die Barriereeigenschaften

verschiedener Zellen und Gewebe [40],[41],[42],[43]. Im Gegensatz zu der bereits gut untersuchten Wirkung von RONS auf Aminosäuren und Proteine [44],[45],[46] wurde die Wirkung von Plasma auf Lipide bisher weniger intensiv erforscht.

1.2.2.3.1 Plasma und Modelllipide

Die meisten bisher durchgeführten Experimente beziehen sich hierbei auf einzelne Lipide in Modellsystemen.

So untersuchten Suda *et al.* mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie die laterale Mobilität des Modelllipids DOPC (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) in Form einer Lipiddoppelschicht und stellten nach Plasmabehandlung einen gesenkten Mobilitätskoeffizienten (eine verminderte laterale Diffusion) fest [47]. Den zugehörigen Mechanismus vermuteten sie in einer Peroxidierung oder Hydroxylierung des Modelllipids an einer Acyl-Seitenkette, untersuchten diesen jedoch nicht weiter.

Das gleiche Molekül wurde in Form von kleinen unilamellaren Vesikeln (small unilamellar vesicles - SUVs) von Maheux *et al.* mittels Massenspektrometrie untersucht. Hierbei konnten in Abhängigkeit von der Wahl des Arbeitsgases unterschiedlich starke chemische Modifikationen am Phospholipid nachgewiesen werden, welche auf Oxidationen an ungesättigten Kohlenstoffdoppelbindungen der gebundenen Fettsäureketten zurückgeführt wurden [48].

Yusupow *et al.* untersuchten die Wirkung von Plasma auf zwei verschiedene Phospholipiddoppelschichten (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) und 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)) mittels Molekulardynamik-Simulation (MD) und Massenspektrometrie (MS). Die Plasmabehandlung führte hier erst zu einer Oxidation der Kopfgruppen des Phospholipids (detektiert mittels MD) und anschließend zu einer Oxidation der gebundenen Fettsäureketten (detektiert mittels MS) [49].

In den drei genannten Publikationen wurden Modelllipide in Modellsystemen untersucht, welche Aufschluss über die grundlegende Wirkung von Plasma auf einzelne Lipidklassen geben, die Wirkung von Plasma auf größere biologische Systeme wie die Haut allerdings nicht vorhersagen können.

1.2.2.3.2 Plasma und Hautlipide

Umfassendere Untersuchungen in diesem Bereich führten Marschewski *et al.* [50] und Striesow *et al.* [51] durch, welche die Wirkung von Plasma auf Lipide der menschlichen Hautbarriere untersuchten.

Marschewski *et al.* entnahmen menschliche Hautlipide mit Hilfe einer Cyanoacrylat-Leim-Technik und behandelten die Lipide anschließend mit Plasma. Mittels Elektronenspektroskopie konnten sie

signifikante Veränderungen der Stöchiometrie der Hautlipide nach Plasmabehandlung feststellen. In den Proben wurde eine deutlich erhöhte Menge an Sauerstoff, eine leicht erhöhte Menge an Stickstoff und eine geringere Menge an Kohlenstoff nachgewiesen. Die Autoren führen diese Beobachtung auf eine reduzierte Anzahl an Kohlenstoffdoppelbindungen sowie eine erhöhte Anzahl an C-O, C=O, C-N und N-C-O-Bindungen zurück. Über die Klasse der modifizierten Lipide und die Orte der chemischen Modifikationen konnten jedoch auf Grund der gewählten Methode keine Aussagen getroffen werden [50].

Hirschberg *et al.* verwendeten ebenfalls die Cyanoacrylat-Leim-Technik zur nicht-invasiven Probenentnahme der obersten *Stratum-corneum*-Schichten humaner Haut, behandelten die entnommenen Proben mit DBD-Plasma und analysierten sie mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie. Auch sie beobachteten einen erhöhten Anteil von Sauerstoff und Stickstoff sowie einen erniedrigten Anteil an Kohlenstoffbindungen innerhalb des *Stratum corneum* nach Plasmabehandlung. Diese Beobachtung führten sie entweder auf eine Oxidation und Nitrosierung der *Stratum-corneum*-Bestandteile oder eine Abtragung der obersten *Stratum-corneum*-Lipide im Rahmen der Plasmabehandlung zurück [52].

Striesow *et al.* untersuchten mit Hilfe eines Abklatschmodells die Wirkung von Plasma auf die Talgdrüsenlipide der obersten Schichten des *Stratum corneum* menschlicher Haut. Sie konnten mittels *direct-infusion high-resolution tandem*-Massenspektrometrie (DI-MS2) und *liquid chromatography-tandem*-Massenspektrometrie (RP-LC/MS2) unterschiedliche Oxidationen an verschiedenen Triacylglyceriden, Ceramiden und Cholesterylestern nachweisen [51].

Diese Experimente geben einen ersten Einblick in die generellen Veränderungen verschiedener Lipidklassen der menschlichen Haut nach Plasmabehandlung. Allerdings sind die Erkenntnisse auf Grund der gewählten Cyanoacrylat-Leim-Technik und der Abklatschmethode auf die obersten Schichten des *Stratum corneum* begrenzt und die Eindringtiefe des Plasmas und die Lipidveränderungen in tieferen Schichten des *Stratum corneum* konnten nicht getrennt analysiert werden. Für die Untersuchung dieser Problematik müssen andere Modelle verwendet werden.

1.2.3 Das Hautmodell Schweineohr

In diesem Projekt wurden frische Schweineohren als *in vitro*-Hautmodell verwendet. Diese ähneln in ihrem histologischen Aufbau und ihrer Dicke stark der menschlichen Haut. Neben der besseren Verfügbarkeit ist der Vorteil der Schweinehaut gegenüber der menschlichen Haut (zum Beispiel Hautanschnitten aus dem OP), dass die Dicke und Beschaffenheit des *Stratum corneum* der einzelnen Schweineohren relativ konstant ist (21 µm bis 26 µm), wohingegen die Dicke des *Stratum corneum* der menschlichen Haut abhängig vom Entnahmeort im OP oft variiert (16 µm bis 38 µm [2]) und

demzufolge die einzelnen Hautproben untereinander nicht vergleichbar sind. Im Gegensatz zu anderen Tieren ist das Schweineohr weniger behaart (20 Haare pro cm²) und die Anzahl und Beschaffenheit der Haarfollikel ähnelt der des Menschen (14 bis 32 Stück pro cm²). Auch die biochemische Zusammensetzung der Lipide des *Stratum corneum* des Hausschweins ähnelt im Vergleich zu anderen Tieren am ehesten denen der menschlichen Haut [53].

Nach Klang *et al.* (2012) handelt es sich beim Schweineohr um ein sehr gutes, wenn nicht gar um das beste *in vitro*-Modell für die menschliche Haut [54].

1.3 Zielstellung und Arbeitsaufgaben

Bisher wurde besonders der Einfluss von verschiedenen Plasmaquellen auf pathologisch veränderte Hautstrukturen untersucht (akute und chronische Wunden, Hautkrebszellen, ...). Untersuchungen der Wirkung von Plasma auf gesunde Haut wurden vor allem im Hinblick auf ein eventuelles Gefahrenpotential der Plasmabehandlung für die Haut durchgeführt. Bisher durchgeführte Experimente zur Plasma-Haut-Interaktion lieferten teilweise sehr unterschiedliche Ergebnisse. Forschungsbedarf besteht darüber hinaus im Bereich der grundlegenden biochemischen Mechanismen hinter der Wechselwirkung von kalten Atmosphärendruckplasmen mit Geweben.

Bedeutend und besonders für den klinischen Alltag relevant ist die Interaktion von Plasma mit komplexen biologischen Systemen wie der Haut. Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Effekte von kaltem Atmosphärendruckplasma auf die gesunde Haut und die Hautbarriere, sowie die dahinterstehenden biochemischen Mechanismen besser zu verstehen. Dabei soll insbesondere die erste Hautschicht (*Stratum corneum*), welche das Plasma bei der Hautbehandlung erreicht, untersucht werden. Die Forschungshypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass eine Plasmabehandlung zu einer lokalen Änderung der physikochemischen Eigenschaften des *Stratum corneum* und dessen Struktur und (Barriere-)Funktion führt. Diese Hypothese wird anhand experimenteller Untersuchungen überprüft.

Die Experimente werden unter Verwendung von Schweineohrhaut als *ex vivo*-Hautmodell durchgeführt, welches anerkanntermaßen als Modell für die menschliche Haut geeignet ist. Im Einzelnen werden folgende Arbeitsaufgaben ausgeführt:

- Untersuchung und Quantifizierung der Barriereigenschaften des *Stratum corneum* vor und nach Plasmabehandlung
- Analyse des Penetrationsverhaltens von verschiedenen Substanzen (zum Beispiel nicht-steroidale Antirheumatika)
- Qualitative und quantitative Untersuchungen zur Veränderung der biochemischen Lipideigenschaften innerhalb des *Stratum corneum*

Insgesamt soll die Arbeit zu einem besseren Verständnis der Mechanismen hinter der Plasma-Haut-Interaktion beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Argon (gasförmig)	Air liquide Deutschland GmbH, Greifswald, D
Sauerstoff (gasförmig)	Air liquide Deutschland GmbH, Greifswald, D
Stickstoff (gasförmig)	Air liquide Deutschland GmbH, Greifswald, D
Stickstoff (flüssig)	Air liquide Deutschland GmbH, Greifswald, D
Ethanol 96 %, 90 %, 80 %, 70 %, 50 %	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, D
Xylol	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, D
Eosin	Carl-Roth GmbH Karlsruhe, D
Hämalaun/Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Sudanschwarz B	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
PBS w/o Ca, Mg	Corning BV, Amsterdam, Niederlande
L-Glutamin	Corning BV, Amsterdam, Niederlande
Insulin, human rekombinant	Biochrom AG, Berlin D
Hydrocortison	PromoCell, Heidelberg, D
Penicillin-Streptomycin	Corning BV, Amsterdam, Niederlande
Paraformaldehydlösung-Lösung (PFA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Triton	Sigma-Aldrich, USA
Amphotericin B	Promo Cell, Heidelberg D
Curcumin (for synthesis)	Merck KGaA, Darmstadt, D

Ethylacetat (100 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Methanol (HPLC)	TH. Geyer, Renningen, D
Ethanol (HPLC)	TH. Geyer, Renningen, D
Isopropanol (HPLC)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Wasser (HPLC)	TH. Geyer, Renningen, D
Chloroform (HPLC)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Acetonitril (HPLC)	TH. Geyer, Renningen, D
Salzsäure 36 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ammoniumformat	Sigma Aldrich, Indien
EquiSPLASH (Lipidstandard)	Avanti polar lipids, USA
Ibuprofen (98 % GC)	Sigma-Aldrich, China
Ibuprofen-Schmerzgel	Hermes Arzneimittel GmbH, China

2.1.2 Gebrauchsfertige Kits

In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Tunel-Kit) Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, D

2.1.3 Zellkulturmedium

EpiLife-Medium Life Technologies Coporation, USA

2.1.4 Verbrauchsmaterial

SafeSeal microcentrifuge tubes (Eppendorfgefäße) Sorenson, Bioscience, USA

Schraubengewindeflaschen ND8 (MS-Vials) TH. Geyer, Renningen, D

Schraubkappe (MS-Vials) TH. Geyer, Renningen, D

Mikroeinsatz (MS-Vials) TH. Geyer, Renningen, D

Septum (MS-Vials) TH. Geyer, Renningen, D

Metallfedern für Mikroeinsatz (MS-Vials) TH. Geyer, Renningen, D

Vial-Federn (MS-Vials)	TH. Geyer, Renningen, D
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, D
Sterile Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, D
Hamilton-Spritzen	Hamilton company, Romania
Corneofix	Courage + Khazaka, Köln, D
24-Well-Platten	Sarstedt, Nürnberg, D
Filterpapier	VWR International GmbH, Hannover, D
Objektträger, SuperFrost Plus Menzel	VWR International GmbH, Hannover, D
Deckgläschen	VWR International GmbH, Hannover
Skalpelle	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, D
Biopsiestanze	Stiefel Laboratories Ltd, Irland
Gießform (Disposable Vinyl Specimen Mold)	Weckert, Kitzingen, D
Eindeckmedium (Eukitt)	Carl-Roth GmbH Karlsruhe, D
Eindeckmedium (Fluoromount Aqueous Mounting Medium)	Sigma-Aldrich, USA
Einbettmedium (Tissue Tek OCT Compound)	Sakura, Polen
Dako Pen (Fettstift)	Dako Denmark, Dänemark
Bechergläser	VWR, Radnor (PA), USA
Glasflaschen	VWR, Radnor (PA), USA
Handschuhe	Meditrade GmbH, Kiefersfelden, D
Vernichtungsbeutel	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, D
Einwegrasierer	Cien men, Feintechnik GmbH Eisfeld, D
Labortücher	TH. Geyer, Renningen, D

2.1.5 Tiermaterial

Schweineohren (Histologie) (Sattelschwein, Duroc) Gut Gallin bei Hamburg, D

Schweineohren (MS) (Dänische Hybridsau, Pietrainer) Landmetzgerei Urich, Bad König, D

2.1.6 Laborgräte

Autoklav	Systemec GmbH, Linden, D
Eismaschine	Intercontinentale Ziegra-Eismaschinen Beteiligungs GmbH, Isernhagen, D
kINPen 09	Neoplas GmbH, Greifswald, D
LSE Vortexer	Corning Inc. Tewksbury (MA), USA
Mikroskop (Axiovert 40 CFL)	Carl-Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D
Cryotom	Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, D
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen, D
Wasserbad Memmert WNB14	Memmert GmbH&Co. KG, Schwabach, D
Ultraschallgerät	Bandelin electronic GmbH, Berlin, D
Heizplatte	Labotect GmbH, Göttingen, D
Leica Laser Scanning TCS SP5 Konfokalmikroskop	Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, D
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, D
Vortex Genie 2	Scientific industries, USA
QExactive Plus Hybris-Quadropol Orbitrap Massenspektrometer	Thermo Fisher Scientific, D
Vanquish UHPLC System	Thermo Fisher Scientific, D

2.1.7 Software

Hellfeld-Mikroskop Software AxioVision Release 4.8	Carl-Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D
Konfokal-Mikroskop-Software LAS AF	Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, D
GIMP 2.10.22	Spencer Kimball, Peter Mattis, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Vorbereitung der Schweineohren

Für alle durchgeführten Experimente wurden frische Schweineohren verwendet. Diese Ohren stammten von zwei verschiedenen Bauernhöfen: Gut Gallin bei Hamburg und Landmetzgerei Urich, Bad König.

Die Schweine aus Gallin waren eine Kreuzung aus Sattelschwein und Duroc und zum Zeitpunkt der Schlachtung zehn Monate alt. An diesen Ohren wurden die histologischen Versuche (Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie) durchgeführt. Die Schweine aus Bad König waren eine Kreuzung aus Dänischer Hybridsau und Pietraineber und zum Zeitpunkt der Schlachtung sieben Monate alt. An diesen Ohren wurden die Ibuprofen-Penetrationsversuche und die massenspektrometrische Lipidanalyse durchgeführt.

Die Schweine wurden getötet und die Ohren anschließend vor dem während des Schlachtvorgangs üblichen Überbrühen mit heißem Wasser entfernt, um eine thermische Zerstörung des *Stratum corneum* zu verhindern. Anschließend wurden sie trocken und luftdicht verpackt und auf Eis gelagert nach Greifswald transportiert. Bei ihrer Ankunft in Greifswald (circa 20 h nach der Tötung) hatten sie eine Temperatur von 4 °C (empfohlene Transporttemperatur für Gewebe nach Brickert *et al.* [55]) und wurden direkt weiterbehandelt oder für spätere Experimente bei -20 °C eingefroren. Nach Godin *et al.* schädigt das Einfrieren und Zwischenlagern der Schweineohren weder den Aufbau noch die Funktion des *Stratum corneum* und dessen Barriereigenschaften [53].

Direkt vor Beginn der jeweiligen Versuche wurden die Schweineohren kurz unter fließendem kaltem Wasser gewaschen, um grobe oberflächliche Verschmutzungen zu entfernen. Beschädigte Schweineohren oder Hautbereiche mit Lentigines (Pigmentflecken) oder Leberflecken wurden nicht für die Experimente verwendet. Anschließend wurden mit Hilfe eines Einwegrasierers vorsichtig ebenfalls unter fließendem Wasser die Haare von den Ohren entfernt (siehe Abbildung 5). Nach der Rasur wurde die Haut mit einem Labortuch trocken getupft und der zu behandelnde Bereich mit einem Stift markiert.



Abbildung 5: Rasur des frischen Schweineohrs

2.2.2 Aufbau des kINPen 09

Die in der folgenden Arbeit beschriebenen Versuche wurden mit dem Atmosphärendruck-Plasmajet (APPJ) kINPen 09 durchgeführt. Dieser wurde vom Leibniz Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP) entwickelt und von der neoplas GmbH in Greifswald vertrieben. Es handelt sich um das Vorläufermodell des zur Behandlung chronischer Wunden zugelassenen Medizinprodukts kINPen MED (neoplas med GmbH Greifswald).

Der kINPen besteht aus einem mit einem Betriebsgerät verbundenen Handstück, welches wiederum an eine externe Strom- und Gasquelle angeschlossen ist. Im Handstück findet die Plasmabildung statt. Das Handstück (Abbildung 6) besteht aus einer hohlen Keramikkapillare, an deren Ende sich eine geerdete konzentrische Ringelektrode befindet. In der Keramikkapillare befindet sich eine nadelförmige Hochspannungselektrode aus Edelstahl. Mit Hilfe eines Hochfrequenzgenerators (1,0 MHz bis 1,1 MHz) wird eine Wechselspannung (2 kV bis 6 kV) zwischen diesen beiden Elektroden erzeugt, wodurch das sich zwischen den Elektroden befindlichen Träger- bzw. Arbeitsgas ionisiert und damit aus dem normalen Gaszustand in den Plasmazustand überführt wird [56].

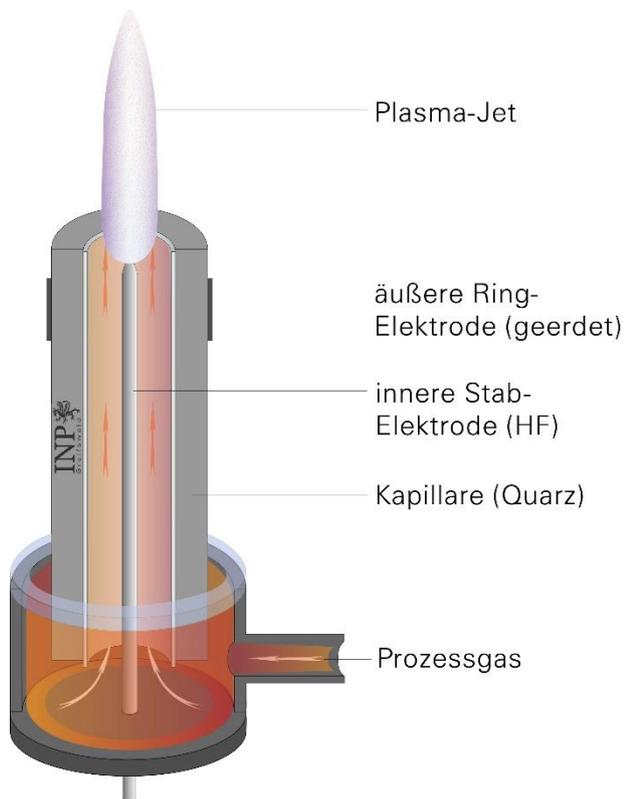


Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines APPJs (Abbildung nach Metelmann et al. [57])

Der kINPen 09 wird im Burst-Modus betrieben, die Spannung wird also nur intervallweise angelegt, wodurch ein Überhitzen des Gerätes und des produzierten Plasmas vermieden werden [58]. Die verwendete Gasart ist variierbar (meist Argon mit unterschiedlichen Gasbeimischungen (Sauerstoff, Stickstoff, ...)) und gelangt durch einen separaten Gaseingang am proximalen Ende des Handgerätes in die Keramikkapillare. Abhängig von Gasart und Gasflussgeschwindigkeit können die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies im Plasma moduliert und darüber unterschiedliche Effekte im zu behandelnden Gewebe erzielt werden. Am distalen Ende der Keramikkapillare entweicht das zwischen den Elektroden im Jet erzeugte Plasma als sichtbarer Effluent in die Umgebung. Die Länge des Plasmaeffluenten (3 mm bis 13 mm), sowie die Temperatur und Zusammensetzung des austretenden Plasmas variieren abhängig von der gewählten Gasart und mit zunehmendem Abstand zur Plasmaquelle [56],[59].

2.2.3 Plasmabehandlung mit dem kINPen 09

Im Anschluss an die Waschung und Rasur (siehe Kapitel 2.2.1.) wurden die Schweineohren vorsichtig trocken getupft, der zu behandelnde Bereich auf dem Ohr wurde ausgemessen und mit einem Stift markiert. Dabei wurde die Markierung mit einem Sicherheitsabstand von 1,5 mm zu dem

zu untersuchenden Bereich aufgetragen, um eine Kontamination des zu untersuchenden Bereichs mit der Farbe zu vermeiden.

Für die Plasmabehandlung wurde Argongas mit einer Gasflussgeschwindigkeit von 3 slm (Standardlitern pro Minute) verwendet. Die Hautprobe wurde mit einem Abstand von 0,9 cm (Hautoberfläche bis zum Ausgang der Kapillare am kINPen-Handstück) behandelt. Die sichtbare Spitze des Plasmaeffluenten berührte dabei die Hautoberfläche (siehe Abbildung 7). Durch eine gleichmäßige manuelle Bewegung des Hautschnittes unter dem Plasmaeffluenten im markierten Bereich wurde eine einheitliche Plasmabehandlung gewährleistet.

Die Dauer der Plasmabehandlung variierte. Neben einer Kontrolle (keine Plasmabehandlung) wurden die Hautproben für 15 s, 1 min, 2 min oder 5 min pro cm² Haut mit Plasma behandelt. Die kürzeren Behandlungszeiten von 15 s, 1 min und 2 min wurden gewählt, da bei der Behandlung chronischer Wunden mit CAP abhängig von Plasmaquelle und Gasflussgeschwindigkeit ebenfalls eine Behandlungsdauer von 10 s/cm² bis 2 min/cm² angewendet wird [25],[60]. Die für die Plasmaquelle kINPen 09 verhältnismäßig langen Behandlungszeiten von 5min/cm² wurden gewählt, um die Auswirkungen einer extrem langen Plasmabehandlung auf die Hautbarriere und die Zellviabilität zu simulieren. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die unterschiedlichen Behandlungszeiten in den verschiedenen Experimenten. Direkt nach der Plasmabehandlung wurden die Proben histologisch oder biochemisch weiterbearbeitet.

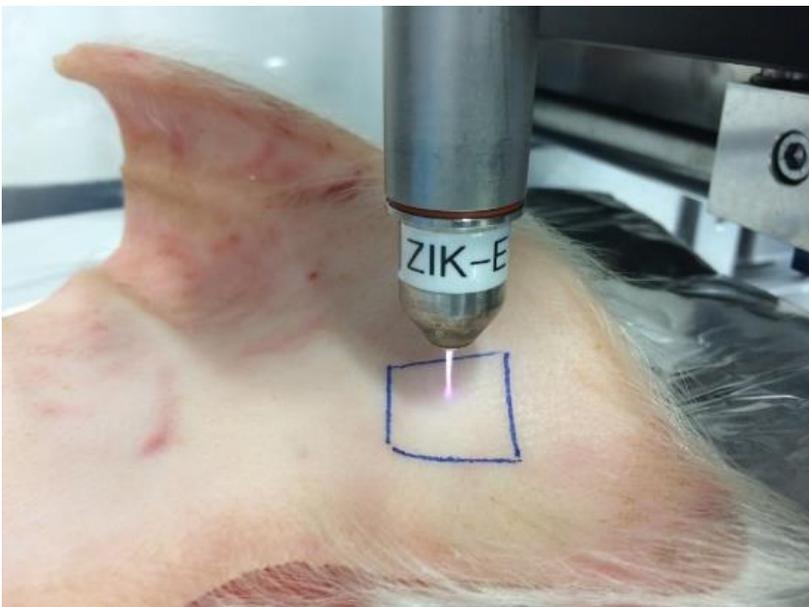


Abbildung 7: Plasmabehandlung des frischen Schweineohrs

Tabelle 1: Dauer der untersuchten Plasmabehandlungszeit in den jeweiligen Experimenten

	Kontrolle (keine Plasma- behandlung)	15 s Plasma- behandlung	1 min Plasma- behandlung	2 min Plasma- behandlung	5 min Plasma- behandlung
HE-Färbung	Ja	ja	ja	nein	nein
Sudanschwarz- B-Färbung	Ja	nein	ja	nein	nein
Tunel-Färbung	Ja	ja	ja	ja	ja
Ibuprofen- Experimente	Ja	nein	ja	nein	nein
Lipidomics- Experimente	Ja	ja	ja	nein	nein

2.2.4 Histologische Methoden und Mikroskopie

2.2.4.1 Morphologische Untersuchung mittels Hellfeld-Mikroskopie

2.2.4.1.1 HE-Färbung

Um einen generellen Eindruck von der Morphologie eines Gewebes zu erhalten, wird in der Histologie häufig die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) als histologische Routinefärbung verwendet (siehe Abbildung 8). Hierbei handelt es sich um eine Färbemethode, welche zwei unterschiedliche Färbungen kombiniert. Hämatoxylin als basischer Farbstoff färbt saure Zellorganellen (wie Zellkern oder Ribosomen) blau an. Eosin als saurer Farbstoff färbt hingegen alle basischen Zellbestandteile (wie das glatte Endoplasmatische Retikulum, Mitochondrien und verschieden Proteine (wie zum Beispiel Kollagen)) rot an [61].

Nach der Vorbereitung und Plasmabehandlung der Hautproben (siehe Kapitel 2.2.1 und 2.2.3.) wurden mit Hilfe einer Biopsiestanze (5 mm) und eines Skalpell's Biopsien von den Schweineohren entnommen. Anschließend wurden die Biopsien in Tissue Tek Compound-Einbettmedium eingebettet und in einer Gießform (Disposable Vinyl Specimen Mold) mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben konnten so einige Tage bei -80 °C zwischengelagert werden.

Anschließend wurden sie mit Hilfe eines Kryotoms in 5 µm dünne Anschnitte geschnitten und auf einem Objektträger für 1 h an der Luft getrocknet.

Danach folgte die HE-Färbung. Dafür wurde der Gewebeanschnitt auf dem Deckgläschen jeweils für fünf Minuten in Hämalaunlösung 1 % und im Anschluss in Eosinlösung 1 % gefärbt und danach gründlich unter fließendem kaltem Wasser abgespült. Nach der Färbung wurde der Gewebeschnitt auf dem Objektträger zur Entwässerung durch eine aufsteigende Ethanolreihe geführt und jeweils zehn Mal in 70 %, 80 %, 90% und 95 % Ethanol getaucht, mit einem Filterpapier trocken getupft und einmal in Xylol getaucht. Zuletzt wurde auf der Oberseite jedes Objektträgers ein Deckgläschen mit Histokitt fixiert und alles eine Stunde an der Luft getrocknet.

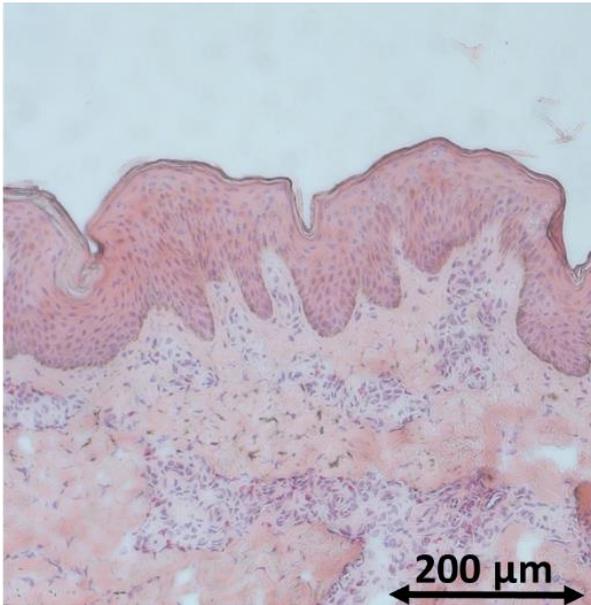


Abbildung 8: Beispielbild HE-Färbung eines Schweineohr-Hautschnittes (Zellkerne blau, Zytoplasma und Proteine rot)

2.2.4.1.2 Sudanschwarz B – Färbung

Bei den Sudanfarbstoffen handelt es sich um synthetische Farbstoffe zum Anfärben von Fetten und Wachsen (siehe Abbildung 9). Sudanschwarz B weist im Verhältnis zu anderen Sudanfarbstoffen eine hohe Spezifität für neutrale Lipide (wie zum Beispiel Triacylglyceride) auf, welche blau bis schwarz angefärbt werden [61]. Die Vorbereitung und Plasmabehandlung der Hautproben erfolgte wie in Kapitel 2.2.1. und Kapitel 2.2.3. beschrieben, die darauffolgende Biopsieentnahme, Einbettung und das Schneiden erfolgten wie in Kapitel 2.2.4.1.1. erläutert.

Nach dem Schneiden wurden die Gewebeschnitte auf dem Objektträger für 24 h an der Luft getrocknet und anschließend für 10 min in Formaldehydlösung 5 % fixiert. Währenddessen wurde eine Sudanschwarzlösung vorbereitet. Hierfür wurde 1 g Sudanschwarzpulver mit 100 ml Ethanol 70 % auf einer Heizplatte in einem Becherglas aufgekocht, abgekühlt und filtriert. Daraufhin wurden die Schnitte für 1 min in Ethanol 50 % getaucht und anschließend für 5 min in der vorher vorbereiteten Sudanschwarzlösung gefärbt. Nach der Färbung wurden die Farbüberstände mit destilliertem Wasser

abgespült und für 5 min in Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung gefärbt. Danach wurde das Präparat abermals mit destilliertem Wasser gespült und anschließend auf dem Objektträger an der Luft getrocknet.

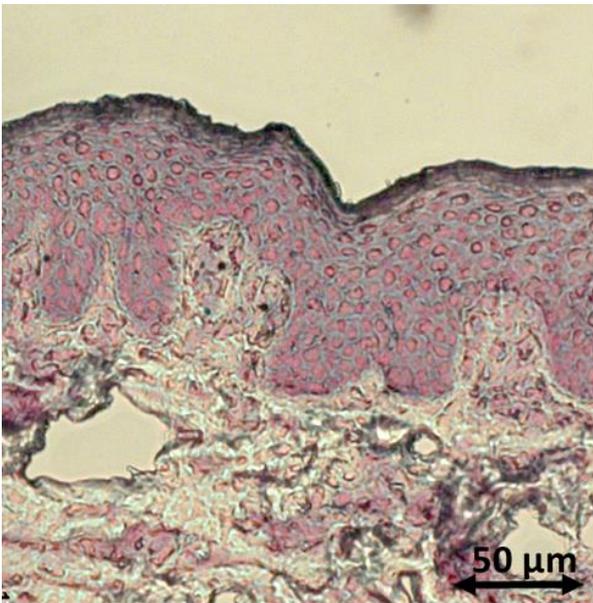


Abbildung 9: Beispielbild Sudanschwarz B-Färbung eines Schweineohr-Hautschnittes (Lipide schwarz, Zellkerne rot)

2.2.4.1.3 Durchführung Hellfeldmikroskopie

Nach der Färbung und Fixierung erfolgte die Mikroskopie der Präparate. Dafür wurde das Hellfeld-Mikroskop Axiovert 40 CFL des Unternehmens Carl Zeiss Microscopy GmbH verwendet.

Das Hellfeldmikroskop ermöglicht durch seinen im Vergleich zu anderen Lichtmikroskopen einfachen Aufbau und die schnelle Handhabung eine zügige Beurteilung der Morphologie von Gewebeproben und Mikroorganismen. Daher findet die Hellfeldmikroskopie als histologisches Standardverfahren in vielen biomedizinischen Fachgebieten (wie zum Beispiel der Histologie, der Pathologie, der Mikrobiologie) breite Verwendung. Eine elektrische Lichtquelle auf der Rückseite des Präparats sendet Licht, welches durch einen Kondensator gebündelt wird, in Richtung des Präparats. Das Licht wird im Präparat durch lichtdichte Strukturen absorbiert, während es lichtdurchlässige Strukturen durchdringen kann. So entsteht im Durchlicht ein Ebenbild des Präparats, welches auf das Objektiv fällt und dadurch sichtbar wird [61].

Für die Erstellung der HE- und Sudanschwarz-Bilder der Hautschnitte wurde die Software AxioVision Release 4.8 genutzt. Es wurden die Objektive mit fünffacher, zehnfacher und zwanzigfacher Vergrößerung gewählt. Die HE-Bilder wurden jeweils mit Hautpräparaten, die vor der

Plasmabehandlung (zur Kontrolle), sowie 15 s beziehungsweise 1 min nach der Plasmabehandlung der Haut hergestellt wurden, erstellt und ausgewertet.

Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit wurden die Versuche an jeweils drei voneinander unabhängigen Bioreplikaten (drei unterschiedliche Schweineohren) wiederholt und von jeder Hautbiopsie drei Bilder erstellt.

Zusätzlich wurde an zwei unabhängigen Bioreplikaten eine Gasflusskontrolle (nur Argongas, ohne Plasma) durchgeführt und diese anschließend mit HE gefärbt und mikroskopiert. Die Gasflusskontrollbilder wurden mit Bildern einer normalen Kontrolle (kein Argongas, kein Plasma) und Bildern nach 1 min Plasmabehandlung verglichen. Außerdem wurden die Schweineohren vor und nach *Tape stripping* (siehe Kapitel 2.2.5.1.) mit HE gefärbt und mikroskopiert.

2.2.4.2 Penetrationsuntersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie

2.2.4.2.1 Curcumin-Penetrationsexperiment

Um die Penetration von Stoffen durch das *Stratum corneum* zu veranschaulichen, bedient man sich in vielen Studien Fluoreszenzfarbstoffen, deren Penetration durch das Gewebe mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden kann. Bei dem hier verwendeten Farbstoff handelt es sich um den lipophilen, lichtempfindlichen, gelben Lebensmittelfarbstoff Curcumin, einem natürlichen Bestandteil des Kurkumas. Curcumin wurde bereits in anderen Studien zur Untersuchung der Barriereigenschaften des *Stratum corneum* verwendet [62],[63]. Seine Penetrationseigenschaften durch Schweineohrhaut korrelieren eng mit denen durch menschliche Haut [63].

Um die Penetration des Farbstoffes Curcumin (ein Pulver) in das Gewebe zu ermöglichen, wurde zunächst eine Mikrosuspension aus 0,5 g Curcumin und 100 ml Ethylacetat hergestellt. Vorexperimente führten bei dieser Konzentration zu den besten Ergebnissen. Die zu behandelnden Hautbereiche wurden an den Seiten markiert und mit Klebeband abgeklebt, um die laterale Diffusion der Mikroemulsion auf der Hautoberfläche zu vermeiden. Die Vorbereitung und Plasmabehandlung der Hautproben erfolgte wie in Kapitel 2.2.1. und Kapitel 2.2.3. beschrieben. Direkt nach der Plasmabehandlung wurden mit einer Pipette jeweils 10 ml/cm² der Mikrosuspension auf den zu untersuchenden Hautanschnitt pipettiert und für drei Sekunden mit einem behandschuhten Finger gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden die Hautproben für eine Stunde in der Dunkelheit gelagert, um die Penetration des Curcumins ins Gewebe zu ermöglichen. Die Biopsieentnahme, die Einbettung der Hautproben und das Schneiden erfolgten wie in Kapitel 2.2.4.1.1. beschrieben. Die

Gewebeanschnitte auf dem Deckgläschen wurden unmittelbar nach dem Schneiden zusätzlich mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gefärbt und anschließend mikroskopiert (siehe Abbildung 10).

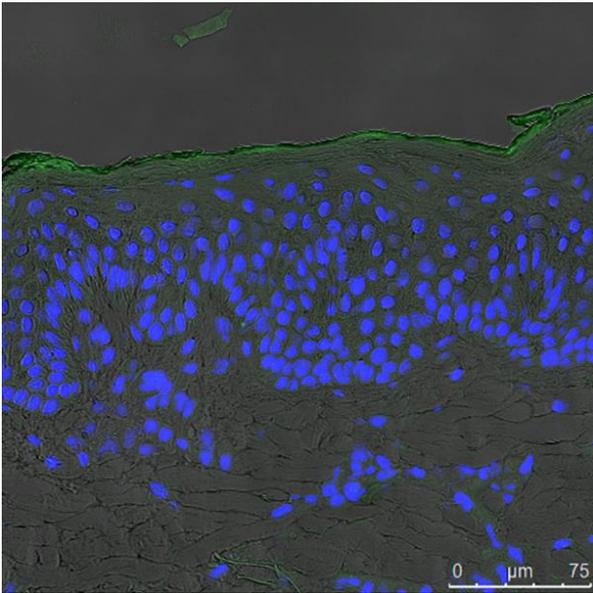


Abbildung 10: Beispielbild Curcumin-DAPI-Färbung (Zellkerne blau, Curcumin grün)

2.2.4.2.2 DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)-Färbung

Um die Zellkerne in einem histologischen Präparat sichtbar zu machen, verwendet man in der Histologie den Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), welcher sich an Thymin-Adenin-reiche DNA-Bereiche bindet und damit die Struktur des Gewebes und die Verteilung der einzelnen Zellen besser sichtbar macht [61]. Alle Fluoreszenz-Präparate (Curcumin (Kapitel 2.2.4.2.1.), TUNEL (Kapitel 2.2.4.3.2.)) wurden nach dem Einfrieren und Schneiden zur besseren Übersicht über die generelle Struktur des Gewebes mit DAPI gefärbt. Für die Färbung wurden jeweils 10 µl einer 10 µmol/l DAPI in PBS-Lösung (Phosphatgepufferte Salzlösung) pro Anschnitt auf den Objektträger pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min im Dunkeln wurde das Präparat dreimal 5 min in PBS-Lösung gewaschen und danach vorsichtig mit einem Labortuch trocken getupft. Anschließend wurden die Anschnitte mit zwei Tropfen Fluoromount Aqueous Mounting Medium pro Objektträger eingedeckt und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Präparate wurden jeweils direkt nach der Färbung mit DAPI mikroskopiert, um einen Verlust der Fluoreszenz durch lange Lagerungszeiten zu vermeiden.

2.2.4.2.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Das konfokale Mikroskop zählt wie das Hellfeldmikroskop zu den Lichtmikroskopen, besitzt jedoch einen komplexeren Aufbau. Im konfokalen Mikroskop sind im Strahlengang von der Lichtquelle zum Sensor zwei zusätzliche Lochblenden eingebaut. Diese Lochblenden blockieren die Fluoreszenzsignale des Präparates ober- und unterhalb der Fokusebene und lassen nur die Fluoreszenzsignale der Fokusebene passieren. Dadurch wird die Überlagerung des fokussierten Präparatanschnittes durch störende Hintergrundfluoreszenz reduziert und es entsteht ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis in der gewünschten Ebene. Die Verwendung eines konfokalen Mikroskops ermöglicht eine hohe optische Auflösung des Präparates mit starken Bildkontrasten und scharfen Konturen auch bei großen Vergrößerungen [61]. Außerdem gestattet es die Betrachtung des Präparats in unterschiedlichen Bildebenen, statt nur die Präparatoberfläche sichtbar zu machen.

Zur Mikroskopie der Fluoreszenz-Präparate wurden ein Leica Laser Scanning TCS SP5 Konfokalmikroskop und die Software LAS AF des Unternehmens Leica Microsystems CMS GmbH verwendet. Zur Bestimmung der Fokusebene wurde ein zehnfach vergrößerndes Objektiv, zur Aufnahme der Bilder ein zwanzigfach vergrößerndes Objektiv (Immersionsobjektiv, Immersionsflüssigkeit Glycerin) genutzt. Zusätzlich wurden die Präparatanschnitte mit Hilfe der Zoomfunktion der Software weitere 2,5 Mal vergrößert. Die erstellten Curcumin-Bilder zeigen einen Bildausschnitt von 310 μm x 310 μm . In jedem Bild wurden die Fluoreszenz von Curcumin und DAPI sowie eine Hellfeldaufnahme des Präparates getrennt aufgezeichnet und die drei Bilder anschließend zu einem Bild überlagert. Die einzelnen Fluoreszenzbilder (DAPI, Curcumin) wurden mit der Funktion „*sequential scan*“ getrennt voneinander aufgenommen, um eine Fehlfluoreszenz von DAPI im Curcumin-Emissionsbereich zu vermeiden. Die Scan-Geschwindigkeit (*scan speed*) betrug 10 Hz.

Die genauen Angaben zu verwendetem Laser, Emission, Absorption, Smart Gain und Smart Offset sind in der Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2: Curcumin-Mikroskopie: Einstellungen für Laser, Emission, Absorption, Smart Gain und Smart Offset

	Curcumin	DAPI	Hellfeld
Laser	Argon (30 % Laserpower)	405 Diode	/
Emission	Visible 488	UV 5 %	/
Absorption	Alexa 488	Leica DAPI	/
Smart Gain	1181 V	940 V	301 V
Smart Offset	- 1,5 %	0 %	- 0,9 %

Um die Fluoreszenzunterschiede zwischen den aufgenommenen Bildern für das menschliche Auge besser sichtbar zu machen, wurden alle im Ergebnisteil der Arbeit (Kapitel 3) exemplarisch abgebildeten, mit dem Konfokalmikroskop aufgenommenen Bilder mit dem Bildbearbeitungsprogramm GIMP 2.10.22 gleichermaßen nachbearbeitet (Farbsättigung grün 100 %, Kontrast 70 %, Helligkeit 40%). Die Fluoreszenzintensitätsmessungen erfolgten jedoch ausschließlich an den Originalaufnahmen (nicht mit dem GIMP-Programm bearbeitet).

2.2.4.2.4 Fluoreszenzintensitäts-Messung und Auswertung der Bilder

Nach Aufnahme der Fluoreszenzbilder wurde die Fluoreszenzintensität des Curcumins mit Hilfe des Quantify-Programmes der Software LAS AF gemessen. Dafür wurde eine 100 µm lange ROI (*Region of interest*) im digitalen Bild des Präparats festgelegt, welche senkrecht zur Hautoberfläche lag, in der ersten Schicht des *Stratum corneum* begann und in tieferen Schichten der Epidermis endete. Anschließend wurde im Bereich dieser ROI die Fluoreszenzintensität (in *counts*) abhängig von der Tiefe der Epidermis (in µm) gemessen (siehe Abbildung 11). Die Auflösung der Messlänge von 100 µm entlang der ROI beträgt bei 165 Messpunkten 0,606 µm. Für jeden Messpunkt wird der Mittelwert der Fluoreszenzintensität (*counts*) aller angeschnittenen Bildpixel in diesem Bereich als Messergebnis ausgegeben.

Die so gewonnenen Daten wurden in Excel übertragen und ausgewertet. Mit Hilfe von Excel konnten die Fluoreszenzintensität des Curcumins abhängig von der Eindringtiefe in die Epidermis grafisch dargestellt, der Median der verschiedenen ROI für jedes Bild und jedes Bioreplikat berechnet und die Fluoreszenzintensität des unbehandelten Präparats und des plasmabehandelten Präparats verglichen werden.

Die Curcumin-Experimente wurden ohne Plasmabehandlung (Kontrollpräparat) und nach 1 min/cm²

Plasmabehandlung durchgeführt. Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit wurden analog zur HE-Färbung jeweils drei Bioreplikate (drei unterschiedliche Schweineohren) verwendet, von welchen jeweils an drei unterschiedlichen Stellen im Präparat Schnitte erstellt und Bilder aufgenommen wurden. In diesen drei Bildern pro Bioreplikat wurde jeweils in fünf ROI die Curcumin-Fluoreszenzintensität gemessen. Auf diese Weise konnte die Fluoreszenzintensität in insgesamt 45 ROI vor und nach Plasmabehandlung dokumentiert werden. Alle Werte wurden auf den Durchschnittswert der Kontrolle (keine Plasmabehandlung, im Bereich 21 μm bis 100 μm = 0) normiert, um den Einfluss der Hintergrundfluoreszenz so gering wie möglich zu halten.

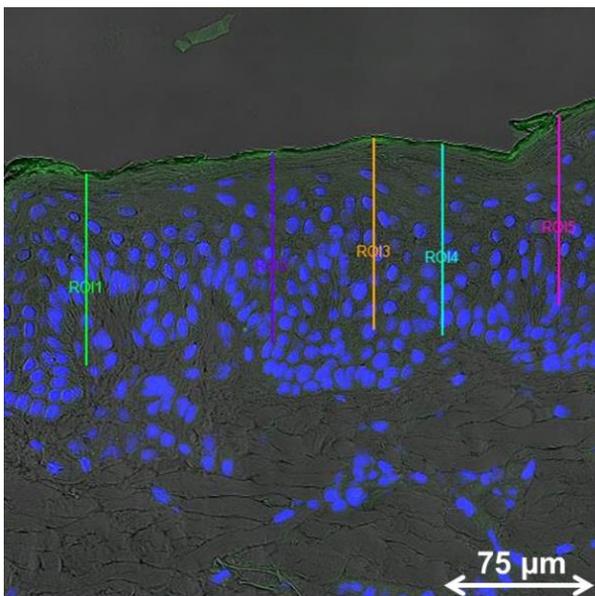


Abbildung 11: Beispielbild für ROI-Messung zur Fluoreszenzintensitätsauswertung in Schweineohrhautbiopsie

2.2.4.3 Untersuchung der Gewebeviabilität

2.2.4.3.1 Inkubation im Medium

Direkt nach Ankunft der Schweineohren (circa 20 h nach der Tötung) wurden mit einer Biopsiestanze Gewebebiopsien entnommen. Diese wurden für eine Stunde im Brutschrank bei 37 °C in einem vorbereiteten Desinfektionsmedium (100 ml Epilife-Medium, 1 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung und ein 1 Amphotericin B-Lösung) inkubiert, um am Gewebe haftende Mikroorganismen abzutöten. Anschließend wurden die Biopsien einzeln direkt mit Plasma behandelt (Kontrolle (keine Plasmabehandlung), 15 s/cm², 1 min/cm², 2 min/cm², 5 min/cm²) und getrennt in 24-Well-Platten aufbewahrt. Jedem Well wurden sofort 350 ml eines zuvor auf 37 °C erwärmten Inkubationsmediums hinzugefügt, sodass die gesamte Biopsie von Flüssigkeit umgeben war. Das Inkubationsmedium

bestand aus 100 ml Epilife-Medium, 1 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung, 1 ml L-Glutamin, 100 µl Insulin und 100 µl Hydrocortison [64],[65].

Um die Bedingungen für alle Versuche konstant zu halten, wurden alle Biopsien entsprechend der längsten Plasmabehandlungszeit von 5 min/cm² für jeweils 6 min aus dem Desinfektionsmedium entnommen. In dieser Zeit wurde, soweit erforderlich, die Plasmabehandlung vorgenommen, bevor die Proben in das Inkubationsmedium eingebettet wurden. Anschließend wurden die Biopsien abermals für 24 h (TUNEL-Experiment, Kapitel 2.2.4.3.2.) beziehungsweise 48 h (Auswanderung von Zellen, Kapitel 2.2.4.3.3.) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.4.3.2 Immunhistochemie: TUNEL-Färbung

Die TUNEL-Färbung (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) ist eine Spezial-Färbung in der Histologie, welche apoptotische Zellen in einem Gewebe markieren und sichtbar machen kann (grün). Diese Markierung wird durch das Enzym TdT (terminal desoxynucleotidyl transferase) vermittelt. TdT bindet fluoreszierende Nukleotide an während der Apoptose durch endonukleatische Fragmentierung der DNA (Desoxyribonukleinsäure) entstehende Hydroxygruppen [66].

Nach der Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C wurde das Medium entfernt, die Biopsien vorsichtig mit einem Labortuch abgetrocknet und danach wie unter Punkt 3.2.4.1. beschrieben in OCT-Gel eingebettet, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und mit Hilfe eines Cryotoms in 5 µm dünne Anschnitte auf einem Objektträger geschnitten.

Anschließend erfolgte die TUNEL-Färbung, welche mit Hilfe eines In Situ Cell Death Detection Kits der Firma Roche durchgeführt wurde. Bei der zur Markierung verwendeten fluoreszierenden Substanz handelt es sich um Fluorescein. Die Färbung wurde nach einem Protokoll von Hasse *et al.* durchgeführt [67].

Zuerst wurde das Gewebe auf dem Objektträger mit 50 µl einer PFA-Lösung 4 % in PBS (Paraformaldehyd in Phosphatgepufferter Salzlösung) pro Anschnitt für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach erfolgte die dreimalige Waschung des Gewebes in PBS für jeweils 5 min im Dunkeln. Anschließend wurden die überbleibenden PBS-Tropfen mit einem Labortuch entfernt, um eine Verschmutzung des Präparates mit PBS-Kristallen zu vermeiden. Dann wurde jeder Anschnitt mit einem schwarzen Fettstift umrandet. Jede Probe wurde mit 20 µl einer Triton-Lösung 0,1 % in PBS (Permeabilisierungslösung) versetzt und auf Eis für 2 min in der Dunkelheit inkubiert. Nach einer zweiten wie oben beschriebenen Waschung in PBS wurde jeder Anschnitt mit jeweils 20 µl einer Lösung aus 10 % TdT-Enzym (Roche-Kit) und 90 % Fluorescein (Roche-Kit) versehen. Auf jedem

Objektträger wurde eine Fehl-Fluoreszenzkontrolle mit reinem Fluorescein durchgeführt. Anschließend wurden die Proben für eine Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C in einem lichtdicht abgeschlossenen Brutschrank inkubiert. Die Proben befanden sich während der Inkubationszeit in einer Feuchtkammer, um eine Austrocknung der Proben und damit eine Zerstörung des Enzyms zu verhindern. Nach einer dritten wie oben beschriebenen Waschung in PBS folgte die Färbung des Präparats mit DAPI (siehe Kapitel 2.2.4.2.2.). Anschließend wurde das Präparat ein viertes Mal in PBS gewaschen. Zuletzt wurde auf der Oberseite jedes Objektträgers ein Deckgläschen mit Fluormount Aquaeous Mounting Medium fixiert und alles 10 min im Dunkeln bei 4 °C getrocknet.

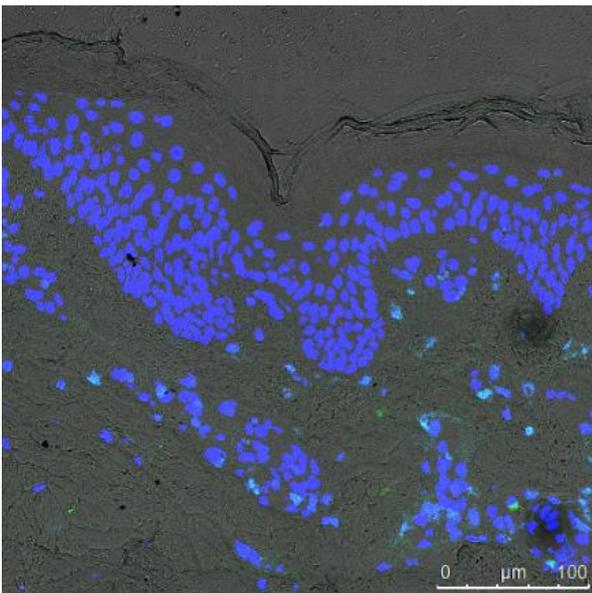


Abbildung 12: Beispielbild TUNEL-DAPI-Färbung (Zellkerne blau, apoptotische Zellkerne grün)

Zur Mikroskopie der Fluoreszenz-Präparate wurde wie in Kapitel 2.2.4.2.3. beschrieben ein Leica Laser Scanning TCS SP5 Konfokalmikroskop und die Software LAS AF des Unternehmens Leica Microsystems CMS GmbH verwendet (siehe Abbildung 12). Zur Aufnahme der Bilder wurde ein zwanzigfach vergrößerndes Objektiv (Immersionsobjektiv, Immersionsflüssigkeit Glycerin) genutzt und mit Hilfe der Zoomfunktion der Software weitere 2,5 Mal vergrößert. In jedem Bild wurden die Fluoreszenz von TUNEL und DAPI sowie eine Hellfeldaufnahme des Präparates getrennt aufgezeichnet und die drei Bilder anschließend zu einem Bild überlagert. Die einzelnen Fluoreszenzbilder (TUNEL, DAPI) wurden mit der Funktion „*sequential scan*“ getrennt voneinander aufgenommen, um eine Fehlfluoreszenz von DAPI im TUNEL-Emissionsbereich zu vermeiden. Die Scan-Geschwindigkeit (*scan speed*) betrug 100 Hz.

Die genauen Angaben zu verwendetem Laser, Emission, Absorption, Smart Gain und Smart Offset sind in der Tabelle 3 angegeben.

Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit wurden die Versuche an zwei unabhängigen Bioreplikaten wiederholt, von welchen an jeweils drei Stellen im Präparat Schnitte erstellt und Bilder zur Messung der Fluoreszenzintensität aufgenommen wurden.

Tabelle 3: TUNEL-Mikroskopie: Eistellungen für Laser, Emission, Absorption, Smart Gain und Smart Offset

	TUNEL	DAPI	Hellfeld
Laser	Argon (30 % Laserpower)	405 Diode	/
Emission	Visible 488 nm	UV 5 %	/
Absorption	Alexa 488 nm	Leica DAPI	/
Smart Gain	1247 V	952 V	395 V
Smart Offset	- 0,2 %	- 22,7 %	- 1,6 %

Auch um im Rahmen dieser Experimente die Unterschiede zwischen den einzelnen Bildern besser sichtbar zu machen, wurden die im Ergebnisteil der Arbeit (Kapitel 3) exemplarisch dargestellten Bilder der TUNEL-Färbung mit dem Bildbearbeitungsprogramm GIMP 2.10.22 gleichermaßen nachbearbeitet (Farbsättigung grün 100 %, Kontrast 70 %, Helligkeit -15%) und neben dem jeweiligen Originalbild abgebildet.

2.2.4.3.3 Auswanderung von Zellen

Ausgewanderte Zellen sind ein Zeichen für eine hohe Viabilität eines entnommenen Gewebes. Um zu untersuchen, wie frisch das in allen weiteren Versuchen verwendete Schweineohrgewebe nach dem Transport war, wurde die Auswanderung von Zellen aus diesem Gewebe mikroskopisch beobachtet.

Nach der Inkubationszeit von 48 h bei 37 °C wurden die Biopsien und das umgebende Medium untersucht. Dafür wurden das Hellfeld-Mikroskop Axiovert 40 CFL des Unternehmens Carl Zeiss Microscopy GmbH und die Software AxioVision Release 4.8 verwendet. Die Mikroskopie erfolgte wie in Kapitel 2.2.4.1.3. beschrieben.

Der Versuch wurde an zwei verschiedenen Bioreplikaten (zwei unabhängig voneinander gelieferten Schweineohren) durchgeführt.

2.2.5 Biochemische Methoden

2.2.5.1 Die *Tape stripping*-Methode

Tape stripping ist eine in der dermatologischen Forschung häufig verwendete Methode [68],[69],[70] die es ermöglicht, das *Stratum corneum* schichtenweise und gleichmäßig abzutragen, ohne dabei tiefer gelegene Hautschichten zu verletzen. Hierbei wird ein Klebestreifen (zum Beispiel Corneofix) auf die Haut gepresst und wieder abgezogen. Die oberflächlichen Hautbestandteile wie Lipide, Proteine und Korneozyten sowie penetrierte Substanzen bleiben am Klebeband haften und können auf ihre Zusammensetzung untersucht werden (siehe Abbildung 13). In dermatologischen Praxen wird die *Tape stripping*-Methode angewandt, um damit beispielsweise nicht-invasiv den Desquamationsindex und das Hydrationslevel der Haut von Patienten zu bestimmen [70].

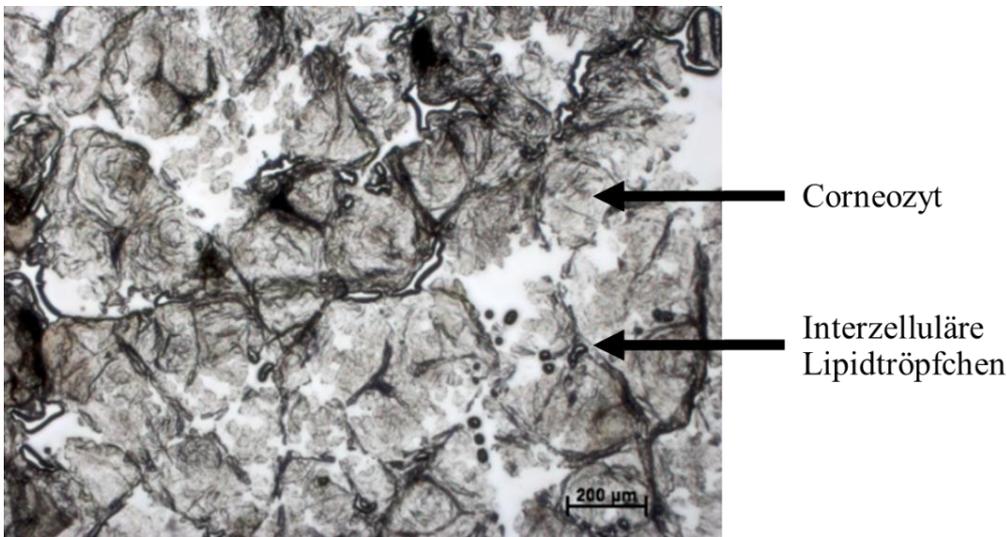


Abbildung 13: Corneozyten und interzelluläre Substanz haften am Corneofix (erste Schicht) (Aufnahme mittels Hellfeldmikroskopie, ungefärbt)

Nach der Waschung und der Rasur der Ohren wurde ein Corneofix-Streifen (Streifen 0) für 5 s mit Zeige- und Mittelfinger auf die Haut gedrückt und anschließend mit Hilfe einer Pinzette mit einer fließenden Bewegung abgezogen und verworfen. Dieser Schritt erfolgte, um oberflächliche Verschmutzungen und eventuell verbliebene Haaranschnitte zu entfernen. Daraufhin folgte die Plasmabehandlung mit dem kINPen 09 (Kapitel 2.2.3.). Unmittelbar nach der Plasmabehandlung wurden alle weiteren Corneofix-Streifen nacheinander für 5 s auf die Haut gedrückt, abgezogen und mit der klebrigen Seite (mit anhaftendem *Stratum corneum*) nach innen einzeln in Eppendorfgefäße überführt. Wurde die *Tape stripping*-Prozedur 20 Mal hintereinander im selben Hautbereich wiederholt, konnte auf diese Weise das gesamte *Stratum corneum* extrahiert und dessen verschiedene Schichten anschließend getrennt analysiert werden (siehe Abbildung 14). Zusätzlich wurde das pro

Schicht entfernte *Stratum corneum* der unbehandelten Haut, einer Gasflusskontrolle und nach einer einminütigen Plasmabehandlung gewogen.

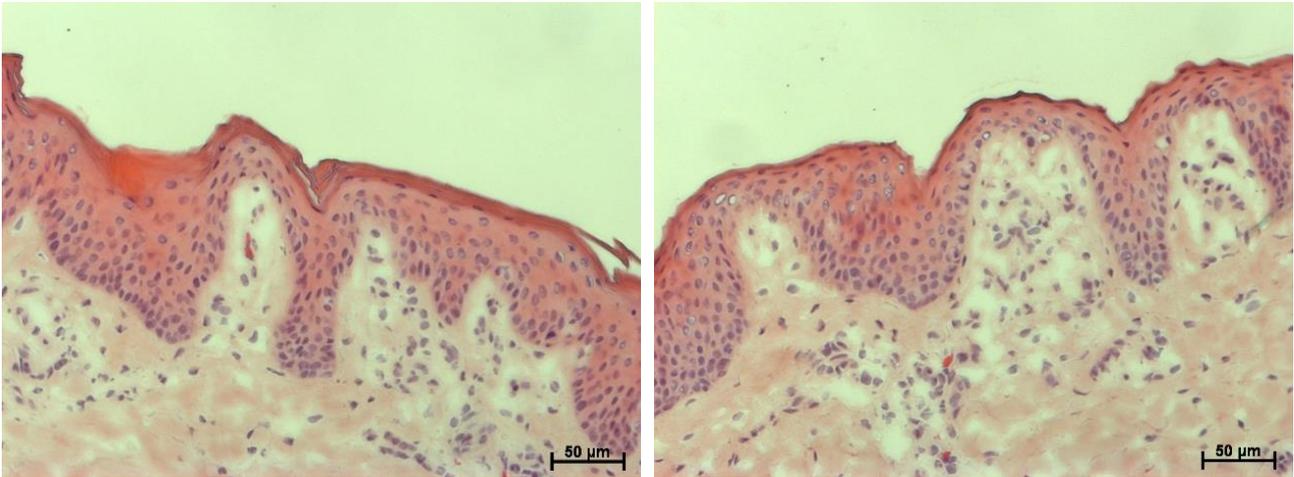


Abbildung 14: Einfluss der Tape stripping-Prozedur auf die Morphologie des *Stratum corneum*; normale Schweineohrhaut (links) und Schweineohrhaut nach 20 mal Tape stripping (rechts), HE-Färbung

2.2.5.2 Lipidextraktion

Für die durchgeführte Lipidextraktion wurden Einzelschritte aus drei verschiedenen wissenschaftlichen Fachbeiträgen [68],[69],[71] kombiniert, um möglichst viele verschiedene Lipidklassen in ihrem ursprünglichen Zustand zu extrahieren. Den Corneofix-Streifen mit dem daran haftenden *Stratum corneum* wurden jeweils 900 µl Methanol [69], sowie 5 µl EquiSPLASH (als Lipidstandard) hinzugefügt. Anschließend wurden sie für 10 min in einem Eisbad mit Ultraschall behandelt [71] und danach für 1 h bei 4 °C auf einem ThermoMixer (Schüttler für Eppendorfgefäße mit Kühlfunktion) geschüttelt [69]. Um die Extraktion und die dadurch hervorgerufene Verunreinigung der Probe durch Klebstoff zu verhindern, wurden nur die oberen 500 µl jeder Probe genutzt, da der gelöste Klebstoff sich am Boden absetzte. Da in Vorversuchen (Daten hier nicht gezeigt) festgestellt wurde, dass die Abundanz der aus einer einzigen Schicht extrahierten Lipide unterhalb der massenspektrometrischen Detektionsgrenze lag, wurden im nächsten Schritt jeweils die Proben aus drei verschiedenen *Tape strips* gepoolt. Die 500 µl von jeweils drei Proben (zum Beispiel aus Schicht eins, zwei und drei) wurden aus dem Eppendorfgefäß in ein Glas-Vial umpipettiert und mit gasförmigem Stickstoff gemeinsam eingetrocknet [68], um eine möglichst hohe Lipidkonzentration in einem messbaren Bereich zu erhalten. Die getrockneten Proben wurden jeweils mit 100 µl von einem 1:2:4-Gemisch aus Chloroform, Methanol und Isopropanol und 5 mmol/l

Ammoniumformat resuspendiert [69], wovon 50 µl in ein neues Glas-Vial mit Glasinsert umgefüllt und für die Messung bereitgestellt wurden.

Es wurden jeweils drei Bioreplikate (drei unterschiedliche Schweineohren) verwendet, von welchen jeweils die ersten 20 Schichten des *Stratum corneum* extrahiert und analysiert wurden.

Die Lipid-Experimente wurden ohne Plasmabehandlung (Kontrolle), nach 15 s/cm² Plasmabehandlung und nach 1 min/cm² Plasmabehandlung durchgeführt. Um die intraindividuelle Variabilität innerhalb des Schweineohres so gering wie möglich zu halten, wurden für ein Experiment räumlich nahe beieinander liegende Hautbereiche für Kontrolle und Plasmabehandlung ausgewählt.

2.2.5.3 Ibuprofen-Penetrationsexperiment

Ibuprofen ist ein gegen Schmerzen, Fieber und Entzündungen wirksames nichtsteroidales Antiphlogistikum und eines der am häufigsten rezeptfrei verkauften Arzneimittel in Deutschland. Ibuprofen (iso-butyl-propanoic-phenolic acid, Summenformel: C₁₃H₁₈O₂) besteht aus einer an einen Aromaten gebundenen Säure. Es wirkt über eine nicht selektive Hemmung der COX (Cyclooxygenasen) eins und zwei, welche die Prostaglandinsynthese katalysieren und damit Entzündungen, das Schmerzempfinden und Fieber steigern [72]. Ibuprofen kann sowohl oral (in Form von Tabletten und Pulvern) als auch dermal (in Form von Cremes und Gels) verabreicht werden. Bei lokalen Schmerzen wird eine transdermale Applikation empfohlen, da Ibuprofen so (nach einer etwas längeren Dauer bis zum Wirkeintritt) die gleiche oder sogar eine höhere Konzentration im betroffenen Muskel oder subkutanen Gewebe erreicht wie nach einer oralen Einnahme. Die nachweisbare Blutplasmakonzentration des Ibuprofens ist nach transdormaler Applikation allerdings viel niedriger, weshalb systemische Nebenwirkungen verhältnismäßig geringer ausfallen [73].

Nach der Vorbereitung und Rasur der Ohren (Kapitel 2.2.1.) wurde wie in Kapitel 2.2.5.2. beschrieben auch hier ein Corneofix-Streifen (Corneofix null) auf die Haut gedrückt, abgezogen und danach verworfen. Die Plasmabehandlung der Hautproben erfolgte wie in Kapitel 2.2.3. beschrieben. Für die Ibuprofen-Experimente wurden reines Argongas und eine Behandlungszeit von 1 min gewählt. Direkt nach der Plasmabehandlung wurden auf einer Hautfläche von 4 cm² 12,5 mg/cm² Ibuprofen-Schmerzgel aufgetragen und mit einem behandschuhten Finger gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden die Hautproben für eine Stunde bei Raumtemperatur in der Dunkelheit gelagert, um die Penetration des Ibuprofens ins Gewebe zu ermöglichen. Danach wurde überschüssiges, noch nicht ins *Stratum corneum* penetriertes Ibuprofen-Schmerzgel vorsichtig mit einem Labortuch von der Hautoberfläche abgetupft. Nachfolgend wurden nacheinander insgesamt 20

Corneofix-Streifen in dem behandelten Hautbereich mit zwei Fingern für fünf Sekunden angedrückt, mit einer Pinzette abgezogen und einzeln in Glas-Vials gefüllt.

Den Corneofix-Streifen mit dem daran haftenden *Stratum corneum* und Ibuprofen wurden jeweils 2 ml Acetonitril-Salzsäurelösung (90:10) hinzugefügt und für eine Stunde bei 1000 rpm (Umdrehungen pro Minute) geschüttelt. Anschließend wurden 300 µl dieser Lösung in ein MS-Vial umgefüllt und 600 µl Wasser (HPLC grade) hinzugegeben. Danach erfolgte die Messung der Ibuprofenkonzentration mittels HPLC und MS. Untersucht wurden nur Schicht 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13, 16 und 19. Diese Auswahl wurde nach Vorversuchen getroffen, da zu lange Wartezeiten der einzelnen Proben vor der Messung (auf Grund des fortschreitenden Ibuprofenzerfalls in der Lösung) ungenauere Ergebnisse lieferten.

Die hier beschriebene Methode basiert auf einem Protokoll von [74]. Variiert wurden die aufgetragene Ibuprofenmenge, die Klebestreifen-Art (Corneofix) für die *Tape stripping*-Prozedur, die Penetrationszeit, die Extraktionszeit und das zusätzliche Schütteln während der Extraktion.

2.2.5.4 Analytische Methoden

Die MS- und HLPC-Messungen der Ibuprofen- und Lipid-Proben wurden von Giuliana Bruno (Ibuprofen) und Johanna Striesow (Lipide) am INP Greifswald durchgeführt.

2.2.5.4.1 MS- und HLPC-Messung der Ibuprofen-Proben

Die extrahierten Ibuprofen-Proben (siehe Kapitel 2.2.5.3.) wurden mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography, Infinity II 1290, Agilent) und MS (Massenspektrometrie, TripleQuad 5500, Sciex) untersucht. Die Proben wurden mit Hilfe einer 2.1 x 50 mm Zorbax RRHD Eclipse Plus C18-Säule aufgetrennt (95 Å Porengröße, 1.8 µm Partikelgröße), welche zusätzlich mit einer 2.1 x 5 mm Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 UHPLC-Vorsäule (95 Å Porengröße, 1.8 µm Partikelgröße) ausgestattet war. Die Proben wurden jeweils für 10 min in einem isokratischen Gradienten aus 66 % Wasser (A) und 34 % Acetonitril (B) aufgetrennt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde ein Schaltventil verwendet, welches die gelösten Bestandteile nach 0 bis 0,5 min Messzeit von der Säule in den Abfall spülte und nur die gelösten Bestandteile innerhalb von 0,5 bis 9 min Messzeit von der Säule zum Massenspektrometer weiterleitete. Folgende Parameter wurden für die Massenspektrometrie mittels Turbo Ion Source verwendet:

- 4.5 kV SONDENSspannung,
- Temperatur 500 °C,
- 20 psi Mantelgas,

- 90 psi Gasfluss eins,
- 60 psi Gasfluss zwei, und
- - 45 kV Declustering-Potenzial.

Bei der für die Quantifizierung des Ibuprofens angewandten Methode handelte es sich um MRM (Multiple Reaction Monitoring, -10 kW als Kollisionsenergie). Es wurden zwei verschiedene Übergänge analysiert: (Q1, 205.0 m/z → Q3, 159.1 m/z) für die Identifizierung der Ibuprofenmoleküle und (Q1, 205.0 m/z → Q3, 160.8 m/z) für die Quantifizierung der Ibuprofenmoleküle. Für jeden Übergang wurde mit Hilfe eines handelsüblichen Ibuprofenstandards (Merck) eine externe Kalibrationskurve (siehe Abbildung 15) gemessen. Die anhand der Kalibrationskurve ermittelte massenspektrometrische Nachweisgrenze für Ibuprofen (limit of detection, LOD) betrug 0,1407 µl/ml und die massenspektrometrische Bestimmungsgrenze (limit of quantification, LOQ) betrug 0,4264 µl/ml. Die Flächen unter der Ibuprofenkurve der Proben wurden mit der jeweiligen Kalibrationskurve verglichen, wodurch die Ibuprofenkonzentration (µg/ml pro Schicht auf 4 cm²) in jeder Probe berechnet werden konnte. Mit Hilfe des Gesamtvolumens der Probelösung wurde daraus die Gesamtmenge an Ibuprofen in jeder Schicht berechnet (in µg/Schicht auf 4 cm²). Anschließend wurden alle Daten auf eine Hautoberfläche von 1 cm² normalisiert, wodurch die absolute Ibuprofenmenge pro extrahierter *Stratum corneum*-Schicht in einem definierten Hautbereich (1 cm²) errechnet werden konnte (µg/ Schicht/ cm²).

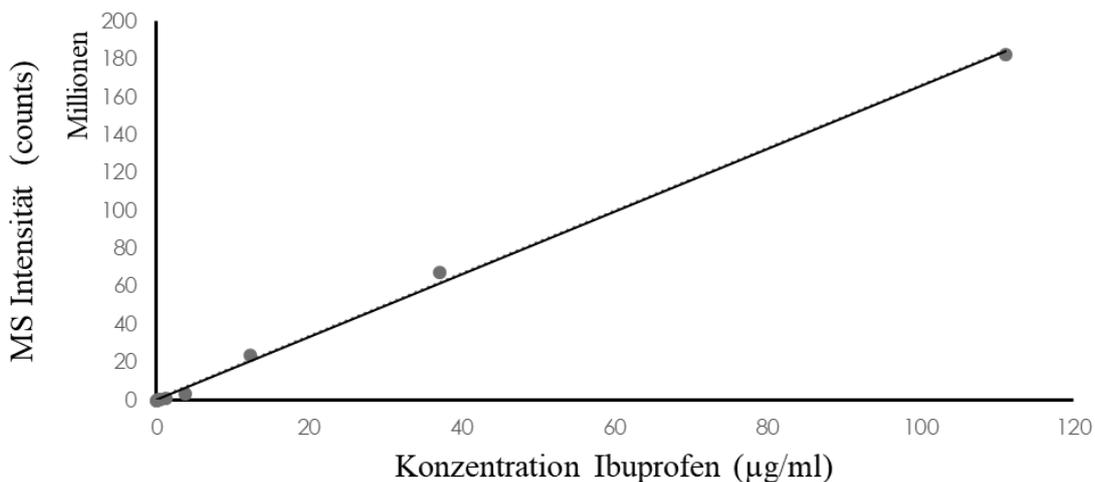


Abbildung 15: Kalibrationskurve Ibuprofen

2.2.5.4.2 MS- und UHPLC-Messung der Lipid-Proben

Die von den *Tape strips* extrahierten und gelösten Lipide (siehe Kapitel 2.2.5.2.) wurden mittels UHPLC (Vanquish Ultra High Performance Liquid Chromatography

/Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, Thermo Fisher Scientific) und Massenspektrometrie (QExactive Plus Massenspektrometer, Thermo Fisher Scientific) analysiert. Die Proben wurden zunächst mit Hilfe der UHPLC-Apparatur auf einer AccuCore C30 Säule aufgetrennt (2.1 x 100 mm, 2,6 µm Partikelgröße, Thermo Fisher Scientific), welche zusätzlich mit einer Vorsäule ausgestattet war (Uniguard Vorsäulenkartuschenhalter mit Filter, 2,1 x 10 mm, 2.6 µm Partikelgröße, Thermo Fisher Scientific). Die Lipide wurden für 31 min in einem linearen Gradienten mit einer Flussrate von 350 µl/min separiert (siehe Tabelle 4). Die Eluenten der mobilen Phase waren (A) 60 % Acetonitril und 40 % Wasser (v/v); sowie (B) 90 % Isopropanol und 10 % Acetonitril (v/v). Die Temperatur des Autosamplers betrug 12 °C, das Probeninjektionsvolumen betrug 3 µl pro Probe und der Säulenofen hatte eine Temperatur von 50 °C.

Im Anschluss an die Auftrennung der Lipide mit Hilfe der UHPLC folgte die Messung der separierten Lipide mittels Massenspektrometrie. Folgende Parameter wurden für die Massenspektrometrie mittels beheizter Electrospray-Ionenquelle (HESI-II, Thermo Fisher Scientific) verwendet:

- 2.7 kV Spannung,
- 14 psi Mantelgasfluss,
- zwei psi Aux Gasfluss,
- 320 °C Kapillartemperatur und
- ein S-lens RF level von 50.

Die Messung der separierten Lipide wurde im *data-dependent mode* (Top 10) in beiden Polaritäten (positiv und negativ) durchgeführt. Zur Identifikation der Lipide wurde die Software LipidSearch (Version 4.2.21, Thermo Fisher Scientific) und die in LipidSearch implementierten *in silico*-Datenbanken HCD (zur Identifikation aller Lipidklassen), Oxid. GPL (zur Identifikation oxidierter Glycerophospholipide) und Skin Lipids (zur Identifikation langkettiger Ceramide) genutzt. Folgende Parameter wurden für die Lipididentifikation verwendet:

- Precursor mass-Toleranz 5 ppm,
- Product mass-Toleranz 8 ppm,
- m-score Grenze 5.0,
- Toprank filter on,
- Main node filter: main isomer peak,
- ID Quality Filter A+B,
- Zielklassen: alle,
- Addukte: alle.

Die Liste der identifizierten Lipide wurde in Excel exportiert und mit folgenden Parametern gefiltert: ppm Toleranz zwischen -3 und 3, Area Score und Peak Qualität über 0.7.

Die Daten wurden anschließend nach höchstem m-Score sortiert und Duplikate in der Top-Retentionszeit entfernt. Lipide mit unterschiedlichen Addukten wurden zusammengefasst und Lipidklassen in Area% dargestellt. Für die Analyse von Triacylglyceriden und Ceramiden wurden die einzelnen Lipide auf einen Lipidstandard in der Probe normalisiert.

Tabelle 4: *Flussgradient für die LC- Trennung von Hautlipiden*

Eluent B [%] (Isopropanol, Acetonitril) der mobilen Phase	Zeit [min]
30	0
30	3
43	8
50	8.1
70	17
99	24
99	27
30	27.1
30	31

2.2.6 Statistische Auswertung

Für die in Kapitel 2.2.4.2.1. (Curcumin-Penetrationsexperiment) und Kapitel 2.2.5.3 (Ibuprofen-Penetrationsexperiment) erhobenen Daten wurden mit Hilfe von Excel das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung bestimmt.

Anschließend wurden die Daten mit Hilfe der Software GraphPad Prism 6 und dem Shapiro-Wilk-Tests exemplarisch an 11 Stellen im Präparat (0 μm , 10 μm , [...], 100 μm) auf Normalverteilung geprüft. Beide Datengruppen waren nicht durchgängig normalverteilt. Als Grund dafür wurden die begrenzte Anzahl an durchgeführten Versuchen und eventuell eine intra- und interindividuelle Inhomogenität der Schweineohren vermutet. Da die Daten nicht normalverteilt waren, wurde als Signifikanztest ebenfalls mit Hilfe von GraphPad Prism 6 ein gepaarter Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (Rangsummentest) durchgeführt (Signifikanzlevel * $\hat{=}$ $p = 0.05$; ** $\hat{=}$ $p = 0.01$; *** $\hat{=}$ $p = 0.001$) (Abbildung 24).

Alle dargestellten Grafiken wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 6 und Excel erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 CAP-Effekte auf den morphologischen Aufbau des *Stratum corneum*

3.1.1 HE-Färbung

Wie in Kapitel 2.2.4.1. beschrieben, wurde der Einfluss der Plasmabehandlungsdauer auf die Morphologie des *Stratum corneum* histologisch untersucht. Rein optisch (ohne eine Vergrößerung durch das Mikroskop) konnte vor und nach Plasmabehandlung keine Veränderung der Haut festgestellt werden. Die drei in Abbildung 16 dargestellten, mit Hilfe eines Hellfeldmikroskops aufgenommenen Bilder zeigen den morphologischen Aufbau der Epidermis eines vertikal zur Hautoberfläche geschnittenen Schweineohres ohne Plasmabehandlung (Kontrolle), nach 15 s/cm² und nach einer min/cm² Plasmabehandlung. Durch die HE-Färbung werden in diesen Bildern die sauren Bestandteile der Zellen (Zellkerne und Ribosomen) blau und die basischen Bestandteile der Zellen (das glatte Endoplasmatische Retikulum, Mitochondrien und verschiedenen Proteine) rot angefärbt. Die Unterteilung der Haut in Dermis (basale Lage, bläuliche Färbung) und Epidermis (appikale Lage, rötliche Färbung) ist klar erkennbar. Die drei Präparate unterscheiden sich untereinander nur im Hinblick auf die Struktur des *Stratum corneum*. Dieses ist vor der Plasmabehandlung (a) glatt und ebenmäßig, hat eine konstante Dicke von 15 µm, ist durchgängig mit dem darunterliegenden *Stratum granulosum* verbunden und weist keine Lücken auf. Nach 15 s Plasmabehandlung pro cm² Haut (b) sind keine Veränderungen im Vergleich zum nicht behandelten Präparat ersichtlich und das *Stratum corneum* weist keine sichtbaren morphologischen Veränderungen auf. Im Gegensatz dazu werden nach einer einminütigen Plasmabehandlung pro cm² Haut (c) erste Veränderungen in der Beschaffenheit des *Stratum corneum* deutlich. Die verschiedenen Schichten des *Stratum corneum* beginnen, sich voneinander zu lösen und kleine Lücken innerhalb des *Stratum corneum* werden sichtbar. Das *Stratum corneum* scheint leicht aufgelockert.

Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit wurden die Versuche an jeweils drei voneinander unabhängigen Bioreplikaten (drei unterschiedlichen Schweineohren) wiederholt und von jeder Hautbiopsie drei Bilder erstellt. Abbildung 16 zeigt exemplarisch drei der aufgenommenen Bilder zu unterschiedlichen Behandlungszeiten.

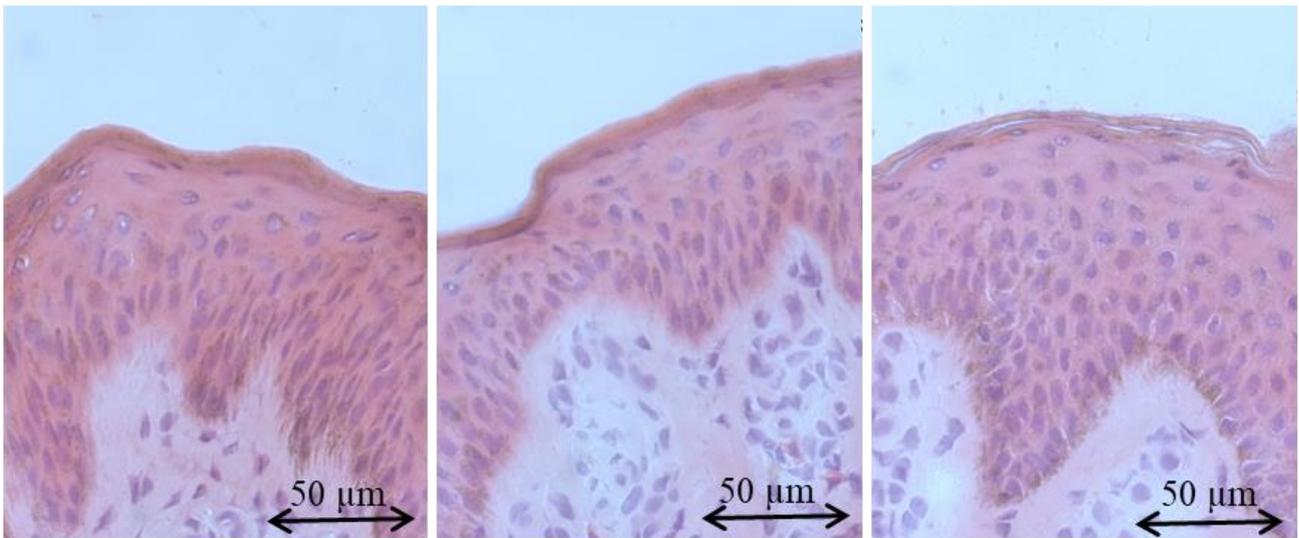


Abbildung 16: Schweineohr, HE-Färbung, vierzigfache Vergrößerung mit Hellfeldmikroskop, Plasmabehandlung mit kINPen 09, 3 sl/m Argongas, 9 mm Abstand der Haut zur Plasmaquelle,

a) keine Plasmabehandlung (links); b) 15 s/cm² Plasmabehandlung (Mitte); c) 1 min/cm² Plasmabehandlung (rechts)

3.1.2 Sudanschwarz B-Färbung

Die drei Sudan-Schwarz-B gefärbten Präparate in Abbildung 17 zeigen den morphologischen Aufbau der Epidermis eines Schweineohres ohne Plasmabehandlung (Kontrolle) und nach 15 s sowie 1 min Plasmabehandlung pro cm² Haut. Auch hier ist die Unterteilung der Haut in Dermis (basale Lage, hellrosa Färbung), Epidermis (appikale Lage, lila Färbung) und *Stratum corneum* (schwarz) deutlich sichtbar. Durch die Sudanschwarz-Färbung in Kombination mit Kernechtrot werden in diesen Bildern Zellkerne rot und Lipide schwarz angefärbt. Sowohl das *Stratum corneum* der unbehandelten Haut, als auch das *Stratum corneum* nach 15 s/cm² Plasmabehandlung der Haut ist durchgängig und die unterschiedlichen übereinanderliegenden Schichten sind klar erkennbar. Wie bereits in Abbildung 16 (HE-Bilder) erkennbar, lösen sich auch hier nach einer Plasmabehandlung 1 min/cm² erste Bestandteile des *Stratum corneum* (durch Sudanschwarz angefärbte neutrale Lipide (wie zum Beispiel Mono-, Di- und Triglyceride)) und verändern das gleichmäßige Erscheinungsbild des *Stratum corneum*. Durch die sich lösenden winzigen Lipidtröpfchen, welche zudem über das Präparat verteilt sind, wirkt dieses leicht verschmutzt.

Sowohl mittels HE-Färbung als auch mittels Sudanschwarz-Färbung konnte gezeigt werden, dass Plasma bei kurzen Behandlungszeiten (15 s/cm²) keinen Effekt auf die morphologische Integrität des *Stratum corneum* hat, bei längeren Behandlungszeiten (über 1 min/cm²) jedoch der leicht auflockernde Effekt des Plasmas auf das *Stratum corneum* sichtbar wird.

Die Versuche wurden jeweils an drei unterschiedlichen Schweineohren durchgeführt (drei

Bioreplikate), von welchen jeweils an drei unterschiedlichen Stellen im Präparat Bilder aufgenommen wurden (in Abbildung 17 exemplarisch dargestellt).

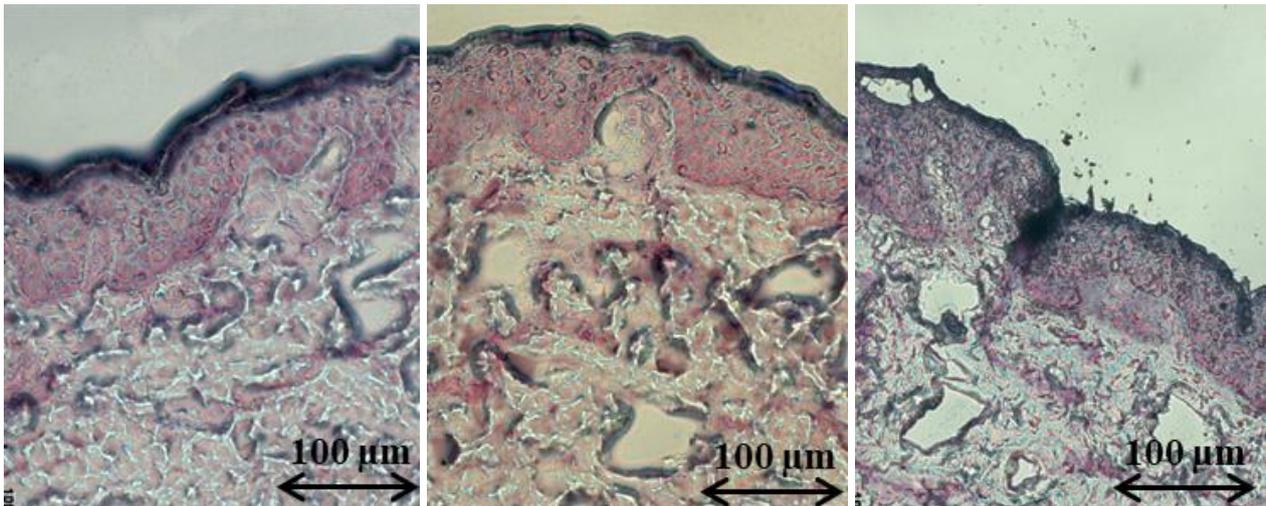


Abbildung 17: Schweineohr, Sudanschwarz B-Färbung, vierzigfache Vergrößerung mit Hellfeldmikroskop, Plasmabehandlung mit kINPen 09, 3 sl/m Argongas, 9 mm Abstand der Haut zur Plasmaquelle,

a) keine Plasmabehandlung (links); b) 15 s/cm² Plasmabehandlung (Mitte); c) 1 min/cm² Plasmabehandlung (rechts)

3.1.3 Gasflusskontrolle

Abbildung 18 stellt den Einfluss des reinen Gasflusses, ohne dass das Plasma gezündet wurde, auf die Integrität des *Stratum corneum* dar. Die Struktur des *Stratum corneum* nach 1 min Argon Gasfluss (Abbildung 18 b) ähnelt der Kontrolle (kein Gasfluss, keine Plasmabehandlung; Abbildung 18 a) und unterscheidet sich optisch stark von der Struktur des *Stratum corneum* nach 1 min/cm² Plasmabehandlung (Abbildung 18 c). Die Abbildungen zeigen, dass ein reiner Gasfluss von 3 Standardlitern pro Minute Argongas für 1 min/cm² keinen sichtbaren Einfluss auf die Morphologie des *Stratum corneum* hat und die glatte gleichmäßige Oberfläche des *Stratum corneum* dadurch nicht zerstört oder aufgelockert wird. Die Beobachtungen in den anderen histologischen Experimenten sind also auf die eigentliche Plasmabehandlung und nicht auf den alleinigen Effekt des Gasflusses zurückzuführen. Die Versuche wurden jeweils an zwei unterschiedlichen Schweineohren durchgeführt. Die Präparate sind in Abbildung 18 exemplarisch dargestellt.

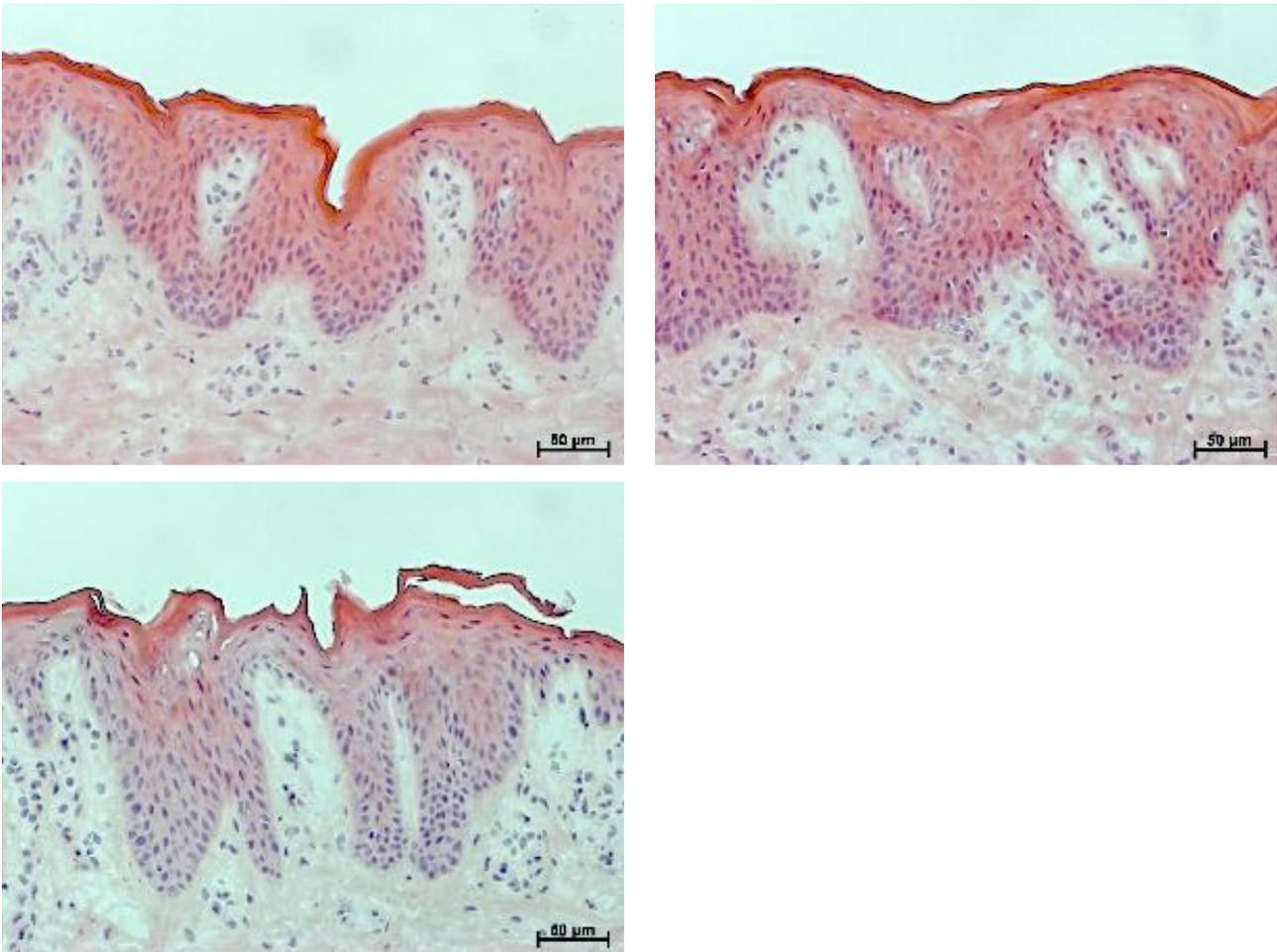


Abbildung 18: Schweineohr, HE-Färbung, zehnfache Vergrößerung mit Hellfeldmikroskop, Plasmabehandlung mit kINPen 09, 3 sl/m Argongas, 9 mm Abstand,

a) keine Plasmabehandlung (oben links); b) Gasfluss Argon 1 min/cm² (oben rechts); c) 1 min/cm² Plasmabehandlung (unten)

3.1.4 Einfluss der Rasur

Im folgenden Versuch wurde der Einfluss der Rasur der Haut mit einem Einwegrasierer auf die Integrität des *Stratum corneum* untersucht. Die Haare, welche durch die Rasur entfernt werden, würden die weiteren Experimente stören (Lipidomics: Haften der Haare am Corneofix und Verfälschen der Werte; Verschmutzung der histologischen Präparate durch Haaranschnitte, ...), weshalb die vorherige Rasur der Schweineohren nötig ist. Abbildung 19 zeigt die Struktur des *Stratum corneum* vor a) und nach der Rasur b). Vor der Rasur ist die Oberfläche des *Stratum corneum* ungleichmäßig und einzelne Hautschuppen lösen sich ab. Die sich bereits ablösenden Hautschuppen sind kein Bestandteil der eigentlichen Hautbarriere und ihre Menge variiert stark intra- und interindividuell, weshalb eine Vergleichbarkeit der später aufgenommenen Daten in ihrer Anwesenheit nicht gewährleistet werden kann. Durch die Rasur werden die störenden Haare sowie die oberste lockere und ungleichmäßige Schicht des *Stratum corneum* entfernt und nur feste und

aneinanderhaftende Bestandteile des *Stratum corneum* verbleiben in einer gleichmäßigen Schicht. Die Versuche wurden jeweils an zwei unterschiedlichen Schweineohren durchgeführt. Die Präparate sind in Abbildung 19 exemplarisch dargestellt.

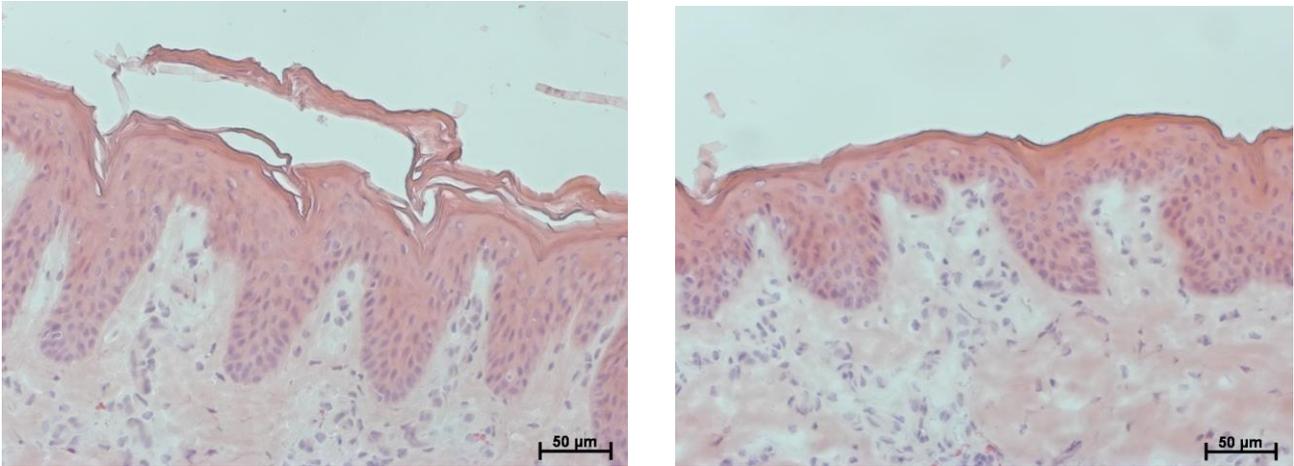


Abbildung 19: Schweineohr, HE-Färbung, zehnfache Vergrößerung mit Hellfeldmikroskop, a) Schweinehaut vor Rasur (links), b) Schweinehaut nach Rasur (rechts)

3.2 Einfluss der Plasmabehandlungsdauer auf die Apoptoserate epidermaler Zellen

Im Rahmen der TUNEL-Experimente wurde der Einfluss der Plasmabehandlungsdauer auf die Apoptoserate von Zellen in der Epidermis untersucht. Die in Abbildung 20 a) bis f) dargestellten fluoreszenzmikroskopischen Bilder zeigen einen Ausschnitt der vertikal geschnittenen und mit dem konfokalen Mikroskop mikroskopierten Schweineohrhaut.

Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit wurden im Rahmen dieses Versuchs jeweils zwei Bioreplikate (zwei unterschiedliche Schweineohren) untersucht, von welchen jeweils an drei unterschiedlichen Stellen im Präparat Schnitte erstellt und Bilder zur Messung der Fluoreszenzintensität aufgenommen wurden. Die Bilder in Abbildung 20 zeigen exemplarisch die beobachteten Veränderungen vor und nach Plasmabehandlung.

Beim jeweils linken Bild handelt es sich um die mit dem Konfokalmikroskop aufgenommene Originalaufnahme, welche hier der Orientierung im Präparat dient. Zur besseren Übersicht wurden durch eingezeichnete schwarze Linien das *Stratum corneum* vom Rest der Epidermis, sowie die Epidermis von der angrenzenden Dermis getrennt. Die zusätzliche hinterlegte schwarz-weiß Abbildung des Präparats mittels Hellfeldmikroskopie ermöglicht einen Überblick über das gesamte

Präparat und gestattet die Lokalisation der gefärbten Zellkerne im Gewebe. Im mittleren Bild wurden die Kontraste der Originalbilder gleichermaßen verstärkt, um die Fluoreszenz für das menschliche Auge deutlicher sichtbar zu machen. Das rechte Bild entspricht jeweils einem vergrößerten Ausschnitt des mittleren Bildes.

Bei den blau angefärbten Zellkernen (DAPI-Färbung) handelt es sich um lebendige Zellkerne, bei den grün angefärbten Zellkernen (TUNEL-Fluorescein-Färbung) um apoptotische Zellkerne. Im rechten Bild wurden apoptotische Zellkerne in der Dermis mit weißen, apoptotische Zellkerne im *Stratum granulosum* mit gelben und apoptotische Zellkerne im *Stratum basale* mit roten Pfeilen markiert.

In allen ausgewerteten Schnittbildern befinden sich die meisten Zellkerne (DAPI, blau) im Bereich der Epidermis. Das *Stratum corneum* ist im apikalen Bereich der Epidermis als mehrschichtige graue Struktur erkennbar. Angrenzend daran folgen das *Stratum granulosum* (erkennbar an den horizontal zur Hautoberfläche liegenden blau gefärbten Zellkernen), das *Stratum spinosum* (erkennbar an kubischen Zellen mit pyknotischen Zellkernen) und das *Stratum basale* (mit einer Reihe perlenschnurartiger hochprismatischer gleichmäßig angeordneter Zellkerne). Im Anschluss an das *Stratum basale* folgen die Basalmembran (im Bild nicht eindeutig differenzierbar) und die Dermis.

In der Dermis befinden sich weniger Zellkerne als in der Epidermis. Sie liegen vereinzelt oder in kleinen Grüppchen vor und sind umgeben von einem Netz aus Kollagenfasern (grau dargestellt). Alle Präparate (mit Ausnahme der TUNEL-Fluoreszenz-Negativkontrolle, Abbildung 20 f) weisen in der Dermis mit Hilfe der TUNEL-Färbung angefärbte apoptotische Zellen auf (weiße Pfeile).

Im Gegensatz dazu variiert die Anzahl der apoptotischen Zellen (TUNEL, grün) in der Epidermis stark mit der Dauer der Plasmabehandlung:

Ohne Plasmabehandlung (Abbildung 20 a) und nach einer Plasmabehandlung von 15 s/cm² (Abbildung 20 b) und 1 min/cm² (Abbildung 20 c) liegen in der Epidermis keine apoptotischen Zellen vor.

Nach einer Plasmabehandlung von 2 min/cm² (Abbildung 20 d) werden erste Apoptosen (gelbe Pfeile) in der Epidermis sichtbar, welche sich jedoch nur oberflächlich im *Stratum granulosum*, direkt an der Grenze zum *Stratum corneum*, befinden.

Nach einer Plasmabehandlung von 5 min/cm² (Abbildung 20 e) erhöht sich die Anzahl apoptotischer Zellen im *Stratum granulosum* (gelbe Pfeile) und die grüne Fluoreszenz der apoptotischen Zellen nimmt zu. Zusätzlich treten erste apoptotische Zellen im Bereich des *Stratum basale* auf (rote Pfeile).

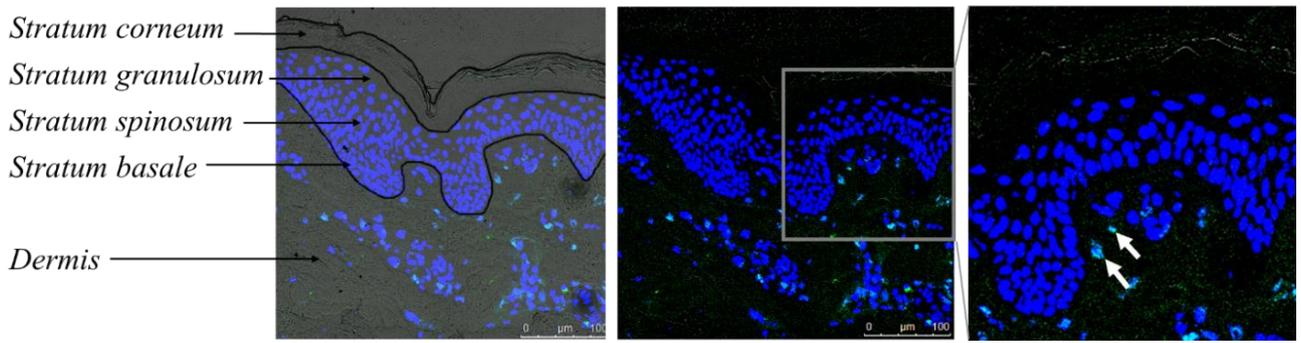


Abbildung 20 a) Haut ohne Plasmabehandlung

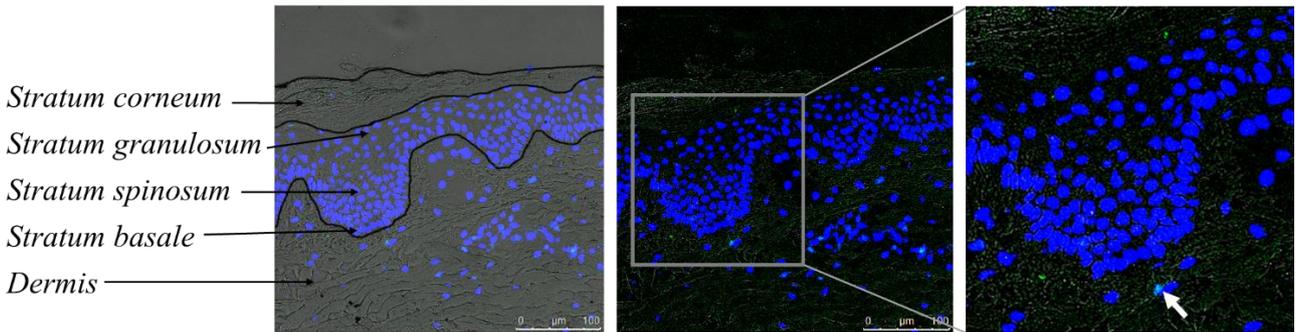


Abbildung 20 b) Haut nach 15 s/cm². Plasmabehandlung

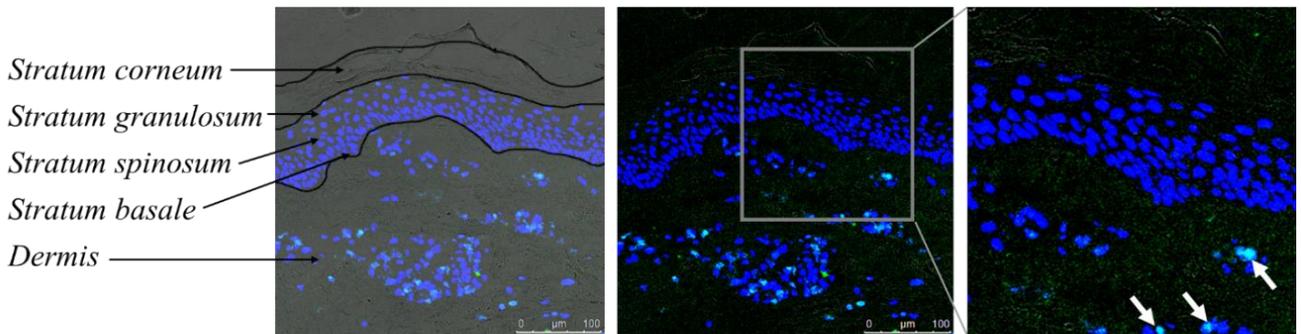


Abbildung 20 c) Haut nach 1 min/cm² Plasmabehandlung

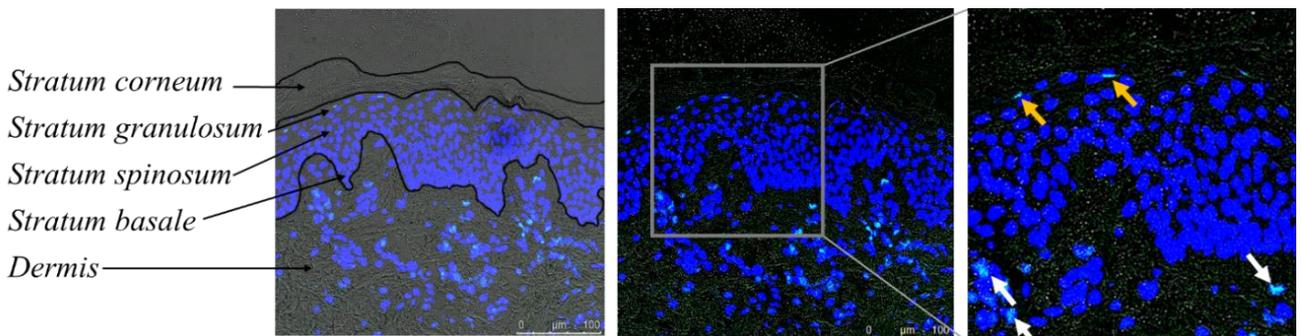


Abbildung 20 d) Haut nach 2 min/cm² Plasmabehandlung

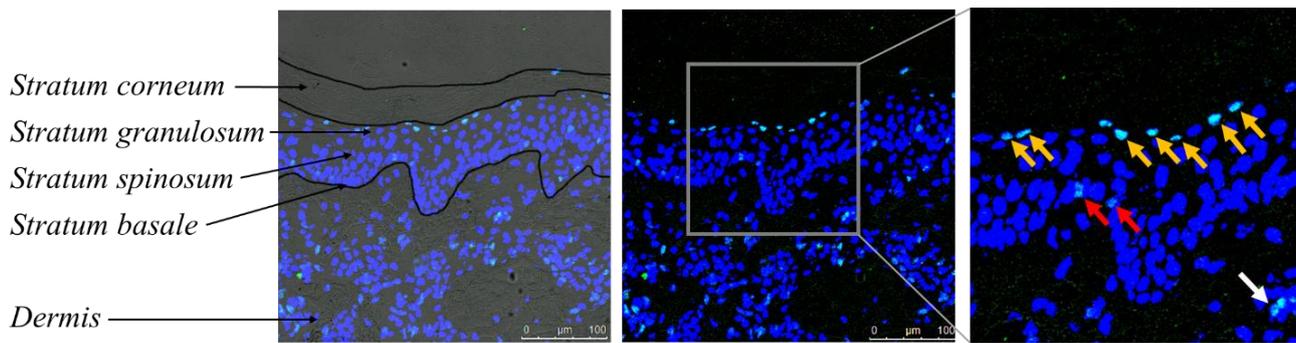


Abbildung 20 e) Haut nach 5 min/cm² Plasmabehandlung

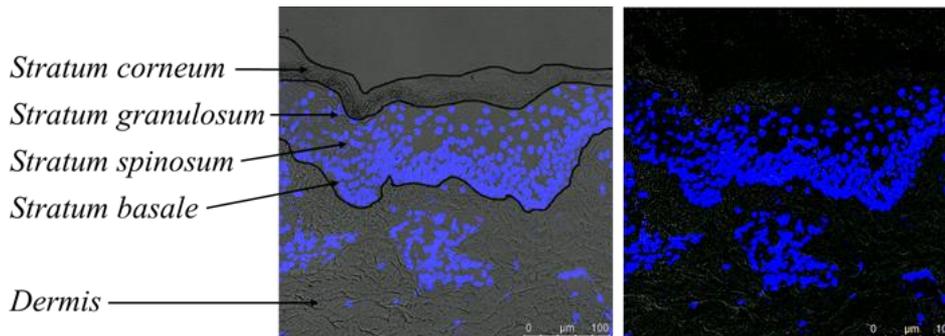


Abbildung 20 f) Negativkontrolle Fluoreszenz Fluorescein

Abbildung 20: TUNEL-Färbung zur Darstellung der apoptotischen Zellen in der Epidermis der Schweihneohrhaut;

Links: unbearbeitete Aufnahmen zur räumlichen Orientierung im Präparat, Mitte: mit GIMP-Software bearbeitete Bilder, Rechts: vergrößerter Ausschnitt des mit GIMP-bearbeiteten Bildes mit markierten wichtigen Strukturen (weißer Pfeil: Apoptose in der Dermis, gelber Pfeil: Apoptose im Stratum granulosum, roter Pfeil: Apoptose im Stratum basale); lebendige Zellkerne blau (DAPI), apoptotische Zellkerne grün (TUNEL),

a) ohne Plasmabehandlung; b) nach 15 s/cm² Plasmabehandlung; c) nach 1 min/cm² Plasmabehandlung; d) nach 2 min/cm² Plasmabehandlung; e) nach 5 min/cm² Plasmabehandlung; f) Negativkontrolle Fluoreszenz Fluorescein

3.3 Viabilität ausgewanderter Zellen

Um die Frische der Haut nach Transport und Weiterverarbeitung exemplarisch zu überprüfen, wurde in diesem Versuch das entnommene und für 48 h bei 37 °C in Medium inkubierte Schweineohr-Gewebe (Kapitel 2.2.4.3.1.) mittels Hellfeldmikroskopie auf ausgewanderte Zellen untersucht (Kapitel 2.2.4.1.3.). Abbildung 21 a) zeigt einen Ausschnitt der inkubierten Biopsie (unten rechts) und die daran angrenzenden aus der Biopsie ausgewanderten Zellen. Die Zellen sind rund und haben einen Durchmesser von 5 bis 9 µm. Sie haften am Boden der Petrischale und sind durch schütteln nicht davon zu lösen. Abbildung 21 b) zeigt das Medium in einem Bereich der Petrischale weiter entfernt von der Biopsie. Die Anzahl der ausgewanderten Zellen ist hier geringer. Auch diese Zellen

sind rund und haften fest am Boden der Petrischale.

Trotz einer Transportzeit von 20 h und dem mechanischen Stress während der Weiterverarbeitung der Ohren handelt es sich bei dem untersuchten Schweineohrgewebe dementsprechend um ein vitales und nicht beschädigtes Gewebe, in welchem die Auswanderung von Zellen noch möglich ist. Es ist daher anzunehmen, dass die Reaktion der Zellen des *ex vivo*-Gewebes auf verschiedene Reize immer noch der Reaktion der Zellen eines *in vivo*-Gewebes ähnelt.

Diese Qualitätskontrolle des Gewebes wurde nur an zwei verschiedenen Bioreplikaten (zwei unabhängig voneinander gelieferten Schweineohren) exemplarisch durchgeführt, um die grundsätzliche Eignung der Proben nach Transport zu prüfen. Quantitative Aussagen sind wegen des zu geringen Stichprobenumfangs hier jedoch nicht sinnvoll ableitbar.

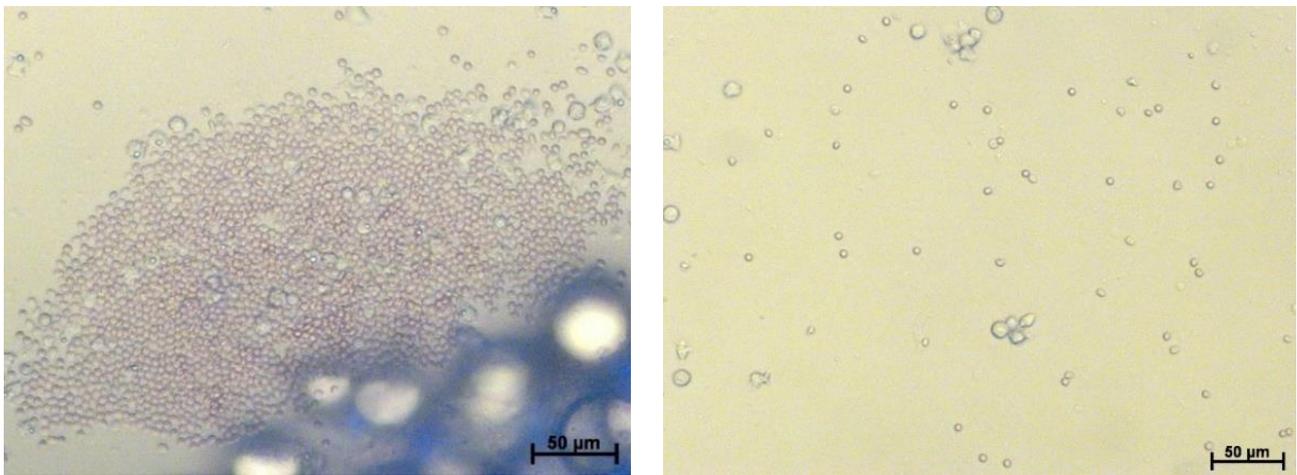


Abbildung 21: Ausgewanderte Zellen aus den Schweineohrbiopsien nach 48 h Inkubationszeit, Aufnahme mit dem Hellfeldmikroskop; inkubierten Biopsie mit auswandernden Zellen (links); ausgewanderte Zellen im Medium verteilt (rechts)

3.4 Curcumin-Penetration

In diesem Versuch wurde der Einfluss der Plasmabehandlung der Haut auf das Penetrationsverhalten eines hydrophoben Stoffes (Curcumin), wie in Kapitel 2.2.4.2.1. erläutert, histologisch untersucht.

Das jeweils linke in Abbildung 22 dargestellte Bild ist eine Übersichtsaufnahme und zeigt einen vertikalen Anschnitt der Haut eines Schweineohrs. Die Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI sichtbar gemacht und blau gefärbt. Deutlich kann man zwischen Epidermis (oben) und Dermis (unten) unterscheiden: In der Dermis befinden sich vorwiegend Kollagenfasern (dicke graue Strukturen) sowie vereinzelte Zellkerne. In der Epidermis befinden sich mehr und dichter bei einander liegende blaue Zellkerne, welche in den unteren Schichten der Epidermis hochprismatisch (*Stratum basale*) und in den weiter oben liegenden Schichten abgeflacht sind (*Stratum granulosum*). An das *Stratum*

granulosum schließt sich das *Stratum corneum* an, welches an mehreren Schichten übereinanderliegender Corneozyten zu erkennen ist. Die Verteilung der vor und nach Plasmabehandlung der Haut aufgetragenen Substanz Curcumin wird durch ihre grüne Fluoreszenz sichtbar. Ohne Plasmabehandlung (Abbildung 22 a) befindet sich das Curcumin nur oberflächlich auf und in den obersten Schichten des *Stratum corneum* und penetriert nicht tiefer hinein (hellgrüne Linie, auf dem *Stratum corneum* aufliegend). Nach vorangegangener Plasmabehandlung 1 min/cm² hingegen penetriert das Curcumin wesentlich tiefer in das *Stratum corneum* hinein (Abbildung 22 b). Auch hier ist die Fluoreszenzintensität des Curcumins in den äußersten Schichten des *Stratum corneum* am höchsten, jedoch kann auch in tieferen *Stratum corneum*-Schichten (bis hin zu den äußersten Schichten des *Stratum granulosum*) eine gesteigerte Curcuminfluoreszenz und damit eine gesteigerte Penetration gemessen werden.

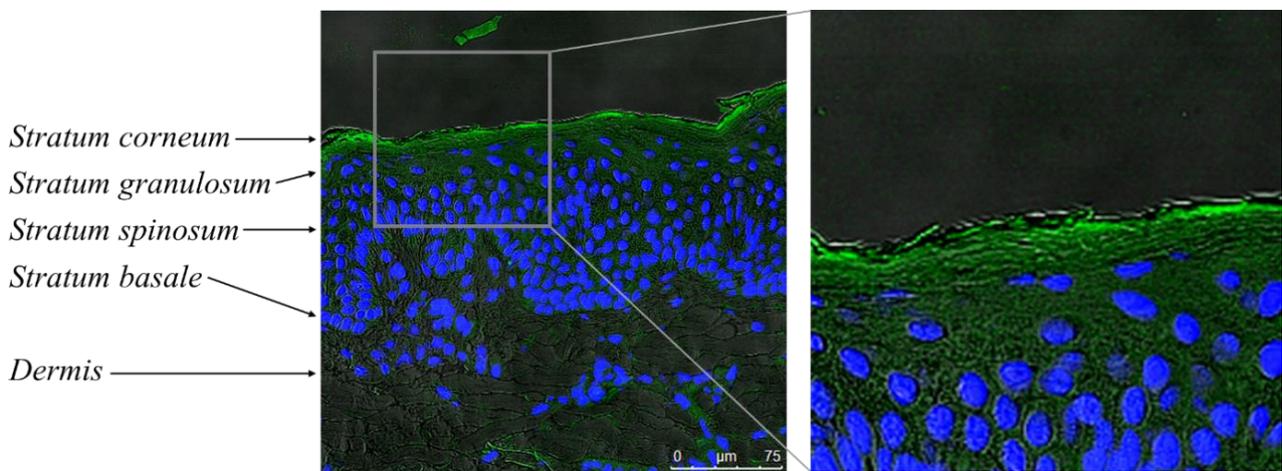


Abbildung 22 a) Ohne Plasmabehandlung

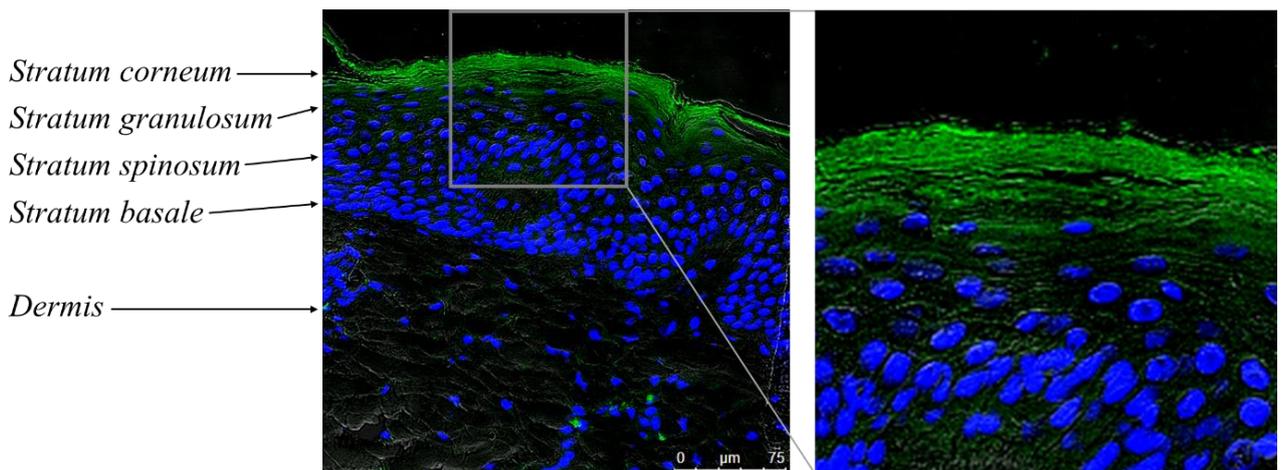


Abbildung 22 b) 1 min/cm² Plasmabehandlung

Abbildung 22: Beispiel-Bilder für Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Schweinehaut mit Curcumin: Curcumin grün, Zellkerne blau,

a) keine Plasmabehandlung, b) 1 min/cm² Plasmabehandlung

Die Fluoreszenzintensität wurde für jeden Behandlungsmodus (mit und ohne Plasma) in 45 Bildern (drei Bioreplikate x drei Bilder pro Bioreplikat x fünf ROI-Messungen pro Bild) entlang der ROI über die Tiefe der Epidermis gemessen. Eine ROI wurde dabei beginnend von der Hautoberfläche jeweils in 165 Messpunkte unterteilt (Kapitel 2.2.4.2.4). Durch die identische äquidistante Aufteilung aller ROI können die Messergebnisse unter Verwendung aller 45 Messwerte je Tiefenpunkt statistisch ausgewertet werden. Diese Auswertung ist jeweils für die Versuche ohne Plasmabehandlung (blau) und nach einer Plasmabehandlung 1 min/cm² (rot) in Abbildung 23 visualisiert. Dargestellt sind für jeden Tiefenpunkt das arithmetische Mittel sowie jeweils die 10. und 90. Perzentile der 45 Messungen.

Es können folgende Effekte beobachtet werden: Ohne Plasmabehandlung ist die Fluoreszenzintensität insgesamt deutlich niedriger als nach Plasmabehandlung. Nach einer sehr hohen initialen Fluoreszenzintensität zu Beginn der Kurve (70 counts, 0 µm bis 1 µm) fällt diese im weiteren Verlauf stark ab und nähert sich ab circa 17 µm einer Fluoreszenzintensität von 0 counts an. Diese hohe initiale Fluoreszenzintensität ist mit dem Verbleiben des Großteils der fluoreszierenden Substanz auf der Oberfläche des *Stratum corneum* zu erklären. Nur ein geringer Teil des Curcumins penetriert in das *Stratum corneum* hinein und ist ohne Plasmabehandlung nur bis zu einer Tiefe von 17 µm nachweisbar (1 µm bis 17 µm).

Nach 1 min Plasmabehandlung ist insgesamt eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität in tieferen Schichten des *Stratum corneum* messbar. Der initiale Fluoreszenzintensitätspeak (wie ohne Plasmabehandlung) ist hier nicht vorhanden und die Fluoreszenzintensität auf der Oberfläche des *Stratum corneum* ist geringer. Die höchste Fluoreszenzintensität liegt im Bereich von 2 µm (49 counts); anschließend fällt die Fluoreszenzintensität mit zunehmender Eindringtiefe in die Epidermis langsam und kontinuierlich ab und nähert sich erst im Bereich 80 µm bis 100 µm dem Nullpunkt (0 counts).

Die neunzigste Perzentile ohne Plasmabehandlung und die zehnte Perzentile nach Plasmabehandlung überlappen sich teilweise, besonders im Bereich 20 µm bis 100 µm (tiefere Schichten der Epidermis, unterhalb des *Stratum corneum*), weshalb die Werte im hinteren Bereich der Grafik weniger aussagekräftig sind.

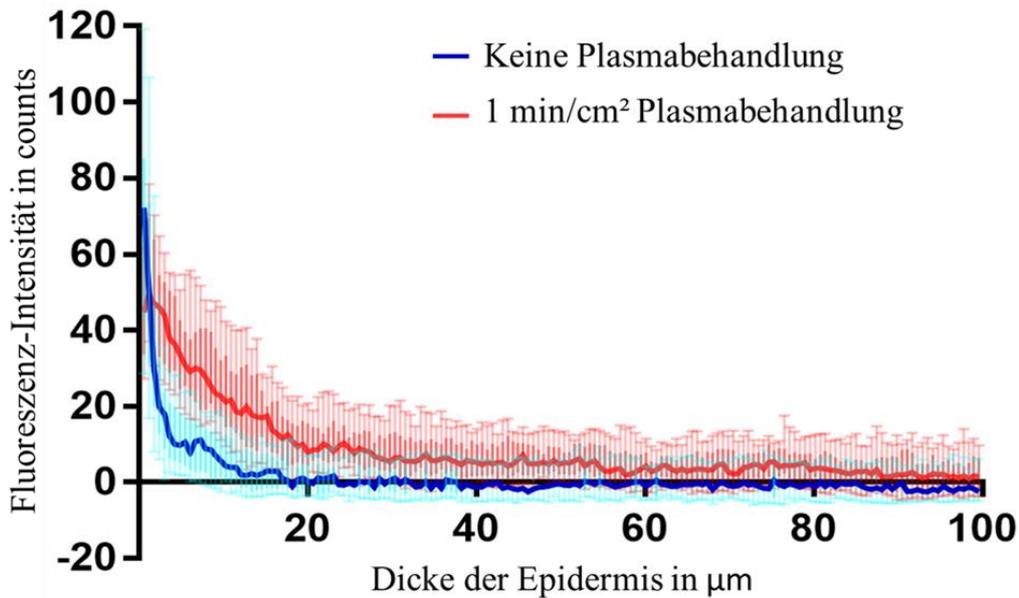


Abbildung 23: Mittelwert der Curcumin-Fluoreszenzintensität in 45 ROI ohne Plasmabehandlung (blau) und nach 1 min/cm² Plasmabehandlung (rot), sowie jeweils die 10. und 90. Perzentile der Messwerte

Da die nach Plasmabehandlung gemessenen 45 ROI nicht durchgehend normalverteilt sind (Shapiro-Wilk-Test implementiert in GraphPad Prism 6) und dementsprechend kein t-Test durchgeführt werden konnte, wurden die 45 ROI ohne und nach Plasmabehandlung mit Hilfe des ungepaarten Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests (Rangsummentest für unabhängige, nicht normal verteilte Daten) mit Hilfe von GraphPad Prism 6 auf signifikante Unterschiede getestet. Im Abstand von 10 µm wurden die 45 ROI pro Probe jeweils exemplarisch an 11 Stellen im Präparat (0 µm, 10 µm, [...], 100 µm) untersucht. Für alle gemessenen Punkte ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Werten vor und nach Plasmabehandlung ($p < 0.05$). Besonders im oberen Bereich der Epidermis (0 µm bis 80 µm) sind die Unterschiede sehr ausgeprägt ($p < 0.001$).

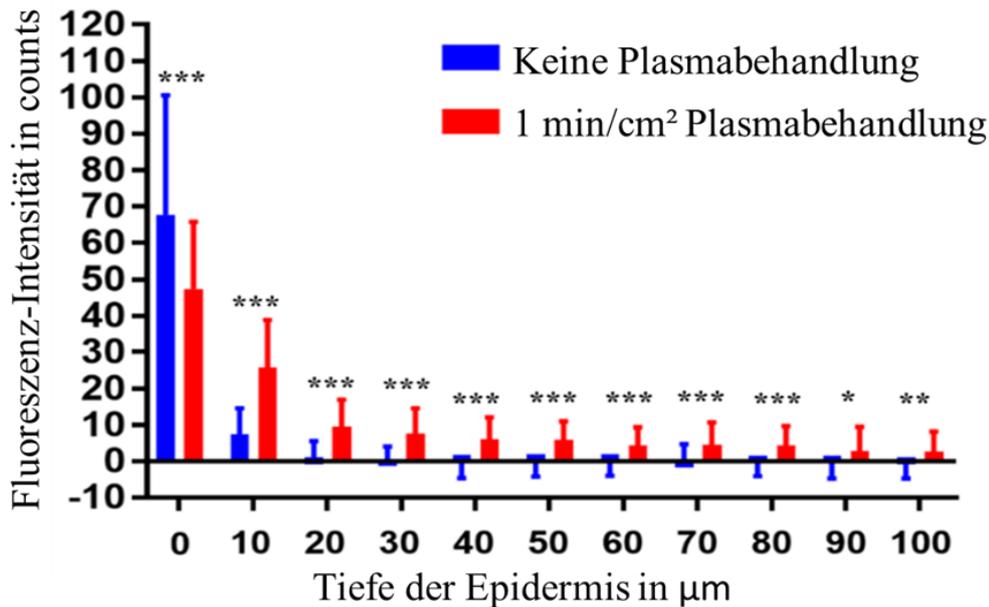


Abbildung 24: Mittelwerte ($n=45$) der Fluoreszenzintensität in der Epidermis vor (blau) und nach 1 min Plasmabehandlung/cm² (rot) mit Standardabweichung (SD) und p -Werten ($*= p < 0,05$; $**= p < 0,01$; $***= p < 0,001$)

Abbildung 25 stellt die Differenz zwischen den Kurven der arithmetischen Mittelwerte vor und nach Plasmabehandlung aus Abbildung 23 dar. Dazu wurden jeweils die Einzelwerte der arithmetischen Mittel der Curcumin-Fluoreszenzintensität ohne Plasmabehandlung von den Einzelwerten der arithmetischen Mittel der Curcumin-Fluoreszenzintensität nach 1 min/cm² Plasmabehandlung für jeden Tiefenpunkt innerhalb der 100 μm subtrahiert.

Besonders im Bereich der ersten 20 μm der Epidermis sind deutliche Unterschiede zwischen diesen Mittelwerten sichtbar. Im Bereich 0 μm bis 1 μm ist auf Grund des an der Oberfläche des *Stratum corneum* abgelagerten und nicht penetrierten Curcumins die Fluoreszenzintensität der unbehandelten Hautprobe stärker (negativer Ausschlag der Kurve). In tieferen Epidermisschichten hingegen übersteigt die Fluoreszenzintensität der plasmabehandelten Hautprobe immer die der unbehandelten Haut, da das Curcumin nach Plasmabehandlung besser in tiefere Schichten der Haut penetrieren konnte.

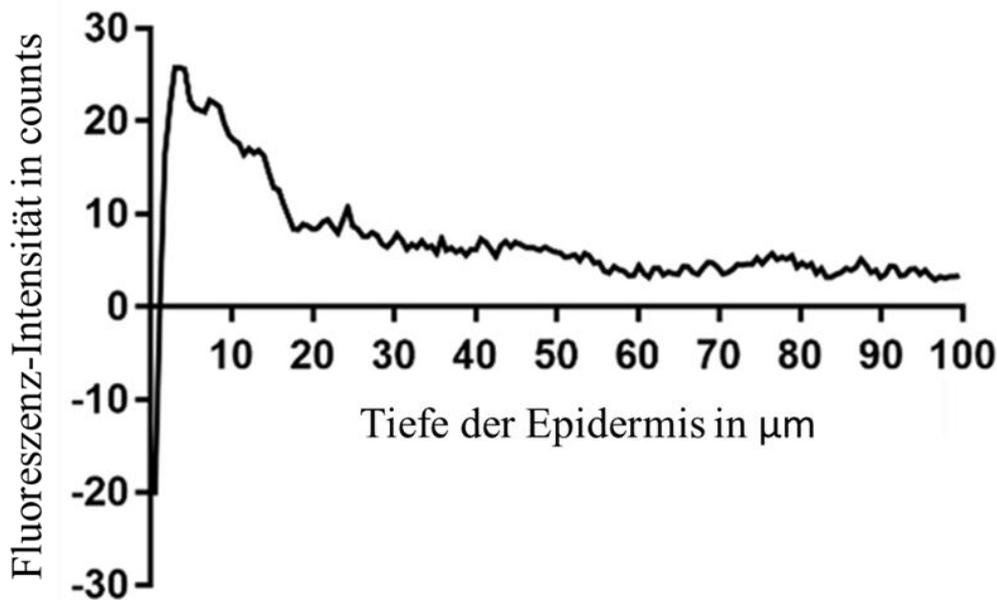


Abbildung 25: Differenz zwischen den Kurven der Mittelwerte vor und nach Plasmabehandlung aus Abbildung 23

Zusätzlich konnte die Penetrationssteigerung im Bereich des *Stratum corneum* (0 μm bis 20 μm) nach Plasmabehandlung berechnet werden. Dafür wurde für jede Mittelwertkurve die Summe aller Einzelwerte berechnet und der Wert nach Plasmabehandlung (insgesamt 517,93 counts im Bereich 0 μm bis 20 μm in 45 Messungen) durch den Wert ohne Plasmabehandlung (insgesamt 200,74 counts im Bereich 0 μm bis 20 μm in 45 Messungen) geteilt ($517,93 / 200,74 = 2,58$). Dies entspricht einer Penetrationssteigerung des Curcumins nach Plasmabehandlung im *Stratum corneum* um den Faktor 2,58 beziehungsweise um 158 %.

3.5 Ibuprofen-Penetration

Mit Hilfe der *Tape stripping*-Methode und HPLC/ MS wurde (wie in Kapitel 2.2.5. beschrieben) der Einfluss der Plasmabehandlung der Haut auf die Penetrationseigenschaften des Stoffes Ibuprofen untersucht. Mit Hilfe von 20 mal *Tape stripping* auf der selben Position konnten das *Stratum corneum* sowie das applizierte Ibuprofen in dem untersuchten Hautbereich vollständig von der Haut entfernt werden. 20 mal *Tape stripping* entfernen demnach ungefähr eine Schichtdicke der Haut von 20 μg (entspricht der Dicke des *Stratum corneum* von Schweineohrhaut).

Die Versuche wurden an drei unabhängigen Bioreplikaten durchgeführt, um den Einfluss von intra- und interindividuellen Unterschieden der Schweineohren auszugleichen. In Abbildung 26 ist das arithmetische Mittel der extrahierten Ibuprofenmenge (in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) der drei gemessenen Bioreplikate ohne Plasmabehandlung und nach 1 min/cm^2 Plasmabehandlung mit Standardabweichungen in den verschiedenen *Stratum-corneum*-Schichten dargestellt.

Eine Schicht entspricht der Eindringtiefe eines *Tape strips*, wobei nicht für jedes entnommene *Tape strip* die extrahierte Ibuprofenmenge bestimmt werden konnte, da zu lange Wartezeiten der einzelnen Proben vor der Messung (auf Grund des fortschreitenden Ibuprofenzerfalls in der Lösung) ungenauere Ergebnisse lieferten. Aus diesem Grund wurden nur Schicht 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13, 16 und 19 untersucht (nur 11 Messpunkte für 20 Schichten).

In beiden Fällen befindet sich in den höheren Schichten des *Stratum corneum* eine größere Ibuprofenmenge (Schicht 1: 6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ bis 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), welche bis Schicht fünf schnell abnimmt (Schicht 5: 1,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ bis 2,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) und dann in den tieferen *Stratum corneum*-Schichten langsam gegen 0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ geht. Die extrahierte Ibuprofenmenge ist nach Plasmabehandlung besonders in den oberen *Stratum corneum*-Schichten wesentlich größer als ohne Plasmabehandlung. Es penetriert also nach Plasmabehandlung eine größere Menge an Ibuprofen in tiefere Schichten des *Stratum corneum*.

Da die Daten nicht alle normalverteilt waren (Sharpio-Wilk-Tests impliziert in GraphPad Prism 6), wurde zur Auswertung der Daten für jede Schicht ein ungepaarter Mann-Withney-Test (GraphPad Prism 6) durchgeführt. Für Schicht 1 bis 13 sowie für Schicht 19 ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der Menge des extrahierten Ibuprofens vor und nach der Plasmabehandlung ($p < 0.01$). Für Schicht 16 konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

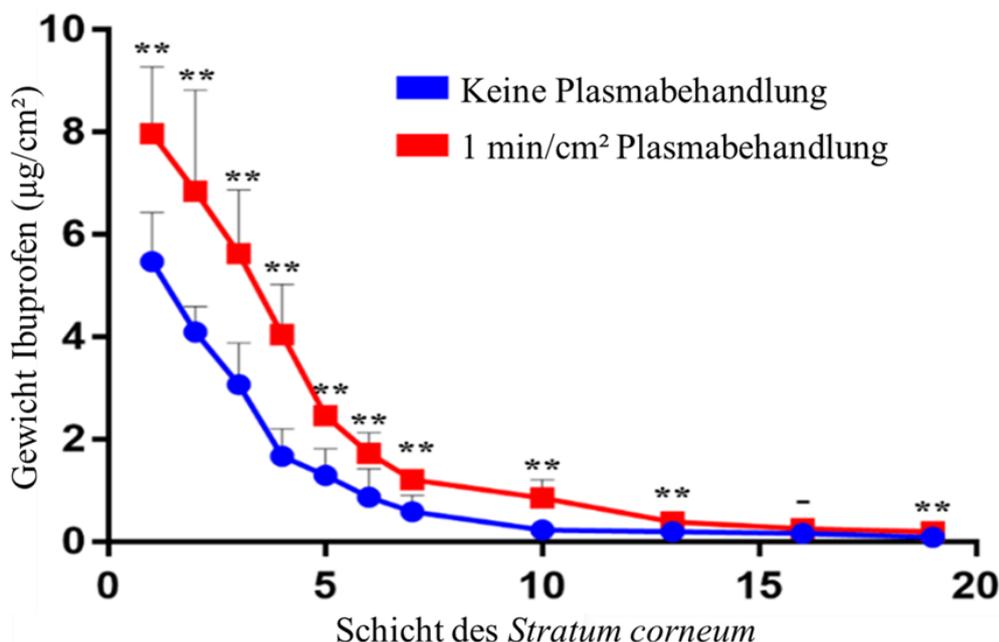


Abbildung 26: Mittelwert ($n = 3$) der extrahierten Ibuprofenmenge der drei Bioreplikate in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pro Schicht ohne Plasmabehandlung (blaue Kreise) und nach 1 min/cm² Plasmabehandlung (rote Kästen) mit technischen Replikaten (jeweils ein technisches Replikat pro Bioreplikat), Standardabweichung (schwarze Linie); 1 min/cm² Plasmabehandlung mit kINPen, Argon-Gasfluss 3 slm, 9 mm Abstand; 1 h Penetrationszeit, Extraktionsprotokoll siehe Kapitel 2.2.5.3., Messung mittels HPLC/MS

Abbildung 27 stellt die Differenz zwischen den Kurven der arithmetischen Mittelwerte der Ibuprofenmenge in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Haut pro Schicht extrahierten *Stratum corneums* ohne und nach Plasmabehandlung aus Abbildung 26 dar. Dazu wurden für jedes gemessene *Tape strip* jeweils die Einzelwerte der arithmetischen Mittel der Ibuprofengewichte ohne Plasmabehandlung von den Einzelwerten der arithmetischen Mittel der Ibuprofengewichte nach 1 min/ cm^2 Plasmabehandlung subtrahiert.

In allen Schichten übersteigt die nach Plasmabehandlung extrahierte Ibuprofenmenge die ohne Plasmabehandlung extrahierte Ibuprofenmenge. Besonders in den oberen *Stratum corneum*-Schichten ist dieser Effekt sehr stark ausgeprägt (Schicht 1 bis 5). In tieferen *Stratum corneum*-Schichten (Schicht 6 bis 19) sinkt die Gesamtmenge des penetrierten Ibuprofens, sowohl in den Proben ohne, als auch in den Proben nach Plasmabehandlung und auch die Differenz der penetrierten Ibuprofenmenge nimmt in tieferen *Stratum corneum*-Schichten ab.

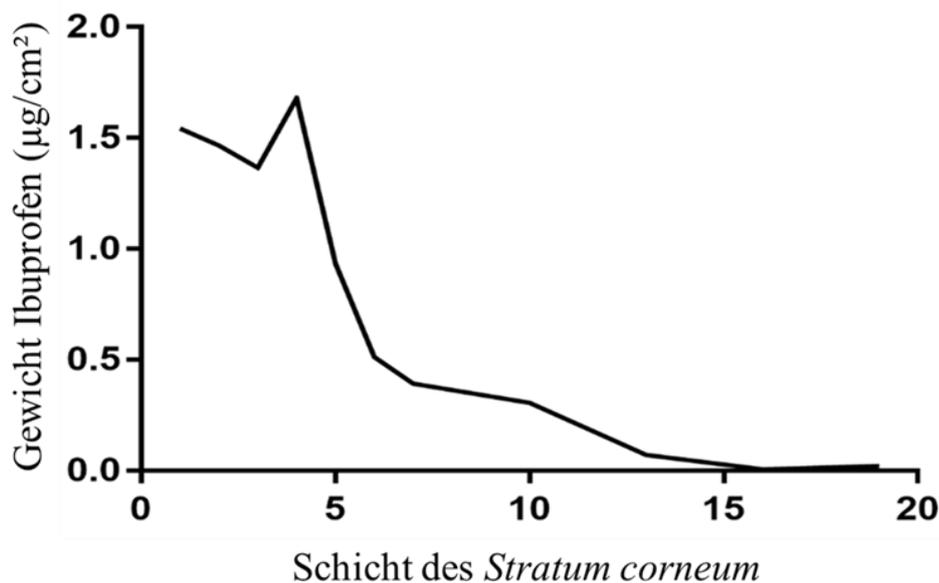


Abbildung 27: Differenz zwischen den Kurven der Mittelwerte der 3 Bioreplikate des extrahierten Ibuprofens (in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) vor und nach Plasmabehandlung abhängig von der Tiefe der Haut aus Abbildung 26

Um das Ausmaß der Penetrationssteigerung des Ibuprofens nach Plasmabehandlung berechnen zu können, wurde das Gewicht des (insgesamt in allen gemessenen Schichten der Haut) penetrierten Ibuprofens bestimmt, indem die in den jeweiligen Schichten massenspektrometrisch ermittelten Ibuprofengewichte für jeden Behandlungsmodus addiert wurden. Das absolute in die Haut penetrierte Ibuprofengewicht betrug ohne Plasmabehandlung $20,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und nach Plasmabehandlung $28,56 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Auf 1 cm^2 Haut wurden in jedem Experiment insgesamt $625 \mu\text{g}$ Ibuprofengel appliziert ($12,5 \text{ mg}/\text{cm}^2$)

x 5 % Ibuprofen = insgesamt 625 μg appliziertes Ibuprofen pro cm^2). Ohne Plasmabehandlung penetrierte demnach ein Anteil von 3,20 % (20,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Gewicht penetriertes Ibuprofen ohne Plasmabehandlung) / 625 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Gewicht appliziertes Ibuprofen gesamt) = 0,032 = 3,2 %) und nach Plasmabehandlung ein Anteil von 4,56 % (28,56 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Gewicht penetriertes Ibuprofen nach Plasmabehandlung) / 625 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Gewicht appliziertes Ibuprofen gesamt) = 0,0456 = 4,56 %) Ibuprofen in das *Stratum corneum*. Dies entspricht einer durch eine Plasmabehandlung der Haut hervorgerufenen Penetrationssteigerung von 40,93 %.

3.6 Lipidomics-Ergebnisse

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Arbeiten wurden in Kooperation mit Johanna Striesow, Doktorandin am INP, durchgeführt. Dabei lag der Schwerpunkt der eigenen Arbeit auf der Durchführung der Plasmabehandlung der Schweineohren, dem *Tape stripping* und der Lipidextraktion. Die Messungen mittels UHPLC-MS/MS wurden von Johanna Striesow durchgeführt.

Mit Hilfe der *Tape stripping*-Methode und UHPLC/ MS wurde (wie in Kapitel 2.2.5. beschrieben) der Einfluss der Plasmabehandlung der Haut auf die Zusammensetzung und die Struktur der Hautlipide untersucht. Mit Hilfe von 20 mal *Tape stripping* auf derselben Position konnten das *Stratum corneum* und die darin enthaltenen Lipide in dem untersuchten Hautbereich vollständig von der Haut entfernt und anschließend vom Corneofix extrahiert werden. Die extrahierten Lipide von drei zusammenliegenden Schichten (zum Beispiel Schicht eins, zwei und drei) wurden jeweils gemeinsam gemessen, da Vorversuche zeigten, dass die Abundanz (Häufigkeit des Vorkommens) vieler Lipide (ausgedrückt in Peak Areas) einer einzigen Schicht zu niedrig war, um sie zu detektieren. Als Messwerte lagen der UHPLC/MS die Massen der unterschiedlichen von den *Tape strips* extrahierten Lipide vor. Die einzelnen Lipide sind im Chromatogramm als Massen- und MSMS-Spektren (Fragmentierung der Masse) nachverfolgbar. Die Rohdaten wurden anhand einer implementierten Datenbank abgeglichen (Abgleichen der Massen- und MSMS-Spektren) und gefiltert (Entfernung von Duplikaten und Fokussierung auf die abundantesten Lipidgruppen). Anschließend wurden die Datensätze mit Hilfe der Software R statistisch ausgewertet und in Diagrammen geplottet.

In einem ersten Schritt wurde mit Hilfe der Software LipidSearch das Gesamt-Lipidom der Haut untersucht, um im zweiten Schritt einzelne Lipidklassen (Ceramide, Hexosylceramide, Triacylglycerole und Diacylglycerole) und im dritten Schritt deren Oxidationsprodukte (speziell: Oxidationsprodukte der Triacylglycerole) vor und nach Plasmabehandlung zu identifizieren.

Einen Gesamteindruck über die Beschaffenheit des Gesamt-Lipidoms der Haut vor und nach Plasmabehandlung vermittelt das Venn-Diagramm in Abbildung 28. Hier wurde die Anzahl der vor und nach Plasmabehandlung in allen 20 Schichten des *Stratum corneum* identifizierten Lipidspezies dargestellt. Insgesamt konnten in allen behandelten Proben 1703 verschiedene Lipide identifiziert werden. Davon wurden 835 Lipide erkannt, welche in allen Konditionen (ohne Plasmabehandlung und nach 15 s/cm² Plasmabehandlung sowie nach 1 min/cm² Plasmabehandlung) dokumentiert wurden, aber auch Lipide, welche nur in den Proben ohne Plasmabehandlung (240 Lipide) und nach 15 s/cm² Plasmabehandlung (127 Lipide), sowie nach 1 min/cm² Plasmabehandlung (195 Lipide) detektiert wurden. Zusätzlich wurden 103 Lipidspezies detektiert, welche nur nach einer Plasmabehandlung (15 s/cm² oder 1 min/cm²), nicht aber in den Kontrollproben (ohne Plasmabehandlung) identifiziert werden konnten.

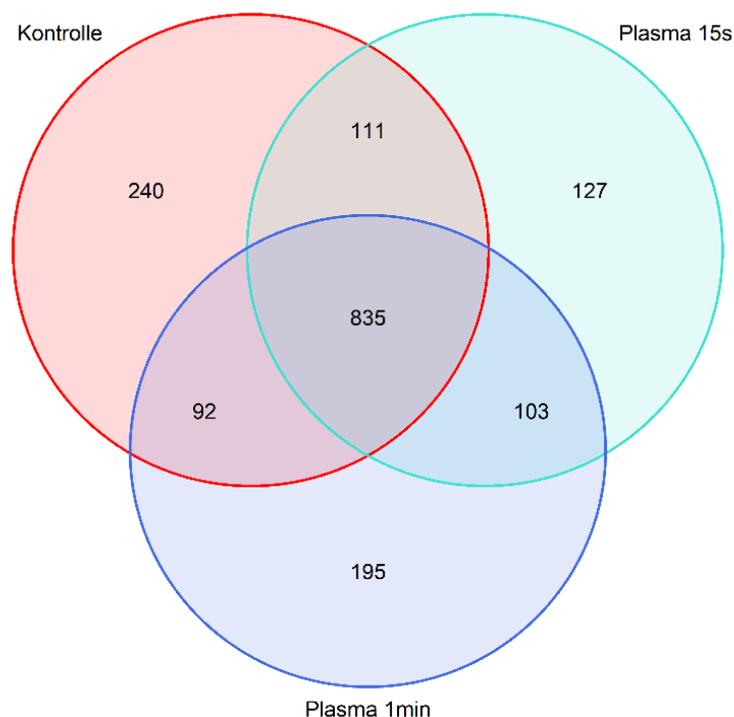


Abbildung 28: Anzahl der mittels LipidSearch identifizierten Lipidspezies in 20 Schichten des unbehandelten und mit Plasma behandelten *Stratum corneum*. Das Venn Diagramm wurde von Johanna Striesow in R erstellt.

Im zweiten Schritt wurde gezielt der Anteil der einzelnen Lipidklassen (Triacylglycerole, Ceramide, Hexosylceramide und Diacylglycerole) in den verschiedenen Schichten des *Stratum corneum* analysiert. Der Anteil der jeweiligen Lipidklasse an der Gesamtabundanz aller Lipide der jeweiligen Probe wurde berechnet, indem die mit Hilfe der LipidSearch-Software detektierten Peak Areas der

jeweiligen Lipide einer Klasse addiert und anschließend durch die Peak Areas aller Lipide (Gesamtabundanz) dividiert wurden.

Abbildung 29 stellt diesen relativen Anteil der verschiedenen Lipidklassen in allen gemessenen *Stratum corneum*-Schichten (1-3, 4-6, 7-9, 10-12, 13-15, 16-18, 19-20) vor und nach Plasmabehandlung dar. Bei den am häufigsten identifizierten Lipidklassen handelt es sich in absteigender Reihenfolge um Ceramide, Triacylglycerole, Hexosylceramide und Diacylglycerole. Alle zusätzlich identifizierten Lipidklassen werden unter der Bezeichnung „Andere“ zusammengefasst.

Mit zunehmender Schichttiefe ist in der Kontrollprobe (*Stratum corneum*-Lipide ohne Plasmabehandlung) eine Abundanzabnahme der Triacylglycerole (Ausnahme: Schicht 13-15, 19-20), Hexosylceramide und Diacylglycerole, sowie eine Abundanzzunahme der Ceramide (Ausnahme: Schicht 19-20) erkennbar. Beim Vergleich der identifizierten Lipidklassen vor und nach Plasmabehandlung ist besonders eine geringere Abundanz der Triacylglycerole sowohl nach 15 s/cm² als auch nach 1 min/cm² Plasmabehandlung in allen Schichten auffällig. Im Gegensatz dazu konnte ein relativer Anstieg der Ceramid-Abundanz nach Plasmabehandlung im Vergleich zu Ceramid-Abundanz ohne Plasmabehandlung dokumentiert werden. Die Abundanz der Hexosylceramide folgte nach Plasmabehandlung im Verhältnis zur Abundanz der Ceramide keiner eindeutigen Tendenz: so wiesen sie beispielsweise nach einer Plasmabehandlung von 15 s/cm² in Schicht 4-9 eine relative Abundanzzunahme, in Schicht 10-12 eine relative Abundanzabnahme, in Schicht 13-18 wieder eine relative Abundanzzunahme und in Schicht 19-20 wieder eine relative Abundanzabnahme auf. Die Diacylglycerole als vierthäufigste identifizierte Lipidklasse wurden vor und nach Plasmabehandlung in allen Schichten in nahezu gleichbleibender Abundanz detektiert.

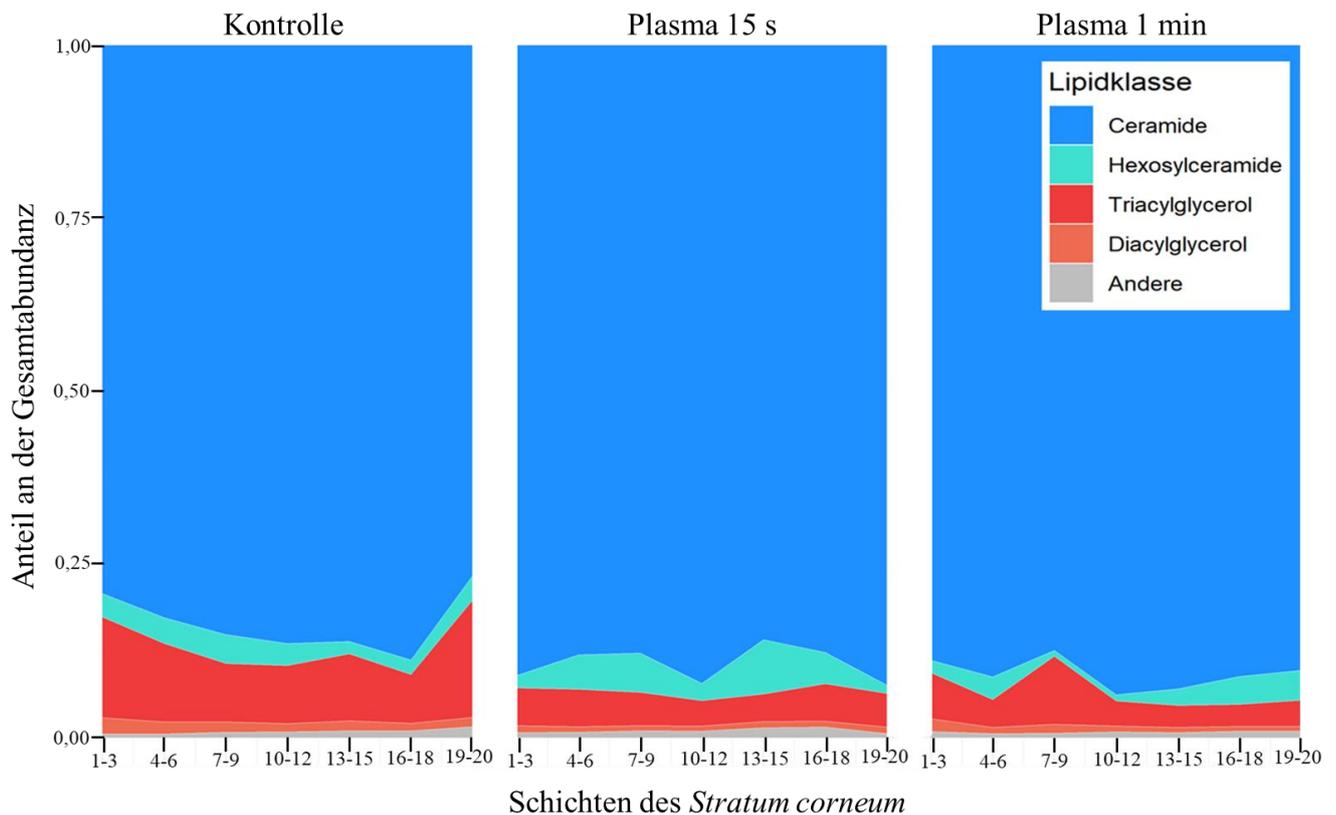


Abbildung 29: Lipidabundanz-Profil der unterschiedlichen Schichten des unbehandelten Stratum corneum und unter Einfluss einer Plasmabehandlung für 15 s/cm² und 1 min/cm². Das Diagramm wurde von Johanna Striesow erstellt.

Im dritten Schritt folgte die Analyse der Oxidationsprodukte (speziell: Oxidationsprodukte der Triacylglycerole) vor und nach Plasmabehandlung. Diese Untersuchung wurde durchgeführt, da hinter dem beobachteten Abfall der Triacylglycerol-Abundanz nach der Plasmabehandlung eine Lipidperoxidation und damit eine veränderte Struktur der Triacylglycerole vermutet wurde. Diesbezüglich wurde mit Hilfe der LipidSearch-Software gezielt in allen Proben und Stratum corneum-Schichten nach Triacylglycerol-Oxidationsprodukten gesucht. Abbildung 30 stellt die für jede Schicht aufsummierten Peak Areas der Triacylglycerol-Oxidationsprodukte nach unterschiedlichen Plasmabehandlungszeiten dar. Triacylglycerol-Oxidationsprodukte konnten sowohl ohne als auch nach Plasmabehandlung identifiziert werden, wobei in den äußeren Stratum corneum-Schichten (Schicht 1-6) nach einer Plasmabehandlung von 1 min/cm² eine geringfügig höhere Abundanz von Oxidationsprodukten festgestellt wurde. In den tieferen Schichten des Stratum corneum nahm die Abundanz wieder ab und ab Schicht 7 wurde sogar eine geringere Abundanz der Oxidationsprodukte als ohne Plasmabehandlung detektiert. Eine Plasmabehandlung für 15 s/cm² führte zu keiner signifikant gesteigerten Lipidoxidation im Vergleich zu vor der Plasmabehandlung. Es wurde auch nach Ceramid-Oxidationsprodukten gesucht, jedoch konnte in dieser Lipidklasse keine signifikante Abundanzveränderungen der Oxidationsprodukte festgestellt werden.

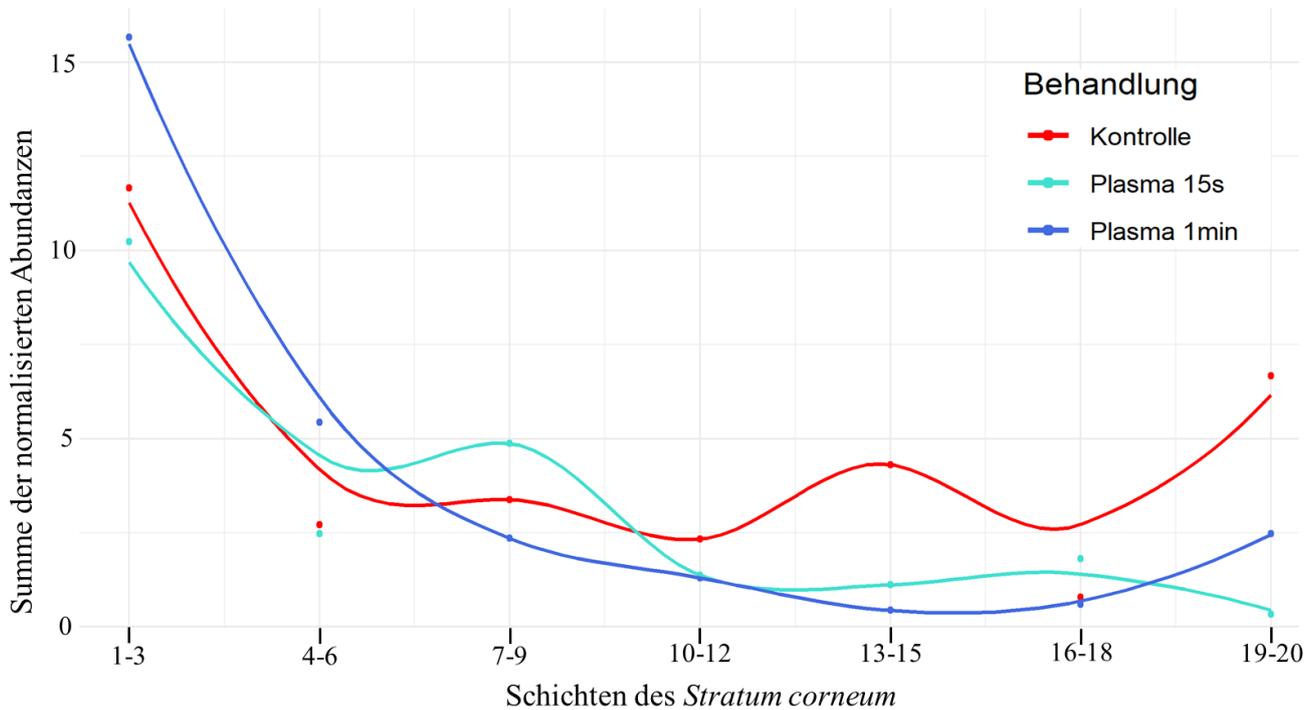


Abbildung 30: Abundanzen der identifizierten Triacylglycerol-Oxidationsprodukte in den jeweiligen Schichten des Stratum corneum. Das Diagramm wurde von Johanna Striesow erstellt.

Zusätzlich zur Analyse der extrahierten Lipide wurde das entnommene *Stratum corneum* pro Schicht der unbehandelten Haut, nach einer einminütigen Gasflussbehandlung und nach einer einminütigen Plasmabehandlung gewogen. Anhand von Abbildung 31 wird deutlich, dass im Rahmen der Plasmabehandlung besonders in den oberen Schichten des *stratum corneum* (Schicht 1-8) mittels *Tape stripping* deutlich mehr Material gewonnen wurde, als von der unbehandelten Haut. Nach einer einminütigen Gasflussbehandlung konnte zwar ebenfalls in den oberen 4 Schichten mehr Material entnommen werden als von der unbehandelten Haut, jedoch handelt es sich dabei um eine wesentlich kleinere Differenz als nach Plasmabehandlung. Ab Schicht 8 des *Stratum corneum* gleichen sich die Massen des entnommenen Materials einander an und weisen keine signifikanten Unterschiede mehr auf.

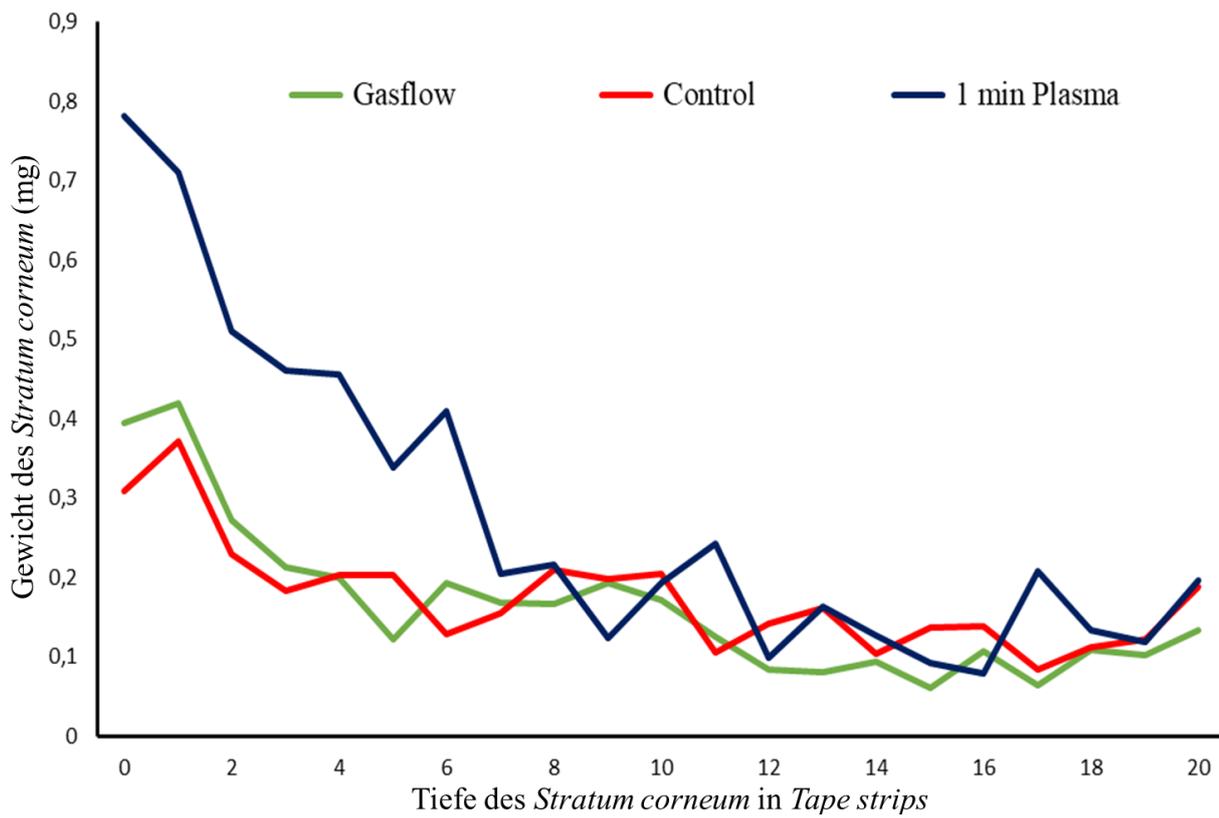


Abbildung 31: Gewicht des entnommenen Stratum corneum pro Tape strip für unbehandelte Haut (Control), nach 1 min/cm² Gasflussbehandlung (Argongas) und nach 1 min/cm² Plasmabehandlung

4 Diskussion

Vor allem im Bereich der Dermatologie hat die Anwendung von kaltem Atmosphärendruckplasma (CAP) in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Besonders bei der Behandlung chronischer Wunden konnten wundheilungsfördernde Plasmaeigenschaften nachgewiesen werden und auch die Interaktion von Plasma mit gesunder Haut ist Bestandteil der aktuellen Forschung. In der hier vorliegenden Arbeit wurde anhand eines Schweineohrmodells der Einfluss der Plasmabehandlung auf die gesunde Haut und auf das Penetrationsverhalten von Arzneistoffen mit Fokus auf das *Stratum corneum* qualitativ und quantitativ untersucht.

Um bereits veröffentlichte Untersuchungen zur Penetrationsveränderung nach Plasmabehandlung widerlegen oder bestätigen zu können, wurden zunächst eigene histologische Versuche durchgeführt und durch die Wahl anderer Untersuchungsmethoden (Fluoreszenzmikroskopie) und Substanzen (Curcumin, Ibuprofen) zu ergänzt.

Aufbauend auf den histologischen Ergebnissen wurde die plasma-vermittelte Penetration von Ibuprofen in die Haut mittels HPLC und MS untersucht und quantifiziert. Um die zu Grunde liegenden Mechanismen hinter der Penetrationsveränderung nach Plasmabehandlung besser verstehen und erklären zu können, wurden anschließend Hautlipide vor und nach Plasmabehandlung extrahiert und ebenfalls massenspektrometrisch untersucht (Lipidomics).

4.1 Morphologische Veränderungen des *Stratum corneum* nach Plasmabehandlung

Im Rahmen der vorliegenden Experimente konnten keine makroskopischen, durch die Plasmabehandlung induzierten Veränderungen oder Schäden der behandelten Haut beobachtet werden.

Abhängig von der Plasmabehandlungszeit konnten jedoch mikroskopisch unterschiedliche morphologische CAP-Effekte auf die untersuchten Hautbiopsien festgestellt werden:

Nach einer Behandlungszeit von 15 s/cm² waren histologisch noch keine Veränderungen der Struktur des *Stratum corneum* der behandelten Schweinehautbiopsie im Vergleich zum unbehandelten Gewebe nachweisbar. Nach einer einminütigen Plasmabehandlung pro cm² konnte hingegen mit Hilfe von zwei verschiedenen histologischen Färbungen (HE-Färbung, Sudanschwarz B-Färbung) ein auflockernder Effekt der Plasmabehandlung auf das *Stratum corneum* deutlich nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.1.1. und Kapitel 3.1.2.). Bei den in diesem Experiment gewählten Behandlungszeiten (bis 1 min/cm²) waren nur Veränderungen der morphologischen Struktur des *Stratum corneum* sichtbar. Darunterliegende Hautschichten wurden durch die Plasmabehandlung nicht beeinflusst.

Es existieren bereits einige Studien zur Wirkung von kaltem Atmosphärendruckplasma auf intakte Haut, welche an verschiedenen Hautproben, mit unterschiedlichen Plasmaquellen, Gasflussraten, Behandlungszeiten und Abständen zum behandelten Hautareal durchgeführt wurden.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse nach einer fünfzehnekündigen Plasmabehandlungszeit bestätigen die Ergebnisse von van der Linde *et al.* [29]. Diese verwendeten den kINPen Med und untersuchten die Wirkung von kaltem Atmosphärendruckplasma mit einem Abstand von 0,5 cm auf murine Haut *in vivo*. Sie wählten eine kurze Behandlungszeit von 25 s und beobachteten (wie in der vorliegenden Arbeit) keine histologischen Veränderungen.

Auch Vandersee *et al.* verwendeten den kINPen MED und behandelten *ex vivo* Schweineohrhaut für 2 s mit CAP (Abstand 1 cm zur Hautoberfläche) und beobachteten mittels Hellfeldmikroskopie ebenfalls keine Veränderung der Schweineohrhaut. Allerdings beobachteten sie mittels der wesentlich höher auflösenden Technik der Laser Scanning Mikroskopie eine Auflockerung des *Stratum corneum* bereits nach dieser kurzen Plasmabehandlungszeit [76].

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach einer einminütigen Plasmabehandlung (kINPen 09, 1 min, 1 cm Abstand zur Hautoberfläche) erlangten Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den von Hasse *et al.* erlangten Ergebnissen [67]. Sie beobachteten nach der Plasmabehandlung humaner Haut (kINPen MED, 1 min, 1 cm Abstand zur Hautoberfläche) mittels Hellfeldmikroskopie keine morphologischen Veränderungen der Haut. Für diese unterschiedlichen Ergebnisse trotz des ähnlichen Versuchsaufbaus gibt es zwei mögliche Erklärungen: Im Gegensatz zu den Experimenten in der vorliegenden Arbeit wurden die Hautproben von Hasse *et al.* nicht direkt nach der Plasmabehandlung mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren, sondern die Biopsien mit den noch lebendigen Zellen (Proliferation und Apoptose noch möglich) weitere 24 h in ein Medium eingebettet und erst im Anschluss eingefroren. Dies könnte eventuell zu einer Regeneration der oberen *Stratum corneum*-Schichten nach der Plasmabehandlung geführt haben, welche im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit (auf Grund der kurzen Zeitspanne bis zum Einfrieren) nicht möglich war. Die unterschiedlichen Ergebnisse im Bereich der Hellfeldmikroskopie im Rahmen dieses Projektes im Vergleich zu Hasse *et al.* könnten auch zum Teil mit der Wahl der Plasmaquelle (kINPen 09 statt kINPen Med) und der damit verbundenen leicht unterschiedlichen Plasmazusammensetzung und Temperatur zu erklären sein. Der kINPen 09 kann bei gleicher Behandlungszeit etwas stärkere Effekte hervorrufen als der kINPen Med [56], wodurch Hasse *et al.* möglicherweise keine Veränderung mittels Hellfeldmikroskopie beobachteten, welche im Rahmen dieses Projektes jedoch festgestellt werden konnten.

Auch von Woedtke *et al.* stellten eine leicht veränderte Morphologie plasmabehandelter Haut (kINPen MED, 10 min) fest [77]. Sie beobachteten eine glattere, homogenere Beschaffenheit, sowie

eine leichte Abnahme der Dicke der Epidermis. Trotz der verhältnismäßig langen Plasmabehandlungszeit der Haut beobachteten sie, wie auch in diesem Projekt, keinen sichtbaren Hautschaden und keine Verbrennungen.

Im Gegensatz zu den mit dem kINPen durchgeführten Experimenten führte die Verwendung anderer Plasmaquellen zu stärkeren bis hin zu schädlichen Hautreaktionen. Dobrynin *et al.* untersuchten den Effekt von DBD- und *Pin-to-Hole Spark Discharge* (PHD)-Plasmaquellen (0,5 cm bis 1,5 cm Abstand zur Haut) an Schweinehaut *in vivo* und beobachteten dosis- und frequenzabhängige Hautveränderungen nach Behandlungszeiten von unter einer Minute bis hin zu leichten Verbrennungen nach 3 min [78]. Kos *et al.* untersuchten die Wirkung eines APPJs auf Mäusehaut *in vivo* und beobachteten einen klaren Zusammenhang zwischen der Ausprägung der entstehenden Hautläsion und der Dauer, sowie der Gasflussrate der Plasmabehandlung [79]. Trotz eines verhältnismäßig weiten Abstands der Jet-Öffnung bis zur Haut (2 cm) führte die Plasmabehandlung bereits ab 30 s zu leichten und ab 4 min zu schweren Hautläsionen und Verbrennungen. Sowohl Dobrynin *et al.* als auch Kos *et al.* führten im Gegensatz zur bewegten Plasmabehandlung der Haut in der vorliegenden Arbeit (Zeitangaben der Plasmabehandlung pro cm² Fläche) eine punktuelle Plasmabehandlung der Haut durch, was zum Teil die von ihnen beobachteten stärkeren Plasmaeffekte erklären könnte.

Als Ursache für die strukturelle Veränderung des *Stratum corneum* nach einer längeren Plasmabehandlung existieren verschiedene Theorien. Vandersee *et al.* begründeten die Auflockerung des *Stratum corneum* nach Plasmabehandlung mit einer Positionsveränderung der Corneozyten. So lösen sich diese durch die Plasmabehandlung aus ihrer horizontalen Lipid-Verankerung und stellen sich teilweise vertikal zur Hautoberfläche auf [76]. Dobrynin *et al.* erklärten ihre Beobachtungen hingegen über Temperaturerhöhung der Haut im Rahmen der Plasmabehandlung mit steigender Gasflussrate [78]. Kos *et al.* begründeten ihre Ergebnisse ebenfalls mit der Temperaturveränderung, sowie mit der direkten und indirekten Wirkung von RONS auf das Gewebe (Gasflussrate proportional zur RONS-Bildung, RONS-Bildung proportional zum Ausmaß der Hautläsion). Über welche Reaktionen die RONS die Gewebeveränderungen innerhalb der Haut hervorrufen, wurde nicht näher untersucht [79].

Auf Grund der im Rahmen dieser Arbeit erlangten Beobachtungen mit Hilfe der Sudan Schwarz-B-Färbung (Spezialfärbung für neutrale Lipide) scheint besonders die Modifikation der *Stratum corneum*-Lipide im Rahmen der Plasmabehandlung eine wichtige Rolle für die Auflockerung des *Stratum corneum* zu spielen. Die Lipide scheinen sich durch die Plasmabehandlung teilweise aus ihrem ursprünglichen Verband zu lösen und liegen als schwarze Tröpfchen über das Präparat verteilt vor, wodurch die ursprünglich kompakte Struktur des *Stratum corneum* an Integrität verliert. Diese Zusammenhänge werden im Kapitel 4.4. ausführlicher diskutiert.

Die Auflockerung des *Stratum corneum* könnte neben biochemischen Plasmaeffekten (Modifikation der *Stratum-corneum*-Lipide über hochreaktive radikale Spezies) auch durch physikalische Plasmaeffekte wie den mechanischen Einfluss des reinen Gasflusses oder die bereits von anderen Arbeitsgruppen erwähnte leichte Temperaturveränderung der Haut durch die Plasmabehandlung bedingt sein. Der Einfluss des alleinigen Gasflusses (Argongas ohne Plasmabeimischung) wurde daher in Kapitel 3.1.3. untersucht. Pures Argongas scheint im Gegensatz zu Argonplasma keinen Einfluss auf die Integrität des *Stratum corneum* zu haben, wodurch der alleinige mechanische Effekt des Gasflusses für die Auflockerung des *Stratum corneum* ausgeschlossen werden kann. Der Einfluss der Temperatur auf die Integrität des *Stratum corneum* durch eine mögliche Erwärmung der Haut im Rahmen der Plasmabehandlung wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter untersucht und sollte Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten werden.

Die in der vorliegenden Arbeit erlangten Ergebnisse sprechen für eine leichte, zeitabhängige und nur mikroskopisch sichtbare Wirkung von CAP auf die Hautoberfläche, welche den morphologischen Aufbau der Haut (das *Stratum corneum*) nur geringfügig verändert. Eine Modifikation der *Stratum-corneum*-Lipide scheint dabei eine Rolle zu spielen.

4.2 Auswirkung der Plasmabehandlung auf die Apoptoserate epidermaler Zellen

Der Einfluss von CAP auf die Apoptoseraten von Zellen in verschiedenen Hautschichten wird in diesem Kapitel näher diskutiert. Im Rahmen der TUNEL-Experimente (siehe Kapitel 3.2.) konnte eine Zeitabhängigkeit der Apoptoseraten von der Dauer der Plasmabehandlung festgestellt werden. Nach 15 s und 1 min/cm² Plasmabehandlung wurden keine Apoptosen in der Epidermis festgestellt. Eine auf diese Zeit begrenzte CAP-Behandlung (wie sie auch im Rahmen der Heilung chronischer Wunden angewendet wird [25],[60]) verändert zwar die Integrität des abgestorbenen, verhornten *Stratum corneum* und damit die Barriereigenschaften der Haut kurzfristig, ist jedoch für die lebendigen Zellen der Epidermis und tiefere Hautschichten ungefährlich. Eine Regeneration des *Stratum corneum* ist daher nach einer Plasmabehandlungsdauer von bis zu 1 min/ cm² durch die Neubildung und das Nachrücken tiefer liegender Corneozytenschichten nach apikal gut möglich. Mit steigender Plasmabehandlungsdauer nimmt tendenziell auch die Anzahl apoptotischer Zellen in der Epidermis zu. Eine Plasmabehandlungszeit von bis zu 2 min/cm² Haut wird vom Gewebe toleriert, ohne Folgeschäden der Haut mit sich zu führen (Apoptosen nur im *Stratum granulosum*). Diese Apoptosen haben keine Auswirkung auf die Gewebeviabilität, da es sich bei diesen apoptotischen Zellen ausschließlich um postmitotische Zellen handelt, welche ständig von basal ausgehend erneuert

werden. Im Übergangsbereich zwischen *Stratum corneum* und *Stratum granulosum* findet der bereits erwähnte Kornifikationsprozess statt, dessen Fortschreiten durch die Plasmabehandlung möglicherweise beschleunigt wird. Ab einer Behandlungszeit von 5 min/cm² Haut treten jedoch, zusätzlich zu den Apoptosen im *Stratum granulosum*, auch Apoptosen in für die Hautregeneration essenziellen Schichten (*Stratum basale*) auf. Werden diese mitotischen Zellen apoptotisch, ist die Geweberegeneration nicht mehr möglich und es kommt zu einer Schädigung der Haut mit eventueller anschließender Narbenbildung.

Die plasma- und behandlungszeitabhängige Apoptoserate von Zellen der Epidermis wurde bereits in der Dissertation von Thao Duong Tran [80] untersucht. Sie verwendete den kINPen Med mit einer Plasmabehandlungszeit von 1 min, 3 min und 5 min. Im Gegensatz zum Schweinehautmodell verwendete sie humane Hautproben *ex vivo* und führte eine punktuelle Plasmabehandlung durch (statt die Hautproben wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben gleichmäßig unter dem Plasmajet zu bewegen). Thao Duong Tran beobachtete ebenfalls eine konstante Apoptoserate nach einer einminütigen Plasmabehandlung im Vergleich zu nicht behandelter Haut, sowie einen leichten Anstieg apoptotischer Zellen in der Basalschicht nach einer längeren Plasmabehandlungszeit von 3 und 5 min. Die in diesem Projekt gewonnenen Ergebnisse stimmen mit den von Thao Duong Tran erlangten Resultaten überein und bestätigen damit einerseits die Übertragbarkeit des Schweineohrmodells auf menschliche Haut und andererseits die Möglichkeit einer unbedenklichen Plasmaanwendung auch auf der gesunden Haut ohne Folgeschäden in einem definierten zeitlichen Rahmen.

4.3 Einfluss der Plasmabehandlung auf die Penetration von Substanzen durch das *Stratum corneum*

Die in Kapitel 4.1. beobachtete, durch die Plasmabehandlung hervorgerufene Auflockerung des *Stratum corneum* führt zu einer veränderten Barrierefunktion des *Stratum corneum*, welche mit Hilfe von zwei verschiedenen Substanzen und zwei unabhängigen Methoden festgestellt werden konnte.

Mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie konnte nach einer Plasmabehandlung 1 min/cm² in allen gemessenen Hautbereichen eine signifikant gesteigerte Penetration des fluoreszierenden Farbstoffes Curcumin nachgewiesen werden (Kapitel 3.4.). Im *Stratum corneum* (besonders im oberen Teil des *Stratum corneum* (zwei µm bis 14 µm)) ist der Unterschied vor und nach Plasmabehandlung deutlich sichtbar und es konnte eine Penetrationssteigerung des Curcumins um 158 % innerhalb des gesamten *Stratum corneum* dokumentiert werden. Eine Plasmabehandlung der Haut vor Applizieren der penetrierenden Substanz hat demnach einen penetrationsfördernden Effekt.

Die ersten Experimente zur Plasma-vermittelten Penetrationssteigerung von Substanzen durch die

Hautbarriere wurden von Lademann *et al.* durchgeführt [31]. Sie verwendeten ebenfalls das Hautmodell Schweineohr und den Plasmajet kINPen 09 und erforschten die Penetration der fluoreszierenden Substanz Fluorescein. Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten invasiven Experimenten, in welchen vertikal abgebildete Hautschnitte verglichen wurden, untersuchten Lademann *et al.* die Haut mit Hilfe der nicht-invasiven Laser-Scanning-Mikroskopie und verglichen horizontale Hautbereiche in verschiedenen Hauttiefen vor und nach Plasmabehandlung. Der Fokus lag dabei nicht auf der detaillierten Untersuchung des *Stratum corneum*, sondern auf einer generellen Untersuchung mehrerer verschiedener Hautschichten (*Stratum corneum*, *Stratum basale* und Dermis). Lademann *et al.* konnten eine gesteigerte Penetration des Fluoresceins nach Plasmabehandlung bis in tiefere Bereiche der Dermis feststellen, diese jedoch nicht quantifizieren. Die Ergebnisse beschränken sich auf rein optische Befunde. Zusätzlich untersuchten Lademann *et al.* die Penetration von unterschiedlich großen Silica-Partikeln, deren Penetration (abhängig von deren Größe) ebenfalls durch Plasmabehandlung gesteigert werden konnte. Eine Quantifizierung wurde hier ebenfalls nicht durchgeführt, jedoch konnte nachgewiesen werden, dass die Penetration von kleinen Partikeln (56 nm) durch Plasma gesteigert und die Penetration von größeren Partikeln (689 nm) durch Plasma nicht beeinflusst wird [9].

Diese Ergebnisse decken sich mit den in diesem Projekt erlangten Erkenntnissen. In beiden Modellen konnte nach Plasmabehandlung eine gesteigerte Penetration fluoreszierender Substanzen durch das *Stratum corneum* festgestellt werden. In diesem Projekt konnte diese Penetrationssteigerung zusätzlich quantifiziert und eine histologisch sichtbare Penetrationssteigerung von Curcumin nach Plasmabehandlung im *Stratum corneum* um 158 % dokumentiert werden.

Ein Nachteil der gewählten histologischen Methode zum Nachweis der gesteigerten Penetration liegt in der natürlich variierenden Verteilung des fluoreszierenden Farbstoffes auf der Gewebeoberfläche während der Penetrationszeit durch makroskopisch nicht sichtbare Unebenheiten. Um den Einfluss dieser Unebenheiten und die natürlichen, in einem biologischen Modell vorkommenden Fehler auszugleichen, wurden die Versuche an mehreren voneinander unabhängigen Bioreplikaten wiederholt und jedes Präparat an verschiedenen über das Präparat verteilten Schnittstellen untersucht.

Zusätzlich zu den histologischen Experimenten mit der Modellsubstanz Curcumin wurde die plasmaabhängige Penetration des Arzneistoffes Ibuprofen durch die Haut mittels HPLC/ MS von durch *Tape stripping* gewonnenen einzelnen Schichten des *Stratum corneum* untersucht (Kapitel 3.5.). Auch im Rahmen dieser Experimente konnte nach einer Plasmabehandlung von 1 min/ cm² eine gesteigerte Penetration des Stoffes Ibuprofen in tiefere *Stratum-corneum*-Schichten festgestellt werden. Für fast alle extrahierten Hautschichten ergaben sich signifikant unterschiedliche penetrierte Ibuprofenmengen vor und nach der Plasmabehandlung (Ausnahme Schicht 16) mit einer

Penetrationssteigerung nach Plasmabehandlung um 40,93 % im gesamten *Stratum corneum*.

Besonders in die oberen Schichten des *Stratum corneum* (Schicht 1 bis 6) penetrierte vor und nach Plasmabehandlung eine große Ibuprofenmenge. In tieferen *Stratum corneum*-Schichten war nur eine geringere Menge an Ibuprofen detektierbar. Dieses Absinken der Ibuprofenkonzentration in tieferen Schichten kann mit der in diesem Projekt verwendeten, für die transdermale Applikation von Arzneistoffen verhältnismäßig kurzen Penetrationszeit von einer Stunde erklärt werden. Da Substanzen transdermal nur sehr langsam penetrieren, befand sich der Großteil der penetrierten Substanz zum Zeitpunkt der Messung noch in den äußeren Schichten des *Stratum corneum*. Es kann angenommen werden, dass der Großteil der penetrierenden Substanz nach einer längeren Penetrationszeit auch in tieferen *Stratum corneum*-Schichten zu detektieren ist.

Vergleicht man die zwei mit verschiedenen Substanzen über unterschiedliche Techniken ermittelten Penetrationsdiagramme (Curcumin und Ibuprofen siehe Kapitel 3.4. und Kapitel 3.5.), werden einige Gemeinsamkeiten und Unterschiede deutlich. In beiden Fällen beschleunigt eine vorherige Plasmabehandlung der Haut die Penetration der Stoffe durch das *Stratum corneum*. Besonders im oberen Bereich des *Stratum corneum* (Curcumin: Bereich 4 µm bis 9 µm, Ibuprofen: *Tape*-Schicht 1 bis 6) kann nach Plasmabehandlung im Vergleich zur unbehandelten Haut eine deutlich größere Menge an penetrierter Substanz gemessen werden. Unterschiede wie ein um einen anderen Faktor gesteigerter Prozentsatz der penetrierten Substanzen (Penetrationssteigerung Curcumin um 158 % (Kapitel 3.4), Penetrationssteigerung Ibuprofen um 40,93 % (Kapitel 3.5)) können über die unterschiedlichen Stoffeigenschaften der penetrierenden Substanzen (Curcumin und Ibuprofen) und die ungleichen Lösungsmittel (Essigsäureethylacetat und Acetonitril-Salzsäure) erklärt werden. Da es sich bei Ibuprofen im Vergleich zu Curcumin um ein kleineres, lipophileres und dadurch auch ohne Plasmabehandlung gut durch die Hautbarriere penetrierendes Molekül handelt, verursacht eine Plasmabehandlung und Auflockerung des *Stratum corneum* keine so große Veränderung des Penetrationsverhaltens dieses Stoffes. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei Curcumin um einen hydrophileren, größeren und dadurch kaum penetrierenden Stoff, dessen Penetration durch das *Stratum corneum* erst durch die vorherige Plasmabehandlung der Haut effektiv ermöglicht wird, wodurch in diesen Versuchen eine insgesamt größere Penetrationssteigerung im Vergleich zu vor der Plasmabehandlung dokumentiert werden konnte. Trotz geringfügiger Abweichungen der zwei Ergebnisse belegen sie beide eine Penetrationssteigerung von transdermal applizierten Stoffen nach Plasmabehandlung der Haut.

Experimente anderer Arbeitsgruppen zur Plasma-vermittelten Penetration von Substanzen durch die Haut wurde hauptsächlich mit Hilfe von DBD-Plasmaquellen durchgeführt. Der Vergleich der Penetration der behandelten und nicht behandelten Hautproben erfolgte in diesen Studien hauptsächlich mit Hilfe von Frans-Diffusionszellen.

Gelker *et al.* untersuchten drei verschiedene DBD-Plasmaquellen (eine ns-pulsed und zwei μ s-pulsed DBDs), bei welchen die untersuchte Haut als Gegenelektrode fungierte, und verglichen sie hinsichtlich ihrer penetrationsfördernden Eigenschaften für Stoffen (Natriumfluorescein, FITC-gebundene Dextrane) sowie Nano- und Mikropartikel (fluoreszierende carboxylierte Polystyrole und Mikrosphären) durch humane Haut (extrahiertes *Stratum corneum*, sowie die komplette *Cutis*) *ex vivo* mit Hilfe von Frans-Diffusionszellen [34],[33]. Sie konnten eine gesteigerte Penetration der untersuchten Substanzen nach Plasmabehandlung feststellen, welche innerhalb von 24 h abhängig von Plasmaquelle und Substanz zwischen Faktor 4,4 und Faktor 41,6 schwankte. Diese sehr hohen Penetrationswerte (im Gegensatz zu den in dieser Arbeit ermittelten eher niedrigen Penetrationswerten) sind möglicherweise auf die längere Gesamtbehandlungsdauer (zwei mal 90 s), den sehr geringen Abstand der Haut zur Plasmaquelle und besonders die sehr lange Penetrationszeit von 24 h (im Gegensatz zu 1 h Penetrationszeit) zu erklären. Auch ermöglicht die Verwendung einer Frans-Diffusionszelle einen gerichteten Fluss der untersuchten Substanz innerhalb des Systems: die Substanz diffundiert vom Ort der hohen Konzentration (Donor-Kompartiment, Applikationsort oberhalb der Membran) zum Ort niedrigerer Konzentration (Akzeptor-Kompartiment, unterhalb der Membran) und wird dort im Akzeptor-Medium aufgenommen und abtransportiert. Durch den kontinuierlichen Abtransport des Stoffes von der Unterseite der Membran werden sogenannte Sink-Bedingungen geschaffen, die für einen konstant hohen Konzentrationsgradienten für die Substanzdiffusion sorgen. Im Gegensatz dazu war der Abtransport der untersuchten Substanz auf der basalen Seite in der hier vorliegenden Arbeit nicht möglich, wodurch möglicherweise weniger Stoffpartikel penetrieren konnten. Bei den von Gelker *et al.* verwendeten DBD-Plasmaquellen fungiert die Haut selbst als Gegenelektrode für die Plasmagenerierung, wodurch ein elektrisches Feld direkt an der Haut anliegt, was ebenfalls zu einer stärkeren Penetrationsveränderung von Substanzen durch die Haut nach Plasmabehandlung führen könnte. Gelker *et al.* vermuteten den Mechanismus hinter der plasmavermittelten Penetrationssteigerung in einer Permeabilisierung des *Stratum corneum* durch ohmsche Wärme, welche durch lokale Spannungen und einen geringen Temperaturanstieg nach Plasmabehandlung hervorgerufen wurde.

Shimizu *et al.* untersuchten ebenfalls die Penetrationseigenschaften von Stoffen durch das extrahierte *Stratum corneum* von Schweinehaut mit Hilfe einer Frans-Diffusionszelle nach dreiminütiger DBD-Plasmabehandlung [35]. Nach 1 h Penetrationszeit konnten sie (im Gegensatz zu den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit) noch keine veränderte Penetration von Substanzen durch das *Stratum corneum* nachweisen. Erst nach einer Penetrationszeit von 2 bis 5 h konnten sie eine gesteigerte Penetration der Substanzen nach Plasmabehandlung dokumentieren. Den Mechanismus hinter dem veränderten Penetrationsverhalten der Stoffe vermuten sie in der dynamischen und reversiblen Verschiebung von Lipid-Doppelschichten im Interzellularraum nach Plasmabehandlung.

Kristof *et al.* verglichen die Penetration des Stoffes Cyclosporin A durch Schweinehaut mit Hilfe einer Frans-Diffusionszelle vor und nach Plasmabehandlung mit einem Plasmajet (Behandlungszeit 1 min/cm²) und einer DBD-Plasmaquelle (Behandlungszeit 5 min/cm²) [36]. Sie stellten eine Penetration der Substanz ausschließlich nach Plasmabehandlung fest, wobei sie keine signifikanten Unterschiede in der penetrationsvermittelnden Wirkung zwischen den beiden Plasmaquellen feststellen konnten. Eine mögliche Erklärung für die plasmavermittelte Penetrationssteigerung vermuten auch Kristof *et al.* in einer Interaktion von Plasma mit Lipiden des *Stratum corneum* und einer plasmavermittelten Lipidoxidation, gehen jedoch nicht weiter darauf ein. Auch die in diesem Projekt erworbenen Erkenntnisse (Kapitel 3.1.2.) weisen auf eine Rolle der Lipide hin und werden später ausführlicher diskutiert (Kapitel 4.4.).

Alle bisherigen von anderen Arbeitsgruppen durchgeführten Versuche, in welchen die Plasma-vermittelte Penetrationssteigerung quantifiziert werden konnte, beruhen auf dem Prinzip der Frans-Diffusionszelle und liefern sehr stark variierende Ergebnisse hinsichtlich des quantitativen Ausmaßes der plasmavermittelten Penetrationssteigerung.

Die *Tape stripping*-Technik mit anschließender massenspektrometrischer Analyse zur Quantifizierung der penetrierenden Substanz stellt eine neue Herangehensweise dar, mit welcher die Plasma-vermittelte Penetrationssteigerung ebenfalls nachweisbar und gut quantifizierbar ist. Auf Grund der unterschiedlichen Methoden und Plasmaquellen sind die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse nicht direkt mit den in anderen wissenschaftlichen Arbeiten beschriebenen Resultaten vergleichbar, ergänzen sie jedoch in verschiedenen Bereichen.

Eine Plasmabehandlung der Haut und eine damit verbundene Auflockerung des *Stratum corneum* verringert die Integrität der Hautbarriere und kann dadurch die Penetration von transdermal applizierten Arzneistoffen steigern. Die Behandlung der Haut mit CAP stellt deshalb möglicherweise eine Alternative zu risikobehafteten penetrationssteigernden Methoden wie Mikronadeln (siehe Kapitel 1.2.1.2.) dar. Im nachfolgenden Abschnitt wird kurz auf die möglichen Risiken und Nebenwirkungen der Beeinflussung der Hautbarriere durch CAP eingegangen.

Wie schon im Kapitel 3.2. beschrieben, konnten bei einer CAP-Behandlung der Haut von 1 min/cm² keine Auswirkungen auf die Apoptoserate epidermaler Zellen festgestellt werden. Eine Behandlungszeit von 2 min/cm² wird von der Haut ebenfalls weitgehend toleriert (nur Apoptosen im *Stratum granulosum*, auch Teil eines physiologischen Prozesses). Ab einer Behandlungszeit von 5 min/cm² können allerdings Hautschäden auftreten, da bei dieser relativ langen Behandlungszeit Apoptosen in für die Hautregeneration essentiellen Schichten beobachtet wurden (Kapitel 3.2. und [80]). Zur transdermalen Penetrationssteigerung von Stoffen genügt jedoch bereits eine Behandlungszeit von 1 min/cm², welche auf die Apoptoserate epidermaler Zellen und damit auf die Hautregeneration keinen Einfluss nimmt.

Auch die Infektionsgefahr durch die Penetration von Bakterien und Pilzen durch das nach Plasmabehandlung aufgelockerte *Stratum corneum* ist im Vergleich zu anderen penetrationssteigernden Methoden relativ gering. Einerseits wirkt Plasma selbst antibakteriell [18], wodurch sich vor der Plasmabehandlung auf der Hautoberfläche befindende Bakterien direkt abgetötet werden, andererseits wird nach Lademann *et al.* durch die Plasmabehandlung nur die Penetration von Stoffen mit einer Größe unter 689 nm durch das *Stratum corneum* begünstigt. Kleine nach Plasmabehandlung applizierte Partikel können demnach nach der Plasmabehandlung besser durch die Haut penetrieren, eindringende Bakterien (1 µm bis 10 µm) und Pilze (3 µm bis 200 µm) jedoch nicht [9].

Eine mögliche Dehydration des Gewebes nach Plasmabehandlung mit dem kINPen 09 untersuchten Fluhr *et al.* mit Hilfe eines Corneometers und stellten einen leicht gesenkten Feuchtigkeitsgehalt der obersten abgestorbenen Hornschichten des *Stratum corneum* fest. Jedoch beobachteten sie keinen Einfluss der Plasmabehandlung auf den Feuchtigkeitsgehalt der untersten Schichten des *Stratum corneum* und damit keine Beeinflussung des Hydrationslevels lebendiger Zellschichten [30].

Eine gute Hautverträglichkeit der Plasmabehandlung in Bezug auf Hautfeuchtigkeit und Hautaustrocknung konnte von Daeschlein *et al.* ebenfalls nachgewiesen werden [81].

Auch Lademann *et al.* [82] konnten im Hinblick auf Jet-Temperatur und UV-Strahlung keinen schädigenden Einfluss von CAP nachweisen.

Das Hautsensibilisierungspotential einer Plasmabehandlung (kINPen Med) *in vivo* wurde von van der Linde *et al.* an muriner Haut mit Hilfe des lokalen Lymphknotentests (lokal lymph node assay) untersucht. Auch nach wiederholter Plasmabehandlung desselben Hautbereichs konnte keine Lymphknotenproliferation oder Zeichen einer Sensibilisierung oder Irritation der Haut festgestellt werden [29].

4.4 Einfluss der Plasmabehandlung auf das Lipidom des *Stratum corneum*

Erste histologische Experimente mit der Sudan Schwarz-B-Färbung (Kapitel 3.1.2, Spezialfärbung für neutrale Lipide) deuteten auf eine Rolle der Lipide bei der plasmavermittelten Auflockerung des *Stratum corneum* hin. Um die zu Grunde liegenden Mechanismen hinter der in Kapitel 3.4 und 3.5. beobachteten plasmavermittelten Änderung der Barrierefunktion des *Stratum corneum* besser zu verstehen, wurden verschiedene *Stratum-corneum*-Lipide vor und nach Plasmabehandlung untersucht. Neben der Rolle der Lipide kommen für die plasmavermittelte Penetrationssteigerung auch andere *Stratum-corneum*-Bestandteile (wie Proteine) in Frage, welche im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht näher untersucht wurden. Im Rahmen der Untersuchung des Lipidoms vor und nach

Plasmabehandlung wurde mittels *Tape stripping* das *Stratum corneum* Schicht für Schicht entfernt, die Lipide anschließend vom *Tape* extrahiert und mittels HPLC/MS spezifisch untersucht (Kapitel 2.2.5.). Dabei wurden die Anzahl der identifizierten Lipidspezies vor und nach Plasmabehandlung gemessen und zwei besonders häufig vorkommende Lipide des *Stratum corneum* (Ceramide und Triacylglycerole, sowie deren Oxidationsprodukte) näher untersucht (Kapitel 3.6.).

Im Rahmen der Untersuchung des Gesamt-Lipidoms des *Stratum corneum* wurden insgesamt 835 Lipidspezies identifiziert, welche sowohl ohne als auch nach Plasmabehandlung in den untersuchten Proben vorhanden waren. In einer Studie von Sadowski *et al.*, welche humanes *Stratum corneum* untersuchten, wurden insgesamt 862 verschiedene Lipidspezies identifiziert [69]. Der experimentelle Aufbau dieser Studie wurde für die Lipidextraktion der vorliegenden Arbeit teilweise als Vorlage verwendet, da auch hier Lipide von zwanzig *Tape strips* extrahiert (in der Studie wurden CUDERM D-squame Disks statt Corneofix verwendet) und mithilfe eines Massenspektrometers detektiert wurden. Die Anzahl der im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten Lipidspezies (835) spiegelt somit sowohl die Sensitivität als auch Reproduzierbarkeit der verwendeten Methode wieder und validiert diese für eine Anwendung zur Untersuchung der Lipidzusammensetzung des *Stratum corneum* auch an der hier verwendeten Schweinehaut. In der folgenden Diskussion werden besonders die Lipidklassen der Ceramide und Triacylglycerole näher betrachtet, da es sich dabei um die in den durchgeführten Experimenten am meisten beobachteten Lipidklassen handelte und diese die größten Veränderungen nach einer Plasmabehandlung aufwiesen. Ein weiteres, neben den bereits erwähnten Lipidklassen im *Stratum corneum* vorkommendes Lipid ist das Cholesterol, welches mit der im Rahmen dieser Arbeit angewandten massenspektrometrischen Mess-Methode (vorherige Separation des Lipidextrakts über eine Flüssigchromatographie-Säule) nicht detektiert werden konnte. Für die Detektion des Cholesterols müsste eine „Direct-infusion“-Methode (direkte Infusion des Lipidextraktes in das Massenspektrometer [75]) angewandt werden, welche jedoch nicht mit der Detektion der anderen Lipidklassen vereinbar gewesen wäre, weshalb hier nicht näher auf Cholesterol eingegangen werden soll.

4.4.1 Ceramide

Die mit Abstand am häufigsten identifizierte Lipidklasse in den vorliegenden Experimenten waren die Ceramide mit einem Anteil von bis zu über 75 %. Ceramide sind ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix der Epidermis. Keratinozyten bilden während ihrer Differenzierung zu Korneozyten eine kornifizierte Hülle aus, welche vorwiegend aus Proteinen wie Keratin, Loricrin und Elafin besteht [83]. Ceramide bilden gemeinsam mit freien Fettsäuren und Cholesterol eine zusätzliche Schicht um diese kornifizierte Hülle, in welcher sie in Form einer Lamellarstruktur

angeordnet sind. Diese lamellare Anordnung ist besonders dicht und undurchlässig und trägt zur Stabilität und zu einer Verhinderung des Wasserverlustes der Haut über das *Stratum corneum* bei. Eine Veränderung des Ceramidprofils wurde bereits bei verschiedenen Hauterkrankungen wie atopischer Dermatitis oder Psoriasis beschrieben [84],[85].

In der vorliegenden Arbeit war nach einer einminütigen Plasmabehandlung eine deutliche Abundanzzunahme der Ceramide im Verhältnis zu allen anderen Lipidklassen zu verzeichnen. In vielen anderen Zusammenhängen wurde eine verringerte Abundanz der Ceramide mit einer reduzierten Barrierefunktion der Haut assoziiert [85], in der vorliegenden Arbeit führte eine Plasmabehandlung jedoch trotz der steigenden Ceramid-Abundanz ebenfalls zu einer reduzierten Barrierefunktion der Haut.

Für die Veränderung der Ceramidabundanz kommen drei mögliche Ursachen in Frage: (1) eine Plasmabehandlung führt zu einer Auflockerung des *Stratum corneum*, wodurch Ceramide, welche normalerweise sehr dicht gepackt in einer hydrophoben Lipidschicht mit der kornifizierten Hülle verbunden sind, leichter mit einem Corneofix gesammelt werden können und damit zugänglicher für eine Extraktion werden, (2) die verminderte Abundanz der Triacylglycerole nach der Plasmabehandlung führt zu einer relativen Überbewertung des Ceramidanteils in der Darstellung oder (3) die Plasmabehandlung führt zu einer strukturellen und funktionellen Veränderung verschiedener, an der Barrierefunktion der Haut beteiligter *Stratum-corneum*-Bestandteile (zum Beispiel Acylceramide) und zur Freisetzung von Ceramiden, deren Abundanz sich dadurch erhöht.

Hypothese (1) in der Diskussion wird bekräftigt durch die morphologischen Veränderungen des *Stratum corneum* nach einer Plasmabehandlung (Kapitel 4.1.), in welchen sich sehr deutlich eine Auflockerung der Schichten in Abhängigkeit von der Dauer der Behandlungszeit zeigte. Diese Theorie wird ebenfalls gestützt von den in Kapitel 3.6. beschriebenen erhöhten Gewichtsanteilen des jeweils am Corneofix haftenden *Stratum corneum* nach einminütiger Plasmabehandlung besonders in den ersten acht Schichten. Auch die Behandlung der Haut mit einem alleinigen Gasfluss führte zu einer geringfügigen Auflockerung des *Stratum corneum*. Jedoch konnte nach einer einminütigen Plasmabehandlung wesentlich mehr Material pro Schicht gewonnen werden. In den in Kapitel 3.6. dargestellten massenspektrometrischen Lipiddaten ist die Abundanz der Ceramide nach 1 min/cm² Behandlung geringfügig höher als nach 15 s/cm² und wesentlich höher als ohne Plasmabehandlung. Besonders in den ersten *Stratum corneum*-Schichten (Schicht 1 bis 12), welche morphologisch am stärksten aufgelockert erscheinen (Kapitel 3.1.), zeigt sich ein Anstieg der Ceramidabundanz (Kapitel 3.6.).

Sollte die erhöhte Ceramidabundanz, wie in Hypothese (2) postuliert, durch eine Überbewertung der gesunkenen Triacylglycerolabundanz zustande kommen, müsste es gleichzeitig zu einem prozentualen Abundanzanstieg der anderen Lipidklassen (Diacylglyceride, Hexosylceramide, ...) kommen. Dieser geht jedoch nicht aus den erhobenen Daten hervor (siehe Abbildung 30). Die Hypothese (2) der relativen Überbewertung des Ceramidanteils kann damit nicht bestätigt werden.

Eine weitere Hypothese (3) könnte auch die Modifikation besonders langkettiger Acylceramide sein, welche durch ihre bis zu 34 Kohlenstoffatome langen Fettsäuren die Lamellarschicht durchspannen [86]. Eine Plasmabehandlung könnte diese Lipidspezies durch die Freisetzung von reaktivem Sauerstoff- und Stickstoffspezies in kürzere Ceramide spalten, welche besser extrahierbar und somit detektierbar sind. Dies geht jedoch aufgrund der zu gering abundanten langkettigen Acylceramide nicht signifikant aus den gewonnenen Daten hervor, ist aber für eine weiterführende tiefergehende Betrachtung des Ceramidprofils nach einer Plasmabehandlung ein wichtiger Aspekt. Mittels Massenspektrometrie könnte man diese Spezies mit einer „targeted“ Methode gezielt detektieren und analysieren.

Als Gründe für die plasmavermittelte erhöhte Ceramidabundanz kommen also am wahrscheinlichsten (1) die Auflockerung des *Stratum corneum* und die dadurch erhöhte Menge an extrahierten Ceramiden (welche im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen wurde) in Betracht. Die strukturelle und funktionelle Veränderung (3) von *Stratum corneum*-Bestandteilen (wie zum Beispiel Acylceramiden) ist ebenfalls eine Erklärungsmöglichkeit. In den hier durchgeführten Untersuchungen kann diese Hypothese auf Grund der zu geringen Datenlage weder verifiziert noch widerlegt werden.

Darüber hinaus wurden in der Klasse der Ceramide keine Oxidationsprodukte gefunden. Offenbar ist diese Lipidspezies im Rahmen der Plasmabehandlung seltener von Oxidationen betroffen, da ihre Fettsäureketten keine oder nur wenige Doppelbindungen besitzen. Ein weiterer Grund für den fehlenden Nachweis von Oxidationsprodukten der Ceramide nach Plasmabehandlung kann auch auf die begrenzte Detektionsbreite von Oxidationsprodukten der LipidSearch-Software zurückgeführt werden. Eine Studie von Van der Paal *et al.* vermutet auf Grundlage einer *molecular dynamics simulation* einen möglichen Einfluss von (durch eine Plasmabehandlung produzierten) OH-Radikalen auf Ceramide [87]. In der Studie wurde gezeigt, dass eine Oxidation der Ceramide zu einer Dissoziation der Ceramidstruktur in zwei Aldehyde erfolgen kann. Diese konnten in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden. Eine weiterführende Literaturrecherche ergab, dass bis dato keine von extrazellulären reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies hervorgerufenen Oxidationen an Ceramiden in der Haut experimentell nachgewiesen wurden. Diese wurden lediglich anhand von einfachen Lipidmodellen vermutet [88].

4.4.2 Triacylglycerole

Bei der zweiten Lipidklasse, welche im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht wurde, handelt es sich um die Triacylglycerole als Hauptkomponente des Sebums. Triacylglycerole, welche in den durchgeführten Experimenten einen Gesamtanteil von 20 % an den identifizierten *Stratum-corneum*-Lipiden darstellten, haben ihren Ursprung in den Talgdrüsen und sind besonders in den oberen Schichten des *Stratum corneum* lokalisiert [4]. Fehlerhaft synthetisierte oder metabolisierte Triacylglycerole, wie sie im Rahmen verschiedener Erkrankungen (zum Beispiel dem Dorfman-Chanarin-Syndrom, auch bekannt als Neutral lipid storage disease) detektiert wurden, sind mit einer verminderten Barrierefunktion der Haut assoziiert [89]. In den eigenen durchgeführten Untersuchungen wurde sowohl nach 15 s/cm² als auch nach 1 min/cm² Plasmabehandlung eine verringerte Abundanz von Triacylglycerolen festgestellt. Zusätzlich konnte nach einer einminütigen Plasmabehandlung eine geringfügig erhöhte Abundanz von Triacylglycerol-Oxidationsprodukten besonders in den oberflächlichen Schichten (Schicht 1 bis 6) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 30). Die gewonnenen Ergebnisse sind noch nicht signifikant und bedürfen daher weiterer Validierung. Da die Beobachtungen jedoch für die Weiterentwicklung der Plasmatherapie von Bedeutung sein könnten, sollen nachfolgend Thesen der möglichen zugrundeliegenden Mechanismen aufgeführt werden.

Die Veränderungen nach Plasmabehandlung werden maßgeblich durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies vermittelt. Auf Grund ihrer drei Fettsäuren besitzen Triacylglycerole mehrere Angriffspunkte für diese reaktiven Spezies. Die Oxidation von Triacylglycerolen ist insbesondere im Kontext der Lebensmittelherstellung mit der Verderblichkeit von Öl-Produkten assoziiert [90]. Die verringerte Abundanz der Triacylglycerole nach einer Plasmabehandlung könnte darauf zurückzuführen sein, dass eine Lipidperoxidation nicht mit der Addition von Sauerstoff an einer Fettsäure endet, sondern dies eine Kettenreaktion verursacht, in welcher ganze Fettsäuren vom Molekül gespalten werden. In diesem Fall kann es auch zu einer Veränderung der Ausgangsstruktur des Lipidmoleküls kommen, sodass es entweder überhaupt nicht mehr detektiert oder einer anderen Klasse zugeordnet wird [91].

Analog zu den hier durchgeführten Untersuchungen konnten verringerte Abundanzen und eine Veränderung des Triacylglycerolprofils bereits nach einer Plasmabehandlung von humanem Sebum [51] und im *Stratum corneum* von Mäusen [92] nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den vorgenannten Studien zeigte sich aber in der vorliegenden Arbeit, dass eine nachweisbare Oxidation von Triacylglycerolen durch Plasma stattfindet. Die beiden vorherigen Studien hatten lediglich gezeigt, dass die Abundanz der Oxidationsprodukte nach einer Plasmabehandlung sank. Es ist

bekannt, dass in der Haut auch ohne Plasmabehandlung eine natürliche Oxidation stattfindet (beispielsweise durch UV-Strahlung vermittelt) und dadurch Oxidationsprodukte vorhanden sind. Aus den bisherigen Ergebnissen wurde geschlussfolgert, dass diese Oxidationsprodukte durch eine Plasmabehandlung nur noch weiter zerstört wurden und damit nicht mehr detektierbar waren. In der eigenen Studie zeigte sich ein anderes Bild: Oxidationsprodukte sind wie auch in den anderen beiden Studien physiologisch bereits in unbehandelter Haut vorhanden. Durch eine einminütige Plasmabehandlung wurde die Oxidation in den obersten Schichten des *Stratum corneum* jedoch beschleunigt und konnte hierbei bis in die sechste *Tape stripping*-Schicht nachgewiesen werden. Ein Abgleich mit den Ibuprofen-Daten (Kapitel 4.3.) zeigt, dass die gesteigerte Penetration des Stoffes auch bis in diese Schicht (*Tape*-Schicht 1 bis 6) erfolgte, was die Hypothese bestärkt, dass eine plasmavermittelte Triacylglycerol-Oxidation zu diesem Effekt beiträgt.

Zusammenfassend ist für diesen Abschnitt festzustellen, dass zwei Lipidklassen (Ceramide und Triacylglycerole) identifiziert wurden, welche potentielle Ziele für eine Plasmabehandlung darstellen. Das veränderte Ceramidprofil nach Plasmabehandlung bestätigt die durch Mikroskopie nachgewiesene Auflockerung des *Stratum corneum*. Der Abfall der Triacylglycerolabundanz und die plasmavermittelte Bildung von Triacylglycerol-Oxidationsprodukten in den obersten Schichten des *Stratum corneum* spiegelt die Interaktion von plasma-produzierten reaktiven Spezies mit Lipiden der Haut wieder. Die beobachteten molekularen Veränderungen können ein Grund für die plasmavermittelte Penetrationssteigerung sein.

4.5 Vor- und Nachteile des *in vitro* Hautmodells Schweineohr

Im Rahmen der vorliegenden Experimente wurde das *in vitro*-Hautmodell Schweineohr verwendet. Die Verwendung dieses Modells bringt sowohl Vor- als auch Nachteile mit sich.

Bei Schweineohrhaut handelt es sich nach Klang *et al.* [54] um eines der besten Modelle für die menschliche Haut. Aufbau und Dicke der Haut sowie die Anzahl der Haarfollikel entsprechen denen der humanen Haut. Im Rahmen dieser Arbeit war die bessere und schnellere Verfügbarkeit der Schweineohren gegenüber menschlichen Hautanschnitten aus dem OP von Vorteil. Der Hautentnahmeort variierte im Gegensatz zu Hautproben aus dem OP nicht. Die relativ große Oberfläche der Schweineohren erlaubte die problemlose Durchführung von verschiedenen Behandlungsmustern an einem einzigen Ohr, wodurch der Einfluss der Interindividualität der verschiedenen Hautproben innerhalb eines Experiments gesenkt werden konnte. Durch die Verwendung von *ex vivo*-Tiermaterial von ohnehin getöteten Schlachttieren konnten die Versuche an einem realen biologischen System durchgeführt und gleichzeitig direkte Tierversuche an lebendigen

Tieren vermieden werden.

Bei der in diesen Experimenten untersuchten Hautschicht, dem *Stratum corneum*, handelt es sich um ein totes, nicht durchblutetes und auch *in vivo* kaum mit Nährstoffen versorgtes Gewebe. Da das *Stratum corneum* ohnehin permanent den Einflüssen der äußeren Umgebung ausgesetzt ist, ist es sehr robust und widerstandsfähig, weshalb es sich auch nach der Abtrennung des Ohres vom lebenden Organismus nur sehr langsam zersetzt.

Um die Viabilität der tieferen und empfindlicheren Hautschichten zu prüfen, wurden die in Kapitel 2.3. und Kapitel 3.3. beschriebenen Experimente zur Auswanderung von Zellen und zur Apoptoserate von Zellen der Epidermis durchgeführt. Eine Auswanderung von Zellen aus dem direkt nach dem Transport entnommenen Gewebe nach 48 h konnte, wie in Kapitel 3.3. beschrieben, in mehreren Schweineohrhautanschnitten nachgewiesen werden. Trotz 20 h Transportzeit und einer verminderten Nährstoffversorgung des Gewebes war vom *Stratum basale* ausgehend die Auswanderung von neuen Zellen ins Medium möglich. Auch die im Apoptose-Tunnel-Versuch gewonnenen Ergebnisse (Kapitel 3.2.) sind vielversprechend. Im Bereich der Epidermis befinden sich in der unbehandelten Haut (ohne Plasmabehandlung) kaum apoptotischen Zellen. Die epidermalen Zellen scheinen nicht durch den Transport oder durch den mechanischen Stress der Haut während des Schlachtprozesses und der Biopsieentnahme beeinträchtigt worden zu sein. Nur im Bereich der empfindlichen Dermis sind vereinzelt Apoptosen erkennbar. Dieses Gewebe ist *in vivo* durchblutet und reagiert daher empfindlicher auf ein Ausbleiben der Durchblutung *ex vivo* und eine damit verbundene Trennung von der Nährstoffzufuhr und einen fehlenden Abtransport von Schadstoffen. Die Dermis ist jedoch nicht Bestandteil des in diesem Projekt untersuchten Gewebes, weshalb diese hier vernachlässigt werden kann.

Sowohl die ausgewanderten Zellen als auch die noch nicht apoptotischen Zellkerne in der Epidermis ohne Plasmabehandlung, wie sie im Apoptose-Tunnel-Experiment nachgewiesen wurden, sind ein Zeichen für die hohe Viabilität des Gewebes. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Entfernung und der Transport der Ohren der Epidermis, dem *Stratum corneum* und der durch sie gebildeten Hautbarriere nicht schaden.

Thao Duong Tran führte an menschlicher Haut ebenfalls Experimente zur Apoptoserate von Zellen nach Plasmabehandlung durch und erzielte unter entsprechenden Bedingungen ähnliche Resultate wie die in Kapitel 3.2. beschriebenen Ergebnisse, was die Ähnlichkeit der humanen Haut (ähnliche Apoptoseraten, ähnliche Barriereigenschaften) zum Schweineohrhautmodell bestätigt [80]. Da die Dicke der Schweineohrhaut (circa 20 µm) relativ konstant ist und die Dicke der menschlichen Haut, abhängig vom Entnahmeort und der Beanspruchung, stark variiert [2], sind Ergebnisse jedoch nicht direkt auf die Hautbarriere in jedem Bereich des menschlichen Körpers übertragbar.

Obwohl das verwendete Hautmodell auch nach dem Transport und der Verarbeitung noch gut erhalten

war und die menschliche Haut der Schweineohrhaut stark ähnelt, handelt es sich bei dem in diesem Projekt verwendeten Hautmodell um ein *in vitro*-Modell, weshalb die erzielten Ergebnisse nur mit Einschränkungen auf eine *in vivo*-Situation im klinischen Alltag übertragbar sind. Die Penetration durch die Haut fand in diesem *ex vivo*-Projekt bei Raumtemperatur statt *in vivo* bei Körpertemperatur statt, was die Lipidzusammensetzung und die Penetrationseigenschaften *in vivo* möglicherweise leicht verändern könnte.

Das Modell eignet sich nicht für langfristige Penetrationsversuche, da die Einstellung eines Fließgleichgewichtes der penetrierenden Substanz durch einen Abtransport mit dem Blutstrom in tieferen Hautschichten *ex vivo* nicht möglich ist. Außerdem kann in diesem Modell die Hautregeneration nicht stattfinden, welche am lebenden Organismus nach Plasmabehandlung möglicherweise auftreten würde. Zusätzlich würden in diesem Modell nach einiger Zeit Zersetzungsprozesse im Gewebe starten, welche das Penetrationsverhalten von Stoffen ebenfalls verändern würden.

Da es sich bei dem Schweineohrhautmodell um ein *in vitro*-Modell handelt, ermöglicht es eine erste Beurteilung des Penetrationsverhaltens von Substanzen und der Lipidzusammensetzung des *Stratum corneum* menschlicher Haut nach Plasmabehandlung, ist jedoch mit gewissen Einschränkungen verbunden und kann die *in vivo*-Situation am menschlichen Körper nicht hundertprozentig vorhersagen.

In nachfolgenden Studien könnte das Schweineohrmodell beispielsweise zum Vergleich der Wirkung verschiedener Plasmaquellen auf die Haut genutzt werden. Auch wenn Lademann *et al.* in ihrer Arbeit von unveröffentlichten Ergebnissen berichten, in denen die Penetrationssteigerung durch Plasmabehandlung am lebenden Organismus nicht nachgewiesen werden konnte [93], wäre es auf Grund der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse interessant, diese Versuche *in vivo* (zum Beispiel an einem Mäusehautmodell) zu wiederholen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Forschungshypothese, dass eine Plasmabehandlung der Haut mit kaltem Atmosphärendruckplasma zu einer lokalen Änderung der physikochemischen Eigenschaften des *Stratum corneum* und dessen Struktur und (Barriere-)Funktion führt, konnte bestätigt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden morphologisch sichtbare Hautveränderungen, die Penetrationseigenschaften verschiedener Substanzen vor und nach Plasmabehandlung sowie Veränderungen der Lipidzusammensetzung des *Stratum corneum* auf molekularer Ebene analysiert. Der wesentliche Erkenntnisgewinn der Arbeit besteht im qualitativen und quantitativen Nachweis der gefahrlosen durch kaltes Atmosphärendruckplasma vermittelten Penetrationssteigerung von Substanzen in die Haut mit speziellem Fokus auf das *Stratum corneum*.

Die Plasmabehandlung der Haut mit einem Plasmajet lockert abhängig von der Plasmabehandlungszeit das aus Corneozyten und einer interzellulären Lipidmatrix bestehende *Stratum corneum* auf. Die aufgelockerte Struktur des *Stratum corneum* ermöglicht eine beschleunigte Penetration verschiedener, nach Plasmabehandlung applizierter Substanzen durch die Haut (Kapitel 4.2.). Die Penetrationssteigerung variiert dabei abhängig von den Stoffeigenschaften der penetrierenden Substanz (zum Beispiel Molekülgröße und Lipophilie).

Die morphologische Auflockerung des *Stratum corneum* spiegelt sich im nach der Plasmabehandlung veränderten Ceramid-Profil wieder. Die veränderten Barriereeigenschaften in den obersten Schichten des *Stratum corneum* nach einer einminütigen Plasmabehandlung lassen sich über die Interaktion von plasma-produzierten reaktiven Spezies mit Lipiden der Haut (insbesondere Triacylglycerolen) und die dadurch vermittelte Bildung von Triacylglycerol-Oxidationsprodukten erklären (Kapitel 4.4.).

Eine Plasmabehandlung hat im Bereich der in der Dermatologie für den kINPen MED empfohlenen Anwendungsdauer von 15 s/cm² bis 1 min/cm² keine negativen Auswirkungen auf die Haut (keine gesteigerte Anzahl an Apoptosen im *Stratum basale*, Möglichkeit der Regeneration des aufgelockerten *Stratum corneum* von basal, (Kapitel 4.3.)). Längere Behandlungszeiten von 2 min/cm² bis 5 min/cm² können jedoch zu Apoptosen in für die Zellregeneration bedeutenden Schichten führen.

Im Gegensatz zu anderen Methoden zur transdermalen Penetrationssteigerung besteht bei der Plasma-vermittelten Penetrationssteigerung auf Grund der antibakteriellen Plasmaeigenschaften und der Penetrationsbeschleunigung von ausschließlich kleinen Stoffen (Größe unter 689 nm) ein geringeres Risiko der Infektion der behandelten Hautbereiche durch die Einwanderung von Bakterien und Pilzen. Die Plasmabehandlung stellt demnach eine zukunftssträchtige Möglichkeit zur gefahrlosen Penetrationssteigerung von Arzneistoffen durch die Hautbarriere dar.

Da die in dieser Arbeit gewonnenen Daten *in vitro* mit Hilfe eines Schweineohrmodells ermittelt wurden, ermöglichen sie einen ersten Einblick in die Reaktion der gesunden menschlichen Haut auf die Plasmabehandlung, lassen sich jedoch nicht eins zu eins auf die *in vivo*-Situation am menschlichen Körper übertragen. Zudem sollte bei der Plasmabehandlung *in vivo* beachtet werden, dass es am menschlichen Körper große intra- und interindividuelle Unterschiede in der Beschaffenheit der Hautbarriere gibt, welche zu unterschiedlich starken Effekten der Plasmabehandlung führen könnten.

Ein Vergleich der Penetrationseigenschaften weiterer Stoffe mit unterschiedlichen hydro- und lipophilen Stoffeigenschaften sowie unterschiedlichen Molekülgrößen vor und nach Plasmabehandlung wäre für weitere Forschungsarbeiten empfehlenswert. Auf diese Weise könnte erforscht werden, auf welche Substanzen die Plasmabehandlung der Haut den größten Einfluss hat und es wären weitere Rückschlüsse auf die Form der aufgelockerten Bindungen, sowie auf eine eventuelle Interaktion modifizierter *Stratum corneum*-Bestandteile mit der penetrierenden Substanz möglich. Gleichzeitig könnten die Versuche mit längeren Penetrationszeiten wiederholt werden, um zu überprüfen, ob tatsächlich eine Rechtsverschiebung des Peaks der Konzentration der penetrierten Substanzen (siehe Kapitel 3.4. und Kapitel 3.5.) in tiefere Hautbereiche stattfindet.

Ein direkter Vergleich penetrationssteigernder Methoden (beispielsweise Mikronadeln und Plasmajet) wäre interessant, um die verschiedenen Systeme auch quantitativ vergleichen zu können und zu analysieren, ob die Vorteile der plasmavermittelten Penetrationssteigerung gegenüber der Mikronadelmethode durch die Menge an penetrierter Substanz ausgeglichen werden können.

Neben den Lipiden könnte auch die Modifikation weiterer *Stratum-corneum*-Bestandteile ursächlich für die veränderten Barriereigenschaften der Haut nach Plasmabehandlung sein. Interessant wäre deshalb auch die Untersuchung der *Stratum-corneum*-Peptide und -Proteine vor und nach Plasmabehandlung.

Um die Reaktion der Haut *in vivo* auf die Plasmabehandlung besser vorhersagen zu können und damit die im Rahmen dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse in die klinische Praxis übertragen zu können, sind weitere Studien nötig. Diese könnten die *in vitro*-Experimente am Schweineohr beispielsweise auf ein *in vivo*-Mäusehautmodell übertragen. An einem frischen Mäusehautmodell wäre auch die Untersuchung längerer Penetrationszeiten sowie die Geschwindigkeit der Hautregeneration und dem damit Verbundenen Wiederaufbau der Hautbarriere nach Plasmabehandlung möglich.

Nach einer Verifizierung der Ergebnisse *in vivo* könnten die im Rahmen dieses Projekts gewonnenen Erkenntnisse in Zukunft auf den klinischen Alltag übertragen werden. Für Langzeittherapien bei speziellen Patientengruppen mit Problemen bei der oralen Medikamentenaufnahme (beispielsweise in Form von Resorptionsstörungen im Magen-Darm-Trakt) oder bei einem starken First-Pass-Effekt

des Medikaments in der Leber ist die transdermale Medikamentenapplikation eine Ausweichmöglichkeit, welche durch eine vorherige Plasmabehandlung der Haut noch verbessert werden würde.

Im Rahmen des bereits etablierten medizinischen Anwendungsfelds von kaltem Atmosphärendruckplasma bei der Behandlung chronischer Wunden könnte eine Plasmabehandlung der Wundränder und angrenzender gesunder Hautbereiche die Penetration von nach der Behandlung applizierten wundheilungsfördernden Cremes und Gels im betroffenen Gebiet beschleunigen und so die Heilungsaussichten noch weiter verbessern.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Haut (Cutis der Schweineohrhaut, ähnlich der humanen Haut, HE-Färbung).....	2
Abbildung 2: Das menschliche Stratum corneum (Abbildung modifiziert nach van Smeden et al. [3]).....	3
Abbildung 3: Interzelluläre und transzelluläre Penetration durch das Stratum corneum (Abbildung verändert nach Neubert et al. [6])	5
Abbildung 4: Die Struktur und molekulare Formation der vier Aggregatzustände fest, flüssig, gasförmig und Plasma (Abbildung INP Greifswald e.V.)	7
Abbildung 5: Rasur des frischen Schweineohrs.....	19
Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines APPJs (Abbildung nach Metelmann et al. [57]).....	20
Abbildung 7: Plasmabehandlung des frischen Schweineohrs	21
Abbildung 8: Beispielbild HE-Färbung eines Schweineohr-Hautschnittes (Zellkerne blau, Zytoplasma und Proteine rot) 23	
Abbildung 9: Beispielbild Sudanschwarz B-Färbung eines Schweineohr-Hautschnittes (Lipide schwarz, Zellkerne rot) ...	24
Abbildung 10: Beispielbild Curcumin-DAPI-Färbung (Zellkerne blau, Curcumin grün).....	26
Abbildung 11: Beispielbild für ROI-Messung zur Fluoreszenzintensitätsauswertung in Schweineohrhautbiopsie.....	29
Abbildung 12: Beispielbild TUNEL-DAPI-Färbung (Zellkerne blau, apoptotische Zellkerne grün).....	31
Abbildung 13: Corneozyten und interzelluläre Substanz haften am Corneofix (erste Schicht) (Aufnahme mittels Hellfeldmikroskopie, ungefärbt).....	33
Abbildung 14: Einfluss der Tape stripping-Prozedur auf die Morphologie des Stratum corneum; normale Schweineohrhaut (links) und Schweineohrhaut nach 20 mal Tape stripping (rechts), HE-Färbung.....	34
Abbildung 15: Kalibrationskurve Ibuprofen.....	37
Abbildung 16: Schweineohr, HE-Färbung, vierzigfache Vergrößerung mit Hellfeldmikroskop, Plasmabehandlung mit kINPen 09, 3 sl/m Argongas, 9 mm Abstand der Haut zur Plasmaquelle,	41
Abbildung 17: Schweineohr, Sudanschwarz B-Färbung, vierzigfache Vergrößerung mit Hellfeldmikroskop, Plasmabehandlung mit kINPen 09, 3 sl/m Argongas, 9 mm Abstand der Haut zur Plasmaquelle,	42
Abbildung 18: Schweineohr, HE-Färbung, zehnfache Vergrößerung mit Hellfeldmikroskop, Plasmabehandlung mit kINPen 09, 3 sl/m Argongas, 9 mm Abstand,	43
Abbildung 19: Schweineohr, HE-Färbung, zehnfache Vergrößerung mit Hellfeldmikroskop,.....	44
Abbildung 20: TUNEL-Färbung zur Darstellung der apoptotischen Zellen in der Epidermis der Schweineohrhaut;	47
Abbildung 21: Ausgewanderte Zellen aus den Schweineohrbiopsien nach 48 h Inkubationszeit, Aufnahme mit dem Hellfeldmikroskop; inkubierten Biopsie mit auswandernden Zellen (links); ausgewanderte Zellen im Medium verteilt (rechts).....	48
Abbildung 22: Beispiel-Bilder für Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Schweinehaut mit Curcumin: Curcumin grün, Zellkerne blau,	49
Abbildung 23: Mittelwert der Curcumin-Fluoreszenzintensität in 45 ROI ohne Plasmabehandlung (blau) und nach 1 min/cm ² Plasmabehandlung (rot), sowie jeweils die 10. und 90. Perzentile der Messwerte	51
Abbildung 24: Mittelwerte (n=45) der Fluoreszenzintensität in der Epidermis vor (blau) und nach 1 min Plasmabehandlung/cm ² (rot) mit Standardabweichung (SD) und p-Werten (*= p < 0,05; **= p < 0,01; ***= p < 0,001) 52	
Abbildung 25: Differenz zwischen den Kurven der Mittelwerte vor und nach Plasmabehandlung aus Abbildung 23	53
Abbildung 26: Mittelwert (n = 3) der extrahierten Ibuprofenmenge der drei Bioreplikate in µg/cm ² pro Schicht ohne Plasmabehandlung (blaue Kreise) und nach 1 min/cm ² Plasmabehandlung (rote Kästen) mit technischen Replikaten (jeweils ein technisches Replikat pro Bioreplikat), Standardabweichung (schwarze Linie); 1 min/cm ² Plasmabehandlung mit kINPen, Argon-Gasfluss 3 slm, 9 mm Abstand; 1 h Penetrationszeit, Extraktionsprotokoll siehe Kapitel 2.2.5.3., Messung mittels HPLC/ MS	54
Abbildung 27: Differenz zwischen den Kurven der Mittelwerte der 3 Bioreplikate des extrahierten Ibuprofens (in µg/cm ²) vor und nach Plasmabehandlung abhängig von der Tiefe der Haut aus Abbildung 26	55
Abbildung 28: Anzahl der mittels LipidSearch identifizierten Lipidspezies in 20 Schichten des unbehandelten und mit Plasma behandelten Stratum corneum. Das Venn Diagramm wurde von Johanna Striesow in R erstellt.	57
Abbildung 29: Lipidabundanz-Profil der unterschiedlichen Schichten des unbehandelten Stratum corneum und unter Einfluss einer Plasmabehandlung für 15 s/cm ² und 1 min/cm ² . Das Diagramm wurde von Johanna Striesow erstellt....	59
Abbildung 30: Abundanzen der identifizierten Triacylglycerol-Oxidationsprodukte in den jeweiligen Schichten des Stratum corneum. Das Diagramm wurde von Johanna Striesow erstellt.	60
Abbildung 31: Gewicht des entnommenen Stratum corneum pro Tape strip für unbehandelte Haut (Control), nach 1 min/cm ² Gasflussbehandlung (Argongas) und nach 1 min/cm ² Plasmabehandlung	61

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Dauer der untersuchten Plasmabehandlungszeit in den jeweiligen Experimenten	22
Tabelle 2: Curcumin-Mikroskopie: Einstellungen für Laser, Emission, Absorption, Smart Gain und Smart Offset	28
Tabelle 3: TUNEL-Mikroskopie: Einstellungen für Laser, Emission, Absorption, Smart Gain und Smart Offset	32
Tabelle 4: Flussgradient für die LC- Trennung von Hautlipiden	39

8 Abkürzungsverzeichnis

CAP	Cold atmospheric plasma
DBD	Dielectric barrier discharge
APPJ	Atmospheric pressure plasma jet
RONs	Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies
DOPC	Di-oleoylphosphatidylcholine
SUV	Small unilamellar vesicle
POPC	Palmitoyl-Oleoyl-sn-Glycero-Phosphocholine
MD	Molekulardynamik-Simulation
MS	Massenspektrometrie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
PBS w/o Ca, Mg	Phosphate buffered saline without Calcium, Magnesium
PFA	Paraformaldehyd
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
HE	Hämatoxylin-Eosin
CLSM	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
ROI	Region of interest
tdt	terminal desoxynucleotidyl transferase
MRM	Multiple reaction monitoring
(U)HPLC	Ultra high performance liquid chromatography
LOQ	Limit of quantification
LOD	Limit of detection
s.c.	<i>Stratum corneum</i>

9 Literatur

- 1 *Lüllmann-Rauch R, Hrsg.* Taschenlehrbuch Histologie. Haut und Hautanhangsgebilde. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2003; 519-543
- 2 *Koehler MJ, Vogel T, Elsner P et al.* In vivo measurement of the human epidermal thickness in different localizations by multiphoton laser tomography. *Skin research and technology: official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)* 2010; 16: 259 – 264
- 3 *van Smeden J, Janssens M, Gooris GS et al.* The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochimica et biophysica acta* 2014; 1841: 295 – 313
- 4 Pappas A. Epidermal surface lipids. *Dermato-Endocrinology* 2009; 1(2): 72-76
- 5 *Krause, Sylvia Annett.* Entwicklung und Charakterisierung von Mikroemulsionen zur dermalen Applikation von Arzneistoffen. Transport von Arzneistoffen [Dissertation]. Halle (Saale): Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; 2001, 4-6
- 6 *Neubert RHH, Wepf R.* Stratum corneum: Struktur und Morphologie einer Barriere. Wege durch

- die Hornschicht. Pharmazeutische Zeitung online - Die Zeitschrift der deutschen Apotheker 23.04.2007. Ausgabe 17; 2007
- 7 Powers MS, Schenkel L, Darley PE *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of transdermal dosage forms of 17 β -estradiol: Comparison with conventional oral estrogens used for hormone replacement Marilou. American journal of obstetrics and gynecology 1985; 8: 152 – 160
 - 8 Marwah H, Garg T, Goyal AK *et al.* Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. Drug delivery 2016; 23: 564 – 578
 - 9 Lademann O, Richter H, Kramer A *et al.* Stimulation of the penetration of particles into the skin by plasma tissue interaction. Laser Physics Letters 2011; 8: 758 – 764
 - 10 Akhtar N, Singh V, Yusuf M *et al.* Non-invasive drug delivery technology: development and current status of transdermal drug delivery devices, techniques and biomedical applications. Biomedizinische Technik. Biomedical engineering 2020, Ahead of publication
 - 11 Metelmann H-R, von Woedtke T, Weltmann K-D, Hrsg. Plasmamedizin. Kaltplasma in der medizinischen Anwendung. Begriffsdefinition "Plasma" (4-5); Plasmamedizin – ein neues Feld medizinischer Forschung und Anwendung (18-19); Grundlegende Mechanismen der biologischen Plasmawirkung (20-23); Wirkung auf Flüssigkeiten (37). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2016
 - 12 Fußmann G. Einführung in die Plasmaphysik. Vorlesung an der Humboldt Universität zu Berlin. Berlin; 2001; 148
 - 13 Kaufmann M. Plasmaphysik und Fusionsforschung. Einleitung. 1. Aufl. Wiesbaden: Springer Spektrum; 2013; 1-17
 - 14 Yan D, Sherman JH, Keidar M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. Oncotarget 2016; 3: 15977 – 15995
 - 15 Lührmann A. Einfluss von kaltem Atmosphärendruck-Argon-Plasma auf die Antibiotikaempfindlichkeit von Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus-Stämmen in vitro. Physikalisches Plasma, der sogenannte vierte Aggregatzustand [Dissertation]. Greifswald: Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald; 2018; 3-5
 - 16 Weltmann K-D, Kindel E, Brandenburg R *et al.* Atmospheric Pressure Plasma Jet for Medical Therapy: Plasma Parameters and Risk Estimation. Contributions to Plasma Physics 2009; 49: 631 – 640
 - 17 von Woedtke T, Metelmann H-R, Weltmann KD. Plasmamedizin - innovative Physik für medizinische Anwendungen. Naturwissenschaftliche Rundschau 2017; 70: 48 – 54
 - 18 Assadian O, Ousey KJ, Daeschlein G *et al.* Effects and safety of atmospheric low-temperature plasma on bacterial reduction in chronic wounds and wound size reduction: A systematic review and meta-analysis. International wound journal 2019; 16: 103 – 111
 - 19 von Woedtke T, Schmidt A, Bekeschus S *et al.* Plasma Medicine: A Field of Applied Redox Biology. In vivo (Athens, Greece) 2019; 33: 1011 – 1026
 - 20 Liedtke KR, Diedrich S, Pati O *et al.* Cold Physical Plasma Selectively Elicits Apoptosis in Murine Pancreatic Cancer Cells In Vitro and In Ovo. Anticancer research 2018; 38: 5655 – 5663
 - 21 Metelmann H-R, Nedrelov DS, Seebauer C *et al.* Head and neck cancer treatment and physical plasma. Clinical Plasma Medicine 2015; 3: 17 – 23
 - 22 Bekeschus S, Brüggemeier J, Hackbarth C *et al.* Platelets are key in cold physical plasma-facilitated blood coagulation in mice. Clinical Plasma Medicine 2017; 7-8: 58 – 65
 - 23 Schmidt A, Bekeschus S, Wende K *et al.* A cold plasma jet accelerates wound healing in a murine model of full-thickness skin wounds. Experimental dermatology 2017; 26: 156 – 162
 - 24 Boeckmann L, Bernhardt T, Schäfer M *et al.* Aktuelle Indikationen der Plasmatherapie in der Dermatologie. Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete 2020; 71: 109 – 113
 - 25 Bernhardt T, Semmler ML, Schäfer M *et al.* Plasma Medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. Oxidative medicine and cellular longevity 2019;

2019: 3873928

- 26 *Stratmann B, Costea T-C, Nolte C et al.* Effect of Cold Atmospheric Plasma Therapy vs Standard Therapy Placebo on Wound Healing in Patients With Diabetic Foot Ulcers: A Randomized Clinical Trial. A Randomized Clinical Trial. *JAMA network open* 2020; 3: e2010411
- 27 *Heinlin J, Isbary G, Stolz W et al.* Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 2011; 25: 1 – 11
- 28 *Daeschlein G, Scholz S, Ahmed R et al.* Cold plasma is well-tolerated and does not disturb skin barrier or reduce skin moisture. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 2012; 10: 509 – 515
- 29 *van der Linde J, Liedtke KR, Matthes R et al.* Repeated Cold Atmospheric Plasma Application to Intact Skin Does Not Cause Sensitization in a Standardized Murine Model. *Plasma Medicine* 2017; 7: 383 – 393
- 30 *Fluhr JW, Sassning S, Lademann O et al.* In vivo skin treatment with tissue-tolerable plasma influences skin physiology and antioxidant profile in human stratum corneum. *Experimental dermatology* 2012; 21: 130 – 134
- 31 *Lademann O, Richter H, Meinke MC et al.* Drug delivery through the skin barrier enhanced by treatment with tissue-tolerable plasma. *Experimental dermatology* 2011; 20: 488 – 490
- 32 *Choi J-H, Nam S-H, Song Y-S et al.* Treatment with low-temperature atmospheric pressure plasma enhances cutaneous delivery of epidermal growth factor by regulating E-cadherin-mediated cell junctions. *Archives of dermatological research* 2014; 306: 635 – 643
- 33 *Gelker M, Mrotzek J, Ichter A et al.* Influence of pulse characteristics and power density on stratum corneum permeabilization by dielectric barrier discharge. *Biochimica et biophysica acta. General subjects* 2019; 10: 1513 – 1523
- 34 *Gelker M, Müller-Goymann CC, Viöl W.* Permeabilization of human stratum corneum and full-thickness skin samples by a direct dielectric barrier discharge. *Clinical Plasma Medicine* 2018; 9: 34 – 40
- 35 *Shimizu K, Hayashida K, Blajan M.* Novel method to improve transdermal drug delivery by atmospheric microplasma irradiation. *Biointerphases* 2015; 10: 1 - 9
- 36 *Kristof J, Miyamoto H, Tran AN et al.* Feasibility of transdermal delivery of Cyclosporine A using plasma discharges. *Biointerphases* 2017; 12: 1-11
- 37 *Privat-Maldonado A, Schmidt A, Lin A et al.* ROS from Physical Plasmas: Redox Chemistry for Biomedical Therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2019: 1 – 29
- 38 *Arndt S, Schmidt A, Karrer S et al.* Comparing two different plasma devices kINPen and Adtec SteriPlas regarding their molecular and cellular effects on wound healing. *Clinical Plasma Medicine* 2018; 9: 24 – 33
- 39 *Semmler ML, Bekeschus S, Schäfer M et al.* Molecular Mechanisms of the Efficacy of Cold Atmospheric Pressure Plasma (CAP) in Cancer Treatment. *Cancers* 2020; 12: 269 – 281
- 40 *Okazaki Y, Saito K.* Roles of lipids as signaling molecules and mitigators during stress response in plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 2014; 79: 584 – 596
- 41 *Ahn HJ, Kim KI, Kim G et al.* Atmospheric-pressure plasma jet induces apoptosis involving mitochondria via generation of free radicals. *PloS one* 2011; 6: e28154
- 42 *Brun P, Vono M, Venier P et al.* Disinfection of ocular cells and tissues by atmospheric-pressure cold plasma. *PloS one* 2012; 7: e33245
- 43 *Schmidt A, Wende K, Bekeschus S et al.* Non-thermal plasma treatment is associated with changes in transcriptome of human epithelial skin cells. *Free radical research* 2013; 47: 577 – 592
- 44 *Klinkhammer C, Verlackt C, Śmiłowicz D et al.* Elucidation of Plasma-induced Chemical Modifications on Glutathione and Glutathione Disulphide. *Scientific reports* 2017; 7: 13828
- 45 *Lackmann J-W, Wende K, Verlackt C et al.* Chemical fingerprints of cold physical plasmas - an experimental and computational study using cysteine as tracer compound. *Scientific reports*

2018; 8: 7736

- 46 *Wende K, Barton A., Bekeschus S et al.* Proteomic Tools to Characterize Non-Thermal Plasma Effects in Eukaryotic Cells. *Plasma Medicine*; 2013; 3: 81 – 95
- 47 *Suda Y, Tero R, Yamashita R et al.* Reduction in lateral lipid mobility of lipid bilayer membrane by atmospheric pressure plasma irradiation. *Japanese Journal of Applied Physics* 2016; 55: 03DF05
- 48 *Maheux S, Frache G, Thomann JS et al.* Small unilamellar liposomes as a membrane model for cell inactivation by cold atmospheric plasma treatment. *Journal of Physics D: Applied Physics* 2016; 49: 344001
- 49 *Yusupov M, Wende K, Kupsch S et al.* Effect of head group and lipid tail oxidation in the cell membrane revealed through integrated simulations and experiments. *Scientific reports* 2017; 7: 5761
- 50 *Marschewski M, Hirschberg J, Omairi T et al.* Electron spectroscopic analysis of the human lipid skin barrier: cold atmospheric plasma-induced changes in lipid composition. *Experimental dermatology* 2012; 21: 921 – 925
- 51 *Striesow J, Lackmann J-W, Ni Z et al.* Oxidative modification of skin lipids by cold atmospheric plasma (CAP): A standardizable approach using RP-LC/MS2 and DI-ESI/MS2. *Chemistry and physics of lipids* 2020; 226: 104786
- 52 *Hirschberg J, Loewenthal L, Krupp A et al.* Plasma Induced Changes in Human Lipid Composition as Revealed through XPS-Analysis. *NS* 2016; 08: 125 – 137
- 53 *Godin B, Touitou E.* Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Advanced drug delivery reviews* 2007; 59: 1152 – 1161
- 54 *Klang V, Schwarz JC, Lenobel B et al.* In vitro vs. in vivo tape stripping: validation of the porcine ear model and penetration assessment of novel sucrose stearate emulsions. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics (Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V)* 2012; 80: 604 – 614
- 55 *Brickert B, Lenhardt M.* Fingerreplantation und mikrochirurgischer Daumenersatz. *Trauma und Berufskrankheit*; 2011; 13: 90 – 96
- 56 *Reuter S, von Woedtke T, Weltmann K-D.* The kINPen—a review on physics and chemistry of the atmospheric pressure plasma jet and its applications. *Journal of Physics D: Applied Physics* 2018; 51: 233001
- 57 *Metelmann H-R, Vu TT, Do HT et al.* Scar formation of laser skin lesions after cold atmospheric pressure plasma (CAP) treatment: A clinical long term observation. *Clinical Plasma Medicine* 2013; 1: 30 – 35
- 58 *Bussiahn R, Lembke N, Gesche R et al.* Plasmaquellen für biomedizinische Applikationen. *Hygiene & Medizin*; 2013: 212 – 216
- 59 *Schmidt-Bleker A, Winter J, Iseni S et al.* Reactive species output of a plasma jet with a shielding gas device—combination of FTIR absorption spectroscopy and gas phase modelling. *Journal of Physics D: Applied Physics* 2014; 47: 145201
- 60 *Brehmer F, Haenssle HA, Daeschlein G et al.* Alleviation of chronic venous leg ulcers with a hand-held dielectric barrier discharge plasma generator (PlasmaDerm®) VU-2010): results of a monocentric, two-armed, open, prospective, randomized and controlled trial (NCT01415622). *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2015; 29: 148 – 155
- 61 *Mulisch M, Welsch U, Aescht E, Büchel-Zimmermann S, Nurmester A, Dänhardt-Pfeiffer S, Desel C, Hamers C, Jach G, Kässens M, Markobitzky J, Nixdorf-Bergweiler B, Pütz D, Riedelsheimer B, van den Boom F, Wegerhoff R, Hrsg.* *Romeis Mikroskopische Technik. Hämatoxilin-Eosin-Färbung (201-203); Sudanschwarz B-Färbung (226); Mikroskopische Verfahren (12-15); DAPI-Färbung (396); Konfokale Mikroskopie (22-24).* 18. Aufl. Heidelberg: Spektrum akademischer Verlag; 2010
- 62 *Teichmann A, Heuschkel S, Jacobi U et al.* Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics (Arbeitsgemeinschaft für*

- Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V) 2007; 67: 699 – 706
- 63 *Klang V, Schwarz JC, Lenobel B et al.* In vitro vs. in vivo tape stripping: validation of the porcine ear model and penetration assessment of novel sucrose stearate emulsions. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics (Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V) 2012; 80: 604 – 614
- 64 *Sidgwick GP, McGeorge D, Bayat A.* Functional testing of topical skin formulations using an optimised ex vivo skin organ culture model. Archives of dermatological research 2016; 308: 297 – 308
- 65 *Langan EA, Philpott MP, Kloeppe JE et al.* Human hair follicle organ culture: theory, application and perspectives. Experimental dermatology 2015; 24: 903 – 911
- 66 *Loo DT.* TUNEL Assay. An Overview of Techniques. Methods in Molecular Biology 2002; 203: 21 – 30
- 67 *Hasse S, Duong Tran T, Hahn O et al.* Induction of proliferation of basal epidermal keratinocytes by cold atmospheric-pressure plasma. Clinical and experimental dermatology 2016; 41: 202 – 209
- 68 *Berdyshev E, Goleva E, Bronova I et al.* Lipid abnormalities in atopic skin are driven by type 2 cytokines. JCI insight 2018; 3
- 69 *Sadowski T, Klose C, Gerl MJ et al.* Large-scale human skin lipidomics by quantitative, high-throughput shotgun mass spectrometry. Scientific reports 2017; 7: 43761
- 70 *Koppes SA, Brans R, Ljubojevic Hadzavdic S et al.* Stratum Corneum Tape Stripping: Monitoring of Inflammatory Mediators in Atopic Dermatitis Patients Using Topical Therapy. International archives of allergy and immunology 2016; 170: 187 – 193
- 71 *t'Kindt R, Jorge L, Dumont E et al.* Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Analytical chemistry 2012; 84: 403 – 411
- 72 *Lüllmann H, Mohr K, Hein L, Hrsg.* Taschenatlas Pharmakologie. Antipyretische Analgetika. 7. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2015; 202
- 73 *Tegeder I, Muth-Selbac U, Lötsch J et al.* PHARMACOKINETICS AND DRUG DISPOSITION. Application of microdialysis for the determination of muscle and subcutaneous tissue concentrations after oral and topical ibuprofen administration. CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS 1998; 65: 357 – 368
- 74 *Herkenne C, Naik A, Kalia YN et al.* Effect of propylene glycol on ibuprofen absorption into human skin in vivo. Journal of pharmaceutical sciences 2008; 97: 185 – 197
- 75 *Höring M, Ejsing CS, Hermansson M et al.* Quantification of Cholesterol and Cholesteryl Ester by Direct Flow Injection High-Resolution Fourier Transform Mass Spectrometry Utilizing Species-Specific Response Factors. Analytical chemistry 2019; 91: 3459 – 3466
- 76 *Vandersee S, Lademann J, Richter H et al.* Comparison of tissue damage caused by various laser systems with tissue tolerable plasma by light and laser scan microscopy. Laser Physics Letters 2013; 10: 105602
- 77 *Woedtke T von, Metelmann H-R, Weltmann K-D.* Editorial. Clinical Plasma Medicine 2013; 1: 1 – 2
- 78 *Dobrynin D, Wu A, Kalghatgi S et al.* Live Pig Skin Tissue and Wound Toxicity of Cold Plasma Treatment. Plasma Medicine 2011; 1: 93 – 108
- 79 *Kos S, Blagus T, Cemazar M et al.* Safety aspects of atmospheric pressure helium plasma jet operation on skin: In vivo study on mouse skin. PloS one 2017; 12: e0174966
- 80 *Thao Duong T.* Ex-vivo-Untersuchung zum Einfluss der Plasmabehandlung von menschlicher Haut mittels Atmosphärendruck-Plasmajet KINPen® MED auf molekularer Ebene. Apoptose [Dissertation]. Greifswald: Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald; 2016; 33-35
- 81 *Daeschlein G, Scholz S, Ahmed R et al.* Cold plasma is well-tolerated and does not disturb skin barrier or reduce skin moisture. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG 2012; 10: 509 – 515
- 82 *Lademann J, Richter H, Alborova A et al.* Risk assessment of application of a plasma jet in

- dermatology. *Journal of Biomedical Optics* 2009; 14
- 83 *Steinert PM, Marekov LN*. The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isopeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 17702 – 17711
- 84 *Meckfessel MH, Brandt S*. The structure, function, and importance of ceramides in skin and their use as therapeutic agents in skin-care products. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2014; 71: 177 – 184
- 85 *Choi MJ, Maibach HI*. Role of Ceramides in Barrier Function of Healthy and Diseased Skin. *Am J Clin Dermatol* 2005; 6: 215 – 223
- 86 *Wertz PW, Madison KC, Downing D.T*. Covalently Bound Lipids of Human Stratum Corneum. *Journal of Investigative Dermatology* 1989: 109 – 111
- 87 *van der Paal J, Verlackt CC, Yusupov M et al*. Structural modification of the skin barrier by OH radicals: a reactive molecular dynamics study for plasma medicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2015; 48: 155202
- 88 *Lasch J, Schönfelder U, Walke M et al*. Oxidative damage of human skin lipids. *Lipids and Lipid Metabolism. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1997; 1349: 171 – 181
- 89 *Radner FPW, Fischer J*. The important role of epidermal triacylglycerol metabolism for maintenance of the skin permeability barrier function. *Biochimica et biophysica acta* 2014; 1841: 409 – 415
- 90 *Xia W, Budge SM*. Techniques for the Analysis of Minor Lipid Oxidation Products Derived from Triacylglycerols: Epoxides, Alcohols, and Ketones. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 2017; 16: 735 – 758
- 91 *Coliva G, Lange M, Colombo S et al*. Sphingomyelins Prevent Propagation of Lipid Peroxidation-LC-MS/MS Evaluation of Inhibition Mechanisms. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2020; 25: 1 – 12
- 92 *Schmidt A, Liebelt G, Striesow J et al*. The molecular and physiological consequences of cold plasma treatment in murine skin and its barrier function. *Free radical biology & medicine* 2020; 161: 32 – 49
- 93 *Lademann J, Patzelt A, Richter H et al*. Nanocapsules for drug delivery through the skin barrier by tissue-tolerable plasma. *Laser Physics Letters* 2013; 10

Kongresse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen von Vorträgen auf zwei Kongressen präsentiert:

International Meeting on Plasma Cosmetic Science, Orléans, Frankreich, 25.11.2019 – 27.11.2019

Titel: Effects of plasma-induced lipoxidation on the penetration behavior of drugs into the *Stratum corneum* in a porcine ear model

Paula Sophie Marx, Kristian Wende, Johanna Striesow, K.-D. Weltmann, T. von Woedtke
Leibniz Institute for Plasma Science and Technology (INP), Greifswald, Germany

8th Young Professionals Workshop on Plasma Medicine - Frontiers in Redox Biology and Medicine (FiRBaM), Greifswald, Germany, 05.08.2019 - 08.08.2019

Titel: Effects of plasma-induced lipoxidation on the penetration behavior of drugs into the *Stratum corneum*

Paula Sophie Marx, Johanna Striesow, Jan-Wilm Lackmann, T. von Woedtke, Kristian Wende
Leibniz Institute for Plasma Science and Technology (INP), Greifswald, Germany

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

Danksagung

Auf diesem Wege möchte ich die Möglichkeit ergreifen, mich bei den vielen Personen zu bedanken, welche mich im Rahmen dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor von Woedtke danken, welcher mir die Möglichkeit gab, am Institut wissenschaftlich zu arbeiten, immer ein offenes Ohr für mich hatte und sich besonders beim schriftlichen Teil der Arbeit außerordentlich viel Zeit für mich nahm. Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Doktor Kristian Wende für das interessante Thema, die sehr gute Betreuung während des gesamten Projekts und seine ideenreichen und wegweisenden Anregungen. Besonderer Dank gilt Johanna Striesow, welche mich einarbeitete, mir die Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens vermittelte und mich die ganze Promotionszeit über begleitete. Ihre Unterstützung im experimentellen Teil der Arbeit und ihre Fachkenntnisse im Bereich der HPLC/MS waren für mich von sehr großer Bedeutung. Ebenso möchte ich Giuliana Bruno danken, welche mir ebenfalls mit ihrem technischen Wissen zur Seite stand und immer eine gute und vertrauensvolle Ansprechpartnerin für mich war. Für das freundliche Klima und das kameradschaftliche Miteinander, die zielführenden Diskussionen und die fachlichen Ratschläge möchte ich meiner gesamten Arbeitsgruppe danken: Jan-Wilm Lackmann, Zahra Nasri, Sebastian Wenske, Mehdi Ravandeh und Christin Siedler. An dieser Stelle möchte ich ins besondere meiner Familie, allen voran meinen Eltern und meinem Freund, für die unermüdliche Stärkung, die stetigen Ermunterungen und den moralischen Rückhalt danken, ohne deren Unterstützung diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.