

Aus dem Institut für Hygiene und Umweltmedizin
(Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Axel Kramer)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Untersuchungen zur Reiz- und Inflammationswirkung von atmosphärischem
Niedertemperaturplasma auf die Chorionallantoismembran des bebrüteten
Hühnereis**

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Wissenschaften in der Medizin
(Dr. rer. med.)
der
Universitätsmedizin
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald

2012

vorgelegt von: Claudia Petra Bender
geboren am: 23.10.1968
in Siegen

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2008 bis Mai 2012 am Institut für Hygiene und Umweltmedizin, Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Projektes Campus PlasmaMed (BMBF Förderkennzeichen 13N9779) und basiert auf den **Publikationen** von:

- **Bender C**, Matthes R, Kindel E, Kramer A, Lademann J, Weltmann KD, Eisenbeiß W, Hübner NH. The Irritation Potential of Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma in the HET-CAM. *Plasma Process. Polym.* 2010; 7 (3-4) 318–326.
- **Bender C**, Partecke LI, Kindel E, Döring F, Lademann J, Heidecke CD, Kramer A, Hübner NO. The modified HET-CAM as a model for the assessment of the inflammatory response to tissue tolerable plasma. *Toxicology in vitro.* 2011; 25, 530-537

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reiner Biffar

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Axel Kramer

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr.-Ing. Jürgen Lademann

Tag der Disputation: Mittwoch, 20. Februar 2013

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum der Klinik für MKG-Chirurgie, O 0.221

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APPJ	Atmospheric pressure plasma jet (Atmosphärendruck Plasma-Jet)
DBD	Dielectric Barrier Discharge (Dielektrisch behinderte Entladung)
CAM	Chorioallantoismembran
d	Tag(e)
f	Frequenz
h	Stunde(n)
HET-CAM	Hen's egg test on the chorioallantoic membrane (Hühnereitest an der Chorioallantoismembran)
HC	Hydrocortison
KI	Konfidenzintervall
Ko	Kontrollgruppe
kV	Kilovolt
LEI	Leukozyten-Endothel Interaktion
LMAP	UltraPure® Low-Melting-Agarosepellet(s)
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
ml	Milliliter
ms	Millisekunde(n)
MSSI	Mittelwerte der Scoresummen für die Inflammationswirkung
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
O	Sauerstoff
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoff Spezies)
RNS	ractive nitrogen species (reaktive Stickstoff Spezies)
sccm	Standardkubikzentimeter
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
slm	Standardliter pro Minute
SMR	Scoremittelwert für die Reizwirkung
SS	Scoresumme
Tab.	Tabelle

TTP	tissue tolerable plasma (gewebeverträgliches Plasma)
U_{pp}	Spannung von Peak zu Peak
VALO SPF	Vakzine Lohmann spezifisch pathogenfrei
W	Watt
W_f	Watt foreward (Eingangsleistung)
W_r	Watt reflected reflektierte Leistung
μs	Mikrosekunden

Inhaltsverzeichnis

1. Problemstellung und Einleitung	8
1.1. Problemstellung.....	8
1.2. Physikalisches Plasma.....	9
1.3. Plasmamedizin.....	10
1.3.1 Medizinische Einsatzoptionen für Plasma.....	10
1.3.2 Plasma zur Wundbehandlung.....	11
1.4. Der HET-CAM als Modell für Reiz- und Inflammationswirkung.....	12
2. Material und Methoden.....	13
2.1. Plasmaquellen.....	13
2.1.1 Plasmaquellen zur Untersuchung der Reizwirkung.....	13
2.1.2 Plasmaquelle zur Untersuchung der Inflammationswirkung.....	14
2.2. Eier.....	15
2.3. Untersuchungen zur Reizwirkung.....	16
2.3.1 Kontrollen.....	17
2.3.2 Plasmabehandlungen.....	18
2.4. Untersuchungen zur Inflammationswirkung.....	18
2.4.1 Kontrollen.....	20
2.4.2 Plasma- bzw. Gasbehandlungen.....	21
3. Ergebnisse.....	21
3.1 Ergebnisse zur Reizwirkung von Plasma.....	21
3.2 Ergebnisse zur Inflammationswirkung von Plasma.....	24
4. Diskussion.....	27
4.1 Entstehung der CAM und Eignung als Modell zur Prüfung von Plasma auf Reiz- und Inflammationswirkung.....	27
4.2 Einfluss von Temperatur und Gasfluss.....	29
4.3 Plasmaeffekte und Dosis-Wirkungs-Beziehungen.....	31
4.4 Weiterführende Gedanken und Schlussfolgerung.....	35

5. Zusammenfassung.....	40
6. Summary.....	42
7. Literaturverzeichnis.....	44
Anhang.....	51
Danksagung	
Eidesstattliche Erklärung	
Lebenslauf	
Publikationen	

1. Problemstellung und Einleitung

1.1. Problemstellung

Durch die Entwicklung von Plasmaquellen mit Temperaturspektren im physiologischen Bereich oder knapp darüber entstanden in den letzten 10-15 Jahren neue Optionen für die Anwendung von physikalischen Atmosphärendruckplasmen in der Medizin. Da die antibakterielle Wirkung von Plasma bereits langjährig bekannt ist (Moisan et al., 2001; Haddow et al., 2003), entwickelte sich die plasmatherapeutische Behandlung von chronischen Wunden als ein besonders aussichtsreiches Einsatzgebiet, da es hier in Folge der fehlenden Evidenz in der Wundbehandlung an standardisierten Behandlungskonzepten mangelt (Kramer et al., 2008) bei zugleich immensen Behandlungskosten, die aufgrund des demografischen Verlaufs weiter steigen (Ruckley, 1997).

Eine essentielle Bedingung für die Behandlung von menschlichem und tierischem Gewebe stellt die Gewebeverträglichkeit dar. Das beinhaltet, dass die Plasmaanwendung nur bedingte Reiz- und Inflammationswirkungen ausüben und zu keiner dauerhaften Gewebeschädigung führen darf. Bisher bestand weitgehende Unkenntnis über die Effekte von Plasma auf sensible Gewebe wie Wunden, Auge oder Schleimhäute. Um eine Risikoabschätzung treffen zu können und um geeignete Anwendungsparameter für die Plasmatherapie zu determinieren, bedarf es eines Systems, mit dem Reiz- und Inflammationswirkungen erfasst und in Form von Dosis-Wirkungs-Beziehungen beurteilt werden können. Dafür ist der HET-CAM (Hühnereitest an der Chorioallantoismembran) geeignet, denn er bietet die Vorteile eines vitalen vaskularisierten Gewebes, an dem funktionelle Veränderungen makroskopisch gut erfasst werden können. Zugleich stellt der HET-CAM keinen Tierversuch dar, da die Versuche nicht am Tier, sondern an der CAM des Hühnerembryos bis zum 11. Bebrütungstag durchgeführt werden, was sowohl nach geltender Rechtsprechung als auch unter pathozentrischer Betrachtung nicht als Tierversuch einzustufen ist. Durch Modifikation des klassischen HET-CAM und Adaptation eines Scoring-Systems bietet das Modell die Möglichkeit, sowohl unmittelbare Reizwirkungen als auch intermediäre inflammatorische Effekte inklusive der inflammationsassoziierten Angiogenese zu beurteilen.

1.2. Physikalisches Plasma

Als physikalisches Plasma wird der 4. Aggregatzustand von Materie nach fest, flüssig und gasförmig bezeichnet. Plasma ist ein komplexes Gemisch u. a. aus ionisierten und neutralen Teilchen, Radikalen, UV-Strahlung, elektromagnetischen Feldern und Wärme. Der Plasmazustand entsteht durch hohe Energiezufuhr und ist unter atmosphärischen Bedingungen äußerst reaktiv und instabil. Schon 1883 wurden erste Beobachtungen über einen sogenannten 4. „strahlenden“ Aggregatzustand der Materie durch den britischen Chemiker und Physiker William Crookes (Crookes, 1883) bei Experimenten mit Kathodenstrahlen beschrieben. Im Jahr 1928 prägte Langmuir den Begriff Plasma in Anlehnung an das Blutplasma (gr. πλάσμα plásma „Gebilde“)(Langmuir, 1928), da er bereits damals erkannt hatte, dass es sich bei physikalischem Plasma wie beim Blutplasma um eine Mischung verschiedenster Komponenten handelt.

Natürliche Plasmen sind sowohl terrestrisch (Blitz) als auch astrophysikalisch sichtbar (Sonne, Polarlicht). Von aller sichtbaren Materie befindet sich über 99% im Plasmazustand. Die technische Erzeugung von physikalischem Plasma geschieht heute üblicherweise durch die Anregung mittels elektrischer Energie und wird in der Industrie seit Jahrzehnten zur Oberflächenveränderung (Chu et al., 2002; Inagaki, 1996) und zur Lichtemission z.B. beim Plasmafernseher und für Lichtquellen genutzt. Darüber hinaus besitzt Plasma antiseptische Eigenschaften und wird zur Sterilisation von Medizinprodukten genutzt (Martens et al., 1998).

Im thermischen Plasma haben die Schwerteilchen (Moleküle, Atome, Ionen) die gleiche Temperatur wie die von ihnen abgelösten Elektronen, dem hingegen haben die Elektronen in nicht-thermischen oder kalten Plasmen eine deutlich höhere Temperatur als die Schwerteilchen. Typischerweise liegen Niederdruckplasmen (Atmosphärendruckplasmen) als kalte Plasmen vor und finden als solche Anwendung in der Medizin.

Medizinisch eingesetzte Plasmen lassen sich durch unterschiedliche elektrophysikalische Verfahren erzeugen. So unterscheidet man direkte Plasmen, bei denen das Gewebe die Gegenelektrode darstellt (z.B. Dielectric Barrier Discharge, DBD)(Bussiahn et al., 2010) und sich das Plasma über eine nur wenig leitende Struktur (Luft oder Trägergas) als Barriere ausbildet (Fridman et al., 2008), und indirekte Plasmen, bei denen das Plasma zwischen zwei Elektroden erzeugt und mittels

Gasstrom zum Target gelangt, wie z.B. bei dem Atmosphärendruck Plasma-Jet (Atmospheric pressure plasma jet, APPJ) kINPen09 (Weltmann et al., 2009). Darüber hinaus gibt es Hybrid-Techniken beider Verfahren (Morfill et al., 2009). Je nach dem, ob das Plasma konstant oder pulsatil erzeugt wird, spricht man von kontinuierlichem oder gepulstem Plasma. Letzteres weist üblicherweise in Folge geringerer Leistung niedrigere Kontakttemperaturen auf.

Zur Charakterisierung medizinischer Plasmen werden UV-Emissions-Spektren, die Plasmatemperatur, die Qualität und Quantität der gebildeten freien Radikale und Parameter der eingesetzten Gase (Art, Gasfluss) herangezogen.

Die im Rahmen der Plasmagenerierung gebildeten Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (ROH, $O_2^{\cdot-}$, $O_3^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , RO^{\cdot} , O₃, 1O_2), die durch Reaktion mit Luftsauerstoff oder durch Zusatz von Sauerstoff zum Trägergas entstehen können, gelten ebenso wie die gebildeten reaktiven Stickstoffspezies (RNS) (NO^{\cdot}) (Weltmann et al., 2010) als relevanteste Bestandteile für die Wirkungsqualität und -quantität im Rahmen der medizinischen Anwendung.

1.3. Plasmamedizin

1.3.1 Medizinische Einsatzoptionen für Plasma

Der Einsatz von Plasma in der Medizin erfolgt bereits seit vielen Jahren. Zunächst war die Anwendung aufgrund der technisch bedingten thermischen Effekte mit Temperaturen deutlich über 80°C bei der Plasmagenerierung nur zum Zweck der Koagulation und Katheterisierung möglich (Brand et al., 1998; Link et al., 1976; Raiser u. Zenker, 2006). Durch die Weiterentwicklung von Geräten mit Plasmatemperaturen im physiologisch tolerierbaren Bereich in den letzten 10 Jahren erschlossen sich diverse neue Felder für den plasmamedizinischen Einsatz. Dabei vereinen sich die Eigenschaften der homogenen Anwendbarkeit mit lateraler und axialer Ausbreitung als Non-Kontakt Methode bei zugleich geringer Tiefenpenetration ohne nachteilige Verdampfungseffekte und ergeben ideale Voraussetzungen für diverse biomedizinische Applikationen. Medizinische Plasmaforschung wird in den Bereichen Dermatologie, Onkologie, Zahnheilkunde und in der Chirurgie durchgeführt und führte zur Prägung des Begriffs Plasmamedizin (Fridman et al., 2008). Als fächerübergreifend

gelten die Forschungen im Rahmen der Implantologie (Zahnheilkunde, Chirurgie) und der Veterinärmedizin (Dermatologie, Onkologie, Chirurgie). Als ein relevanter Effekt von Plasma gilt die Fähigkeit, verschiedene Pathogene [Gram positive und Gram negative Bakterien (Daeschlein et al., 2010b; Sladek u. Stoffels, 2005; Watts et al., 2006), Pilze (Daeschlein et al., 2011; Koban et al., 2009), Viren (Gostev et al., 2008) und Acari (Daeschlein et al., 2010a)] abzutöten. Die antibakterielle Wirkung zeigt sich sowohl gegen planktonische Bakterien (Hamman et al., 2010; Matthes et al., 2010) als auch gegen Biofilme (Ermolaeva et al., 2011; Koban et al., 2011, Hübner et al. 2010a). Verschiedene Untersuchungen belegen ein dosisabhängiges antitumorogenes Potential von Plasma (Lee u. et al., 2009; Sensenig et al., 2011). Dabei ist von besonderem Interesse, das Plasma eukaryotische Zellen in Apoptose überführen kann (Fridman et al., 2007; Kim et al., 2011). Andererseits kann Plasma die Zellproliferation unter Verwendung geeigneter Parameter stimulieren (Awakowicz et al., 2009; Kalghatgi et al., 2010; Tipa u. Kroesen, 2011). Zur Aufklärung der Wirkungsmechanismen untersuchen verschiedene Arbeitsgruppen die Wirkungen von Plasma auf zellulärer Ebene (Haertel et al., 2011; Leduc et al., 2010; OConnell et al., 2011; Ptasinska et al., 2010), um die Grundlagen der vielfältigen Plasmaeffekte besser zu verstehen.

1.3.2 Plasma zur Wundbehandlung

Aufgrund der langen Therapiezeiten und den nicht selten nur unbefriedigenden Therapieerfolgen bei zugleich hohen Kosten (Ruckley, 1997) werden neue Konzepte zur Behandlung chronischer Wunden gesucht. Die Prävalenz für chronische Wunden in Industrieländern wird mit 0,18 bis 0,32 % angegeben, die Inzidenz beträgt 0,78 %, wobei die Tendenz mit dem zunehmenden Durchschnittsalter der Bevölkerung steigt. Die sozioökonomische Relevanz ist enorm: allein 2 % des jährlichen Gesundheitsbudget der Europäischen Union werden für Wundbehandlungen ausgegeben (Crovetti et al., 2004). Ursprünglich aufgrund seiner antiseptischen (Nosenko et al., 2009) und koagulierenden (Brand et al., 1998) Eigenschaften galt und gilt der Einsatz von Plasma zur Wundtherapie als besonders erfolgversprechend. Chronische Wunden sind in hohem Maße mit Biofilmen assoziiert (Wolcott et al., 2008). Plasma kann helfen, Biofilme abzutragen bzw. zu inaktivieren (Hübner et al., 2010a; Koban et al., 2011). Derzeit wird von einigen Forschergruppen vorrangig die antiseptische Wirkung von Plasma als wesentliches Element für die Förderung der Wundheilung angesehen (Isbary et al., 2010). Der aktuelle Forschungsstand zeigt

allerdings, dass Plasma eine Vielzahl weiterer Wirkqualitäten auf mikrozirkulärer und zellulärer Ebene aufweist. ROS nehmen Einfluss auf die immunologische Kompetenz der Zellen (Inoue et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass NO innerhalb bestimmter Dosisbereiche protektive Effekte im Rahmen der Wundheilung aufweist (Schaffer et al., 1997). Es ist denkbar, dass die chronische Inflammation einer Wunde durch ROS im Rahmen der Redox-basierten Wundheilung unterbrochen werden kann und dadurch der physiologische Heilungsprozess reaktiviert wird (Sen u. Roy, 2008). Dieses hypothetische Prinzip, dessen Erforschung noch in den Kinderschuhen steckt, käme bei der Plasmabehandlung chronischer Wunden zum Tragen. Allerdings fehlt für die Anwendung an menschlichen oder tierischen Probanden fundiertes Wissen darüber, welche Plasmadosen für Wundgewebe verträglich, stimulierend oder gar schädlich sein können.

Deshalb ist die Überprüfung der Gewebeverträglichkeit unabdingbar, was als unmittelbare und intermediäre Effekte die Entstehung von lokalen Reizungen und Inflammationen beinhaltet. Da bekannt ist, dass ROS und RNS dosisabhängig zellschädigend, reizend und inflammationsauslösend wirken, muss erwartet werden, dass destruktive Wirkungen durch übermäßige Plasmadosen induzierbar sind. Darüber hinaus müssen perspektivisch die Risiken der Mutagenität und Karzinogenität als Folgen von Wundbehandlungen mit Plasma abgeklärt werden.

1.4. Der HET-CAM als Modell für Reiz- und Inflammationswirkung

Der HET-CAM wurde ursprünglich durch Lüpcke (Luepke, 1985) als Ersatzmethode zum Draize-Test am Kaninchenaugen (Draize et al., 1944) etabliert, um die Reiz- und Korrosionswirkung von Chemikalien zu untersuchen. Eine aktuelle Studie belegt die gute Prädiktivität des Tests mit hoher Spezifität (96%-98%), aber eher geringerer Sensivität (48%-65%)(Scheel et al., 2011). Die hohe Spezifität erlaubt den Schluss, dass Parameter, die im HET-CAM Test zu keiner Schädigung führen, auch *in vivo* keine Schädigung verursachen dürften, weshalb der Test zur Dosisfindung als geeignet erscheint.

Zur Untersuchung von Reizwirkungen wurden von Spielmann et al. ein Protokoll entwickelt und validiert (Spielmann u. Liebsch, 1991). Weiter wurde der HET-CAM vielfach als Modell zur Untersuchung von Inflammation und Angiogenese (Dannhardt et al., 1996; Krenn u. Paper, 2009; Ribatti et al., 1996b; Zwadlo-Klarwasser et al., 2001) sowie als Modell für Wundheilung eingesetzt (Ribatti et al., 1999; Ribatti et al., 1996a).

Neben diesen Optionen gelang es bereits mehrfach, aus separierten Tumorzellen dreidimensionale vaskularisierte Tumore auf der CAM zu züchten, was das Hühnereimodell zu einem wertvollen Tool in der Anti-Tumor Testung von Arzneistoffen macht, da hier stärker als im *in vitro* Zellkulturmodell die Einflüsse der Vaskularisierung beurteilt werden können (Gronau et al., 2006; Kunzi-Rapp et al., 2001). Aufgrund der Möglichkeit, plasmainduzierte Wirkungen in einem vaskularisierten dreidimensionalem Gewebe zu prüfen, erscheint der HET-CAM als geeignetes Modell, um auf potentielle Reiz- und Inflammationswirkung unter spezieller Berücksichtigung der inflammationsassoziierten Angiogenese zu testen und dadurch geeignete Parameter für die Plasmaanwendung an Wunden abzuleiten.

2. Material und Methoden

2.1. Plasmaquellen

Die eingesetzten Plasmaquellen wurden speziell für medizinische Anwendungen im Leibnizinstitut für Plasmaforschung und Technologie (INP, Greifswald) bzw. in Kooperation mit der Neoplas GmbH, Greifswald, entwickelt.

2.1.1 Plasmaquellen zur Untersuchung der Reizwirkung

Für die Untersuchung der Reizwirkungen an der CAM wurden ein APPJ (INP Greifswald, Deutschland, Abb. 1A) unter Verwendung von Argon als Trägergas und eine nach dem Prinzip der dielektrisch behinderten Entladung (DBD) arbeitende Plasmaquelle (INP Greifswald, Deutschland, Abb. 1B), in Luft operierend, eingesetzt. Der APPJ wurde im kontinuierlichen und im gepulsten Modus verwendet (Bender et al., 2010).

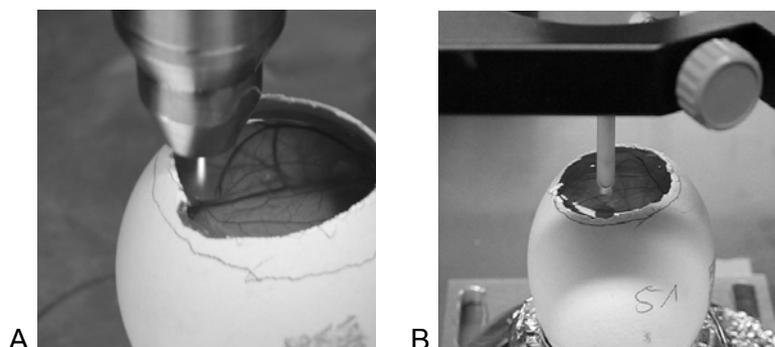


Abbildung 1. Plasmaapplikation auf die Chorioallantoismembran (CAM).
A. Argon-Plasma Behandlung mittels Atmosphärendruck Plasma-Jet.
B. Behandlung mit DBD-Elektrode.

Im kontinuierlichen Modus wurde Plasma mit einer Frequenz von 1,82 MHz erzeugt. Der Gasfluss betrug 2 Standardliter pro Minute (slm), die Systemleistung betrug 2 - 3 W. Im gepulsten Modus wurde Plasma mit einer zyklischen Einschaltdauer von 19 % (jeweils 19 μ s bei 1,82 MHz an, 81 μ s aus, Gesamtzyklusdauer 100 μ s) geschaltet. Der Gasfluss betrug ebenfalls 2 slm, die Systemleistung war entsprechend reduziert auf 0,4 - 0,6 W.

Die Temperatur an der sichtbaren Spitze des Plasmas betrug bei kalorimetrischer Messung im kontinuierlichen Modus in Abhängigkeit vom Gasfluss zwischen 57 °C und 79,8 °C, während die Temperatur im gepulsten Modus im Bereich zwischen 29 °C und 37,8 °C lag (Bender et al., 2010).

Die DBD Elektrode wurde mit einer Spannung U_{pp} von 13 kV betrieben. Die Frequenz f betrug 31 kHz, die Systemleistung 0,4-1,6 W. Die CAM stellte die Gegenelektrode dar, die Erdung erfolgte über einen Eierhalter aus Metall.

2.1.2 Plasmaquelle zur Untersuchung der Inflammationswirkung

Für die chronologisch später durchgeführte Untersuchung der Inflammationswirkung wurde ein weiter entwickelter APPJ, der kINPen09 (Neoplas GmbH, Greifswald, Deutschland, CE-Zertifikations-Nr. 609.003.1), eingesetzt (Weltmann et al., 2009), der im gepulsten und ungepulsten Modus bei einer Frequenz von 1,82 MHz betrieben wurde (Abb.2)(Bender et al., 2011).

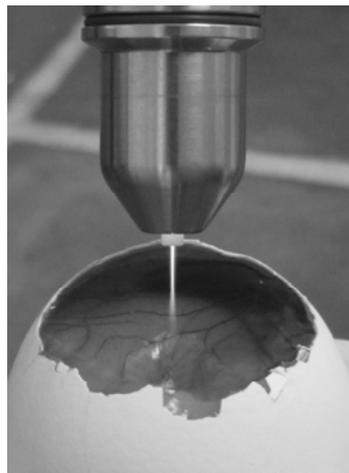


Abbildung 2. Plasmabehandlung der CAM mit dem kINPen09.

Zur Prüfung, ob ein erhöhter Sauerstoffanteil im Trägergas und eine damit verbundene vermehrte Bildung von ROS zu einer stärkeren Inflammation des Gewebes führt, wurde

in einer Testreihe dem Trägergas Argon 0,1% Sauerstoff zugemischt. Die Kontakttemperatur betrug bei reinem Argon im kontinuierlichen Modus 45 °C (kalorimetrische Messung); die Zumischung von Sauerstoff führte zu einer Temperaturerhöhung auf 49 °C (Messpunkt jeweils an der Spitze des sichtbaren Effluents, Abstand 11 mm von der Kapillardüse). Im gepulsten Modus betrug die Temperatur 47 °C (Länge des effluenten Plasmas = 7 mm von der Kapillardüse). Im kontinuierlichen Modus betrug der Gasfluss 4 slm, die Spannung U_{pp} betrug 170 V, die Leistung betrug $P = 18 W_f, 14 W_r$. Im gepulsten Modus betrug der Gasfluss 3 slm, die Spannung U_{pp} betrug 310 V, die Leistung $9 W_f, 7 W_r$. Die Pulsfrequenz betrug 35 Zyklen à 0,55 μs , das entspricht einer Anschaltzeit von 19,25 μs (19,25 μs an, 80,75 μs aus, Gesamtzyklusdauer 100 μs).

2.2. Eier

In allen Testreihen wurden Vakzine Lohmann Spezifisch Pathogenfrei Eier verwendet (VALO SPF, Hühnereier von weißen Leghorn, Lohmann GmbH, Cuxhaven, Deutschland). Die Bebrütung erfolgte bei 37 ± 1 °C in einem Motorbrüter mit automatischer Wendung und automatischer Befeuchtungsregulierung (KMB F/2, Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) (Bender et al., 2010; Bender et al., 2011).

Die Versuche zur Reizwirkung wurden in Anlehnung an Spielmann et al. 1991 (Spielmann u. Liebsch, 1991) am 10. Bebrütungstag durchgeführt. Die Versuche zur Inflammationsinduktion wurden bereits am 6. Bebrütungstag durchgeführt, nachdem zuvor aus jedem der Eier 4 ml Albumin abgesaugt wurde (Bender et al., 2011). Am Tag vor der Versuchsdurchführung wurden die Eier mit einer Schierlampe zur Feststellung der Vitalität durchleuchtet (Powerflash, J. Hemel Brutgeräte GmbH & Co.KG, Verl, Deutschland). Unbebrütete Eier wurden aussortiert. Die befruchteten Eier wurden mit dem stumpfen Pol nach oben aufgestellt und bei der Prüfung der Reizwirkung einen Tag bzw. bei der Prüfung der Inflammation zwei weitere Tage ohne Wendung bebrütet. Mittels Schere und Pinzette wurde die Kalkschale über der Luftblase vorsichtig abpräpariert. Nach Befeuchtung mit 0,5 ml 0,9 % Kochsalzlösung (NaCl) wurde die innere Eihaut abgezogen und die CAM freigelegt (Abb. 3). Beide Versuchsreihen wurden beendet, indem die Embryonen bei -20 °C eingefroren wurden.

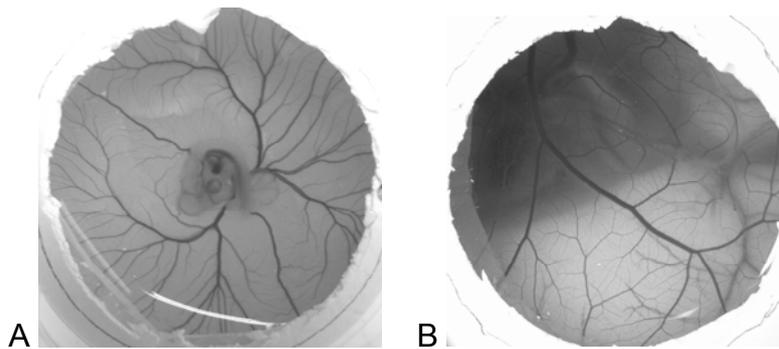


Abbildung 3. Unbehandelte Chorioallantoismembranen mit intakten Gefäßnetzen.
A. Am 6. Bebrütungstag. B. Am 10. Bebrütungstag.

2.3. Untersuchungen zur Reizwirkung

Es wurden 89 CAM getestet, aufgeteilt in 5 Kontroll- und 17 Testgruppen. Die Beurteilung der CAM erfolgte nach fotografischer Dokumentation (Canon PowerShot G9) vor Plasma-Behandlung sowie 1 und 5 min nach Behandlung durch Evaluierung mittels Scoresystem (Tab. 1).

Tabelle 1. Scoresystem zur Beurteilung der Reizwirkung von Plasma im HET-CAM (nach Bender et al., 2010)

Reizwirkung	Ausprägung	Irritations - Score
Keine		0
Hyperämie	leicht	1
	mittelgradig	2
	hochgradig	3
Hämorrhagie	vereinzelt	4
	multipel	5
	massenhaft	6
Gefäßlyse/Diskoloration	Gefäße nicht mehr sichtbar	7
Koagulation	Thromben (intravasale Koagulation)	8
	Opazitätserhöhung (extravasale Koagulation)	8

Die Zuordnung der Scorewerte zur Verträglichkeit wurde aus Untersuchungen von Wundantiseptika im HET-CAM abgeleitet (Kramer u. Behrens-Baumann, 1997). Scorewerte bis einschließlich 5 gelten als verträglich für empfindliche Gewebe wie Wunden oder Augen (Tab. 2).

Tabelle 2. Zuordnung der Scorewerte für die Reizwirkung von Plasma zur Verträglichkeit

Irritations-Score	Verträglichkeit
0-1	keine Reizwirkung
>1-3	milde Reizwirkung, gute Verträglichkeit
>3-5	mittelgradige Reizwirkung, Verträglichkeit noch gegeben
>5-7	deutliche Reizwirkung, eingeschränkte Verträglichkeit
>7	hochgradige Reizwirkung, keine Verträglichkeit, Anwendung kann nicht empfohlen werden

Durchschnittlich wurden mindestens drei Eier pro Prüfgruppe getestet. Bei stärkeren initialen Reaktionen oder deutlich abweichenden Reaktionsmustern wurde die Stichprobenzahl auf vier bis sechs Eier erhöht. Für die einzelnen Scorewerte wurden pro Prüfgruppe Scoremittelwerte für die Reizwirkungen (SMR) gebildet.

2.3.1 Kontrollen

Es wurden verschiedene Kontrollgruppen (Ko) gebildet. Als Negativkontrolle wurden 300 µl 0,9 % NaCl (Ko NaCl) aufgetragen. Zur Erzeugung standardisierter Reizreaktionen als Positivkontrollen wurden 300 µl einer 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung als Detergenz (Ko SDS) (Abb. 4A) für deutliche Reizungen und 300 µl einer 0,1N Natronlauge (NaOH)-Lösung (Ko NaOH) als korrosive wirkende Substanz (Abb.4B) für schwerwiegende Reizungen aufgetragen.

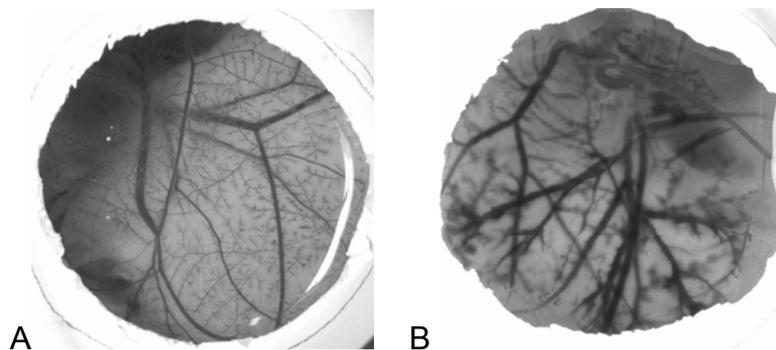


Abbildung 4. Positivkontrollen zur Reizwirkung auf der CAM, 5 min nach Applikation.
A. 1 % SDS-Lösung erzeugt Reizungen mit Gefäßlysen und multiplen Hämorrhagien.
B. 0,1 N NaOH-Lösung erzeugt schwerwiegende Korrosionen mit hochgradigen Gefäßlysen (Discoloration), intravasalen Koagulationen, Thrombosierungen und multiplen Hämorrhagien.

2.3.2 Plasmabehandlungen

Die Plasmaquelle wurde in einen computergesteuerten xyz-Tisch eingespannt und die Eier darunter so platziert, dass durch individuelle Justierung der Kontakt des generierten Plasmas mit der CAM gegeben war (Abb.1B)(Bender et al., 2010). Es wurden 3 Testgruppen gebildet (Jet gepulst, Jet kontinuierlich, DBD). Innerhalb dieser Gruppen erfolgte die Plasmaapplikation ein bis drei Mal in mäanderförmiger Bewegung mit einer Geschwindigkeit von $30 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. In einigen Einstellungen im kontinuierlichen Modus erfolgte eine punktuelle Applikation des Plasmas für 10 s oder 40 s. Parallel zu den dreifachen Jetbehandlungen wurden die CAM vor der Plasmaapplikation mit 0,5 ml 0,9 % NaCl-Lösung angefeuchtet (Ko 3 x Argon + NaCl; 3 x gepulst + NaCl; 3 x kontinuierlich + NaCl; 3 x Spots à 40s + NaCl). Für die Applikation von DBD-Plasma wurde parallel für alle Anwendungsfrequenzen zunächst eine Befeuchtung mit 0,5 ml 0,9 % NaCl-Lösung durchgeführt (1 x DBD + NaCl, 2 x DBD + NaCl, 3 x DBD + NaCl). Um die Reversibilität der Effekte zu prüfen, wurden 28 Eier nach Plasmaapplikation und Dokumentation mit einem selbstklebenden, bakteriendichten, atmungsaktiven Polyethylen-Tape (TegadermTM, 3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland) ohne Berührung der CAM zur Vermeidung der Austrocknung abgeklebt und für weitere 24 h bebrütet. Nach der Entfernung des Tapes wurden die Eier erneut fotografiert und reevaluiert.

2.4. Untersuchungen zur Inflammationswirkung

Es wurden 186 CAM getestet, aufgeteilt in 6 Kontroll- und 10 Testgruppen mit einer Mindestgruppenstärke von $n=6$.

Die Beurteilung der CAM erfolgte nach fotografischer Dokumentation (Canon PowerShot G9) vor und nach der Plasmaapplikation am 6. Bebrütungstag sowie 24 Stunden später am Tag 7. Zur Vermeidung der Austrocknung wurden alle CAM nach Applikation mit einem selbstklebenden, bakteriendichten, atmungsaktiven Polyethylen-Tape (TegadermTM, 3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland) ohne Berührung der CAM abgeklebt. Die Evaluierung erfolgte mittels Scoresystem (Tab. 3) unter Berücksichtigung der Reaktionen Granulom-Entwicklung mit assoziierter radspeichenartiger Angiogenese, Hämorrhagie, Koagulation und Kontraktur, jeweils in Abhängigkeit vom Ausprägungsgrad von Grad 1 (keine Reaktion) bis Grad 5 (hochgradige Reaktion). Zusätzlich zur inflammationsassoziierten radspeichenartigen

Angiogenese wurde ein nicht gerichteter Anstieg der Gefäßdichte beurteilt, um einen gegebenenfalls vorhandenen nicht inflammationsbedingten angiogenen Effekt beurteilen zu können.

Individuelle Scorewerte wurden zu einer Scoresumme (SS) addiert und der Mittelwert pro Behandlungsgruppe gebildet (Mittelwert der Scoresummen für die Inflammationswirkung, MSSI). Eine CAM, die nach 24h unverändert war, erhielt die SS 5. Die maximal erreichbare SS betrug 23.

Tabelle 3. Scoresystem zur Beurteilung der Inflammationswirkung von Plasma im HET-CAM (nach Bender et al. 2011)

Reaktion	Ausprägung	Inflammations-Score
keine		1
Hämorrhagie	leicht, punktuell	2
	moderat, zentriert	3
	massiv, zentriert	4
	massiv, flächig	5
Kontraktur	leicht, punktuell	2
	mittel, zentriert	3
	massive, zentriert	4
	massiv, flächig	5
Koagulation	leicht, punktuell	2
Erhöhte Opazität (extra vaskulär)	moderat, zentriert	3
	massiv, zentriert	4
	massiv, flächig	5
Granulombildung	sichtbar, bis 2 mm Durchmesser	2
	>2-3 mm	3
	>3-4 mm	4
	> 4 mm	5
Angiogenese	leichter Anstieg der Gefäßdichte	2
	Deutlicher Anstieg der Gefäßdichte	3

Die Zuordnung der MSSI zur Verträglichkeit wurde aus Untersuchungen von Wundantiseptika im HET-CAM abgeleitet (Kramer u. Behrens-Baumann, 1997). MSSI bis einschließlich 11 gelten als mäßig verträglich für empfindliche Gewebe wie Wunden oder Augen (Tabelle 4).

Tabelle 4. Zuordnung der Scoresummen für die Inflammationswirkung von Plasma zur Verträglichkeit (nach Bender et al., 2010)

Scoresumme	Verträglichkeit
5 bis 7	sehr gute Verträglichkeit ohne Inflammation
7,1 bis 9	gute Verträglichkeit mit geringgradiger Inflammation
9,1bis 11	mäßige Verträglichkeit mit mittelstarker Inflammation
11,1bis 13	schlechte Verträglichkeit mit starker Inflammation, Anwendung nur eingeschränkt möglich
13,1 bis 15	unzureichende Verträglichkeit mit hochgradiger Inflammation, Anwendung kann nicht empfohlen werden

2.4.1. Kontrollen

Milde Inflammationen als Positivkontrollen wurden durch Auflegen von 50 µg SDS-haltigen UltraPure® Low-Melting-Agarosepellets (LMAP; Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland) (Bender et al., 2011) erzeugt. Als antiinflammatorische Kontrollen dienten CAM nach Auflage von Hydrocortison (HC)-Pellets (50 µg HC/10 µ LMPA je Pellet; Caesar & Lorenz GmbH, Hilden, Deutschland). Als Ko-Kontrollen dienten CAM mit Pellets, die sowohl 50 µg SDS als auch 50 µg HC enthielten (SDS+HC). Als Negativkontrolle wurden reine LMAP auf die CAM aufgebracht (LMAP, Abb. 5). Alle Pellets blieben für 24 h auf den CAM.

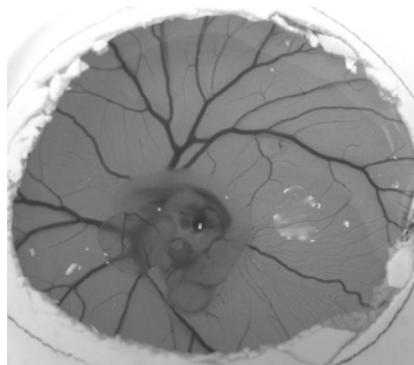


Abbildung 5. CAM, Negativkontrolle, 24 h nach Auflage eines Low-Melting-Agarose-Pellets.

2.4.2 Plasma- bzw. Gasbehandlungen

Im kontinuierlichen Modus wurde eine punktuelle Plasmabehandlung für 5 s, 10 s oder 20 s durchgeführt (cont5s, cont10s, cont20s). Im gepulsten Modus betrug die Kontaktzeit 20 s (puls20s). In einer Testgruppe wurde dem Argon-Trägergas 0,1 % Sauerstoff beigemischt (4 sccm Sauerstoff in 4 slm Argon) und punktuell für 20 s mit Plasma behandelt (cont20s+ O2). Um die erwartete inflammatorische Reaktion zu reduzieren, wurden HC - Pellets in weiteren Testgruppen nach Plasmaanwendung im kontinuierlichen (cont5s+HC, cont10s+HC, cont20s+HC), bzw. gepulsten Modus (puls20s+HC), bzw. nach Sauerstoffzumischung im kontinuierlichen Modus (cont20s+O2+HC) unmittelbar nach der Behandlung aufgebracht. Zur Erfassung der Effekte durch die alleinige Behandlung mit Argongas wurde eine Gruppe punktuell mit Argon ohne Plasma für 20 s behandelt (Gas20s). In einer weiteren Kontrollgruppe wurden die CAM zunächst 20 s mit Argongas behandelt und anschließend für 24 h mit einem HC-Pellet bestückt (Gas20s+HC).

Bei allen Behandlungen wurde der Abstand zum Jet so gewählt, dass die Spitze des sichtbaren Plasmas in Kontakt mit der CAM stand (gepulster Modus: 7mm, kontinuierliches Plasma 10-11 mm).

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse zur Reizwirkung von Plasma

Die Ergebnisse zur Reizwirkung, dargestellt als Scoremittelwerte der Reizwirkung (SMR), sind in Tabelle 5 auf Seite 22 zusammengefasst.

Die Kontrollen zeigten die erwartungsgemäßen Ergebnisse: Während die Anwendung sowohl von 0,9 % NaCl als auch von reinem Argongas weder nach 5 min noch nach 24 h zu einer nennenswerten Reizreaktion führte (SMR jeweils < 1), führte die Applikation von SDS innerhalb von 5 min zu einer deutlichen Reizwirkung (SMR 7), die Anwendung von NaOH führte zu massiver Reizung mit Zerstörung der funktionellen Gefäßstrukturen der CAM (SMR 8).

Nachdem die einfache mäanderförmige Anwendung von gepulstem Plasma innerhalb von 5 min nur zu einer milden Reizwirkung führte (SMR 2,3), resultierte bei mehrfacher Anwendung von gepulstem Plasma eine durch leichte Hämorrhagien begründete

mittelgradige Reizwirkung (zweifache Plasmaanwendung: SMR 4,2, dreifache Plasmaanwendung SMR 4,3). Die Befeuchtung der CAM mit NaCl vor dreifacher Plasmaanwendung führte zu einer geringfügigen Erhöhung des SMR auf 4,9.

Wurde die CAM zweifach mit gepulstem Plasma behandelt, zeigte sich nach 24 h eine starke Opazitätserhöhungen, weshalb die Reizwirkung als schwerwiegend eingestuft wurde (SMR 8). Demgegenüber schwächte sich die Reizwirkung nach zuvorigem Befeuchten mit 0,9% NaCl und dreifacher Behandlung mit gepulstem Plasma innerhalb von 24 h von 4,9 auf 3 ab.

Die einfache mäanderförmige Plasmaanwendung im kontinuierlichen Modus ergab einen SMR von 4,7, d.h. eine mittelgradige Reizwirkung. Die Erhöhung der Anwendungsfrequenz führte zu einer Zunahme der Reizwirkung über einen SMR bei zweifacher Anwendung von 6,3 (Abb. 6A) bis zu einem SMR von 7,3 bei dreifacher Anwendung.

Tabelle 5. Stichprobenumfang (n) und Scoremittelwerte für die Reizwirkung (SMR) nach 1 min, 5 min und 24 h für die Kontroll- und Testgruppen zur Reizwirkung von Plasma bei unterschiedlichen Behandlungsmustern (modifiziert nach Bender et al., 2010)

Gruppe	Modus	n		SMR		
		Start	nach 24 h	nach 1 min	nach 5 min	nach 24 h
Kontrollen	Ko NaCl	4		0,3	0,3	
	Ko SDS	4		5,5	7	
	Ko NaOH	5		6	8	
	Ko 3 x Argon	3	2	0,3	1	0
	Ko 3 x Argon + NaCl	4	1	0	0,8	0
Jet gepulst	1 x gepulst	3		1	2,3	
	2 x gepulst	6	1	2,5	4,2	8
	3 x gepulst	6		3,2	4,3	
	3 x gepulst + NaCl	7	4	3,9	4,9	3
Jet kontinuierlich	1 x kontinuierlich	3		4	4,7	
	2 x kontinuierlich	6	2	4,8	6,3	8
	3 x kontinuierlich	6	2	6,5	7,3	8
	3 x kontinuierlich + NaCl	3		5,7	6,3	
	3 Spots à 40s	3		8	8	
	3 Spots à 40s + NaCl	2		6	6	
	5 Spots à 10s	3		4,7	4,7	
DBD Plasma	1 x DBD	3	3	4,7	5,7	5,3
	2 x DBD	4	3	7	8	7
	3 x DBD	4	3	6	7	5,3
	1 x DBD + NaCl	3	2	4,3	4,3	0
	2 x DBD + NaCl	3	2	6,7	6,7	4
	3 x DBD + NaCl	4	3	7	8	8

Bei zwei- und dreifacher Anwendung von kontinuierlichem Plasma zeigten sich nach 24 h ebenfalls deutliche Opazitätserhöhungen (SMR 8), weshalb die Reizwirkung nach 24 h als schwerwiegend eingestuft wurde (Abb. 6B).

Die Applikation von 0,9 % NaCl vor der dreifachen Anwendung führte nach 5 min zu einem geringeren SMR von 6,3 gegenüber der gleichen Plasmabehandlung bei unbefeuchteter CAM (SMR 7,3). Punktuelle Plasmaapplikation von 40 s führte aufgrund von Thrombosierungen zu schwerwiegenden Reizungen (SMR 8). Unter der Kombination der punktuellen Plasmabehandlung mit 0,9 % NaCl war die Ausprägung der Reaktion verringert (SMR 6). Die punktuelle Anwendung von 10 s führte zu einer mittelgradigen Reizung (SMR 4,7).

Bereits die einfache Anwendung von DBD-Plasma führte zu einer stärkeren Reizwirkung (SMR 5,7, Abb. 6C) als die des ungepulsten Plasma-Jet (SMR 4,7). Dieser Reizzustand war nach 24 h weitgehend unverändert (SMR 5,3). Die zweifache und dreifache DBD-Anwendung führte zu schwerwiegender Reizung (SMR 8, bzw. 7, Abb. 6D), die sich nach 24 h abgeschwächt darstellte (SMR 7, bzw. 5,3).

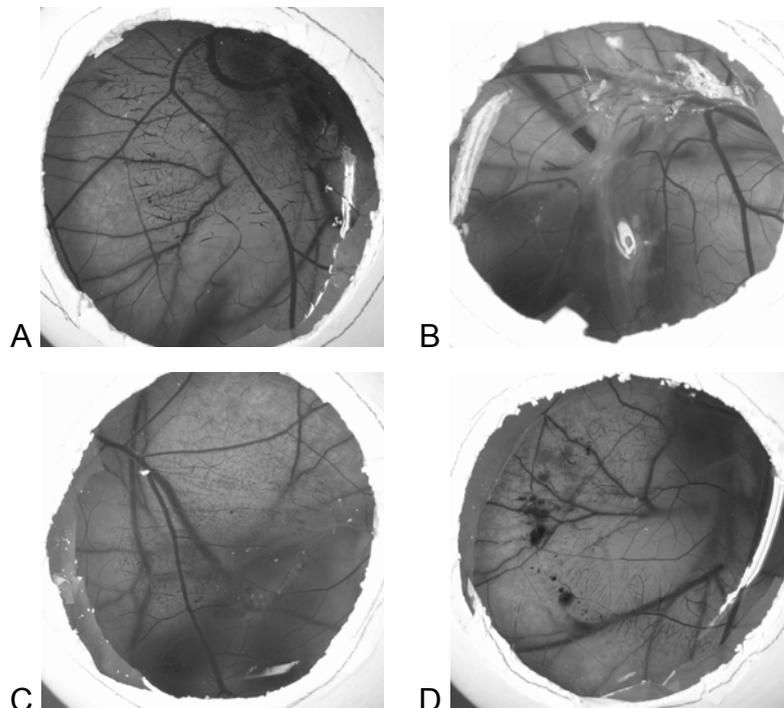


Abbildung 6. Reizantworten der Chorioallantoismembran nach der Applikation von Plasma.
A. 5 min nach zweifacher mäanderförmiger Applikation von kontinuierlichem Argonplasma.
B. Opazitätserhöhung, 24h nach zweifacher mäanderförmiger Behandlung mit kontinuierlichem Argonplasma (nach Bender et al., 2010).
C. 5 min nach einfacher mäanderförmiger Applikation von DBD-Plasma.
D. 5 min nach dreifacher mäanderförmiger Applikation von DBD-Plasma.

Die Reizwirkung fiel bei Anwendung von DBD-Plasma nach Befeuchtung mit 0,9 % NaCl bei ein- und zweifacher Behandlung im Vergleich ohne Befeuchtung etwas geringer aus (SMR 4,3 bzw. 6,7). Nach 24 h waren die Wirkungen der einfachen DBD-Anwendung nach Befeuchtung mit 0,9% NaCl vollständig reversibel, die Reizwirkung der zweifachen Anwendung war noch abgeschwächt (SMR 4), die Reizwirkung nach dreifacher Anwendung erwies sich als irreversibel nach 24h (SMR 8).

3.2 Ergebnisse zur Inflammationswirkung von Plasma

Die Ergebnisse, dargestellt als Mittelwerte der Scoresummen für die Inflammation (MSSI) und Scoremittelwerte der einzelnen Reaktionsmuster, sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6. Behandlungsgruppen, Stichprobenumfang (n) , Mittelwerte der Scoresummen für die Inflammation (MSSI), Konfidenzintervall (KI) und Scoremittelwerte der einzelnen Reaktionsmuster nach Inflammationsinduktion durch Plasma bzw. Kontrollen, mit und ohne Applikation von Hydrocortisonpellets (HC)

Behandlungsgruppe	n	MSSI	KI	Granulom	Hämorrhagie	Koagulation	Kontraktur	Angiogenese
cont5s	18	10,2	1,968	2,33	2,22	2,39	2,28	1,00
cont5s+HC	10	7,2	1,568	1,50	1,50	1,50	1,70	1,00
cont10s	27	12,8	1,230	3,01	3,14	3,24	2,47	1,00
cont10s+HC	8	7,8	0,811	1,25	2,38	2,00	1,13	1,00
cont20s	20	13,8	1,657	3,60	3,20	3,40	2,60	1,00
cont20s+HC	12	11,9	2,082	2,42	3,08	3,08	2,33	1,00
puls20s	6	13,2	2,112	3,33	2,50	3,00	3,33	1,00
puls20s+HC	6	9,6	1,872	1,83	2,50	2,17	2,17	1,00
cont20s+O2	6	14	2,993	3,33	2,83	3,33	3,50	1,00
cont20s+O2+HC	9	12,1	1,802	2,44	3,00	3,00	2,67	1,00
Gas20s	10	10,4	1,965	2,10	2,40	3,00	1,90	1,00
Gas20s+HC	10	7,8	1,568	1,40	2,10	1,70	1,60	1,00
HC	11	6,3	0,840	1,05	1,73	1,27	1,05	1,18
SDS+HC	9	6,9	0,947	1,22	1,33	1,33	1,11	1,89
SDS	15	7,7	1,139	1,47	1,40	2,27	1,60	1,00
LMAP	9	5	0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

In den Kontrollgruppen resultierte nur unter Einsatz der wirkstofffreien LMAP eine unveränderte CAM (MSSI 5). Der Zusatz von SDS bewirkte eine geringgradige Inflammation (MSSI 7,7). Die SDS-Wirkung wurde durch den Zusatz von HC gemildert (MSSI 6,9). Es zeigte sich in dieser Gruppe ein geringfügiger Anstieg der ungerichteten Angiogenese. HC als Einzelwirkstoff führte zu minimalen Veränderungen, deren Effekte insgesamt mit einem MSSI von 6,3 als immer noch sehr gut verträglich (Tab. 4) eingestuft wurden. Die alleinige Gasbehandlung bewirkte eine mittelgradige

Inflammation mit einem MSSI von 10,4 (Abb. 7). Die Wirkung des Gases wurde durch HC abgeschwächt (MSSI 7,8).

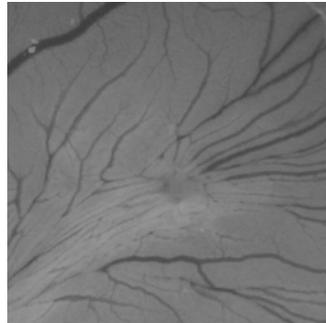


Abbildung 7. CAM, 24 h nach punktueller Behandlung mit Argon-Gas für 20 s (nach Bender et al., 2011).

In den Plasmagruppen nahmen die inflammatorischen Effekte mit zunehmender Behandlungszeit zu. Die 5 s dauernde punktuelle Applikation von kontinuierlichem Plasma konnte mit einem MSSI von 10,2 als mäßig verträglich eingestuft werden, während die 10 s Behandlung eine starke Inflammation mit einem MSSI von 12,9 hervorrief und damit als schlecht verträglich eingestuft wurde (Abb. 8, Tab. 4).

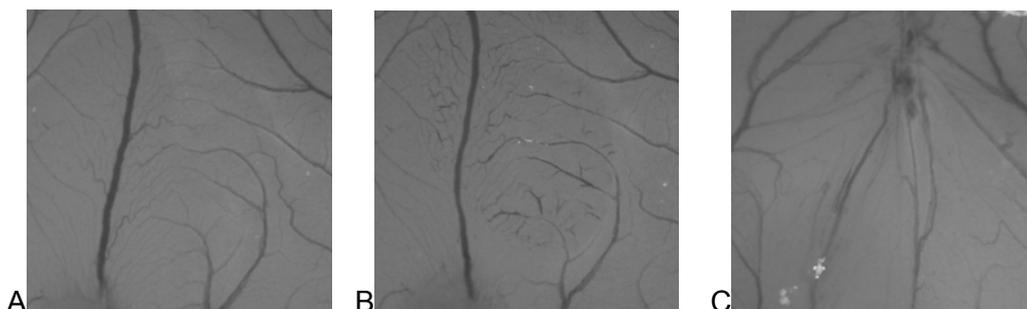


Abbildung 8. Reaktion der CAM auf die punktueller Applikation von kontinuierlichem Argonplasma für 10s. A. CAM vor Plasmaanwendung. B. CAM 5 min nach Plasmaapplikation. C. CAM 24 h nach Plasmaapplikation.

Die 20 s Behandlung mit einem MSSI von 13,8 führte zu einer hochgradigen Inflammation.

Die Inflammationswirkung der punktuellen Anwendung im gepulsten Modus für 20 s war zwar geringfügig schwächer (MSSI 13,2) als die im kontinuierlichen, lag jedoch immer noch im Bereich der unzureichenden Verträglichkeit. Der Zusatz von Sauerstoff zum

Trägergas Argon erhöhte die inflammatorischen Effekte, so dass hier ein MSSI von 14 resultierte (Abb.9).

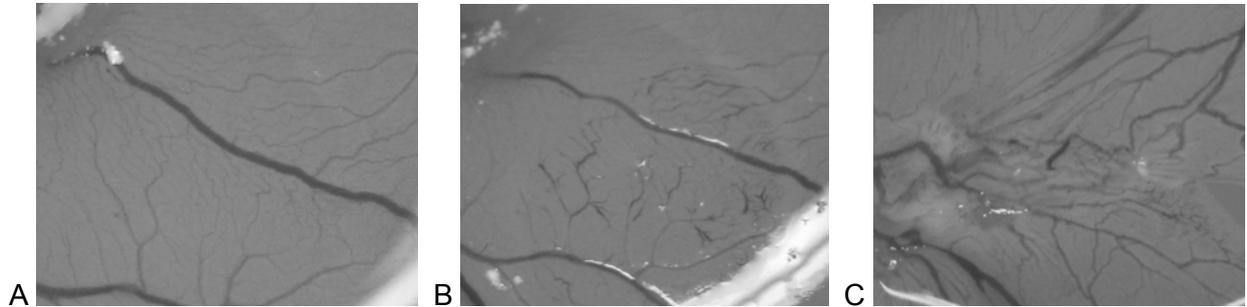


Abbildung 9. Reaktion der CAM auf die punktueller Applikation von kontinuierlichem Argonplasma mit 0,1% Sauerstoff für 20s. A. CAM vor Plasmaanwendung. B. CAM 5 min nach Plasmaapplikation. C. CAM 24 h nach Plasmaapplikation.

Die Kombination mit HC führte bei allen Anwendungen zu einem deutlichen Rückgang der inflammatorischen Effekte von 0,8 Punkten in der Kontrollgruppe mit SDS - Pellets bis zu 5 Punkten in der Plasmagruppe mit 10 s Anwendung von kontinuierlichem Plasma (Abb.10).

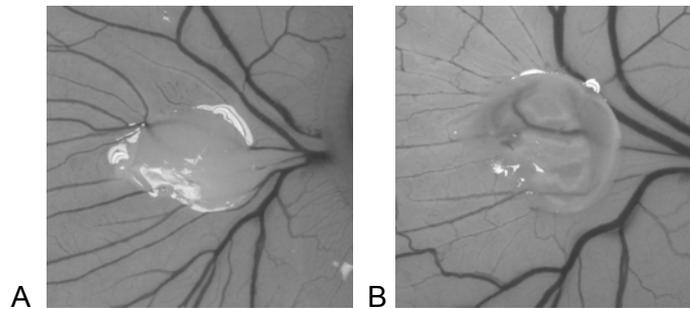


Abbildung 10. CAM nach punktueller Applikation von kontinuierlichem Argonplasma für 10 s und anschließender Auflage eines HC-Pellets (nach Bender et al., 2011). A. CAM unmittelbar nach Behandlung. B. CAM 24 h nach Behandlung.

4. Diskussion

4.1 Entstehung der CAM und Eignung als Modell zur Prüfung von Plasma auf Reiz- und Inflammationswirkung

Die CAM entsteht als extraembryonale Membran am 4.-6. Entwicklungstag aus Fusion von Chorion und Allantois. Sie liegt der Eierschale direkt an und wächst unter Umhüllung des Embryos bis zu dessen Schlupf (21. Entwicklungstag)(Fuchs u. Lindenbaum, 1988). Die Allantois erscheint nach 3,5 Entwicklungstagen als Ausstülpung der ventralen Wand des endodermalen Hinterdarms und wächst in den nächsten Tagen in das extraembryonale Coelom vor. Das Chorion umgibt als Eihaut ektodermalen Ursprungs den Embryo und den Dotter. Durch die Größenzunahme der Allantoishöhle fusionieren die Allantois und das Chorion jeweils mit ihren mesodermalen Anteilen (splanchnisches Mesoderm der Allantois und somatisches Mesoderm des Chorions) zur Chorionallantoismembran als mesodermale Doppelschicht (Bellairs u. Osmond, 1998). In dieser Doppelmembran entwickelt sich ein reiches Gefäßnetzwerk, das über Arterien und Venen mit dem Embryo verbunden ist (Rizzo et al., 1995). Das Gefäßnetz mit distal liegendem Kapillarnetz wird außen und innen von einer Epithelschicht begrenzt. Es ergibt sich im histologischen Schnitt ein dreischichtiger Aufbau. Die äußere Schicht besteht aus Epithelzellen, stammend vom Chorionektoderm, unter der unmittelbar die kapillären Gefäße verlaufen. Die mittlere Schicht entsteht als Verschmelzungsprodukt der beiden mesodermalen Anteile von Chorion und Allantois und enthält Venolen und Arteriolen. Die innere Schicht schließt mit einem Endothel die Allantoishöhle ab (Abb. 11).

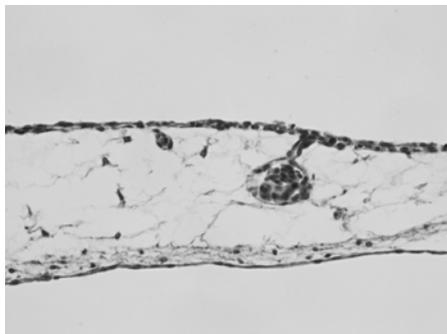


Abbildung 11. Querschnitt durch die CAM, HE-Färbung, 40-fache Vergrößerung. Dreischichtiger Aufbau, Ektoderm mit distal liegenden Kapillargefäßen, zentral liegende Blutgefäße im Mesoderm, einschichtiges Endoderm (mit freundlicher Genehmigung der Doktorandin stud. med. Ines Lehmann, Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie der Universitätsmedizin Greifswald).

Bis zum 11. Entwicklungstag findet in der CAM ein rasches Kapillarwachstum mit hoher Mitoserate der Endothelzellen statt. Danach nimmt die Mitoserate rapide ab und das Gefäßsystem reift nun langsamer bis zum 18. Tag (DeFouw et al., 1989a; Fuchs u. Lindenbaum, 1988; Rizzo et al., 1995).

Um die Plasmaeffekte auf die Angiogenese besser visualisieren zu können, wurden die Untersuchungen zur Inflammationsinduktion bereits am 6. Bebrütungstag durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt die Entwicklung des Kapillarnetzes noch nicht so weit vorangeschritten ist wie am 10. Bebrütungstag und dadurch Veränderungen in der Angiogenese deutlicher sichtbar werden. Am 10. Bebrütungstag überzieht ein dichtes Kapillarnetz den der Luftblase anliegenden Bereich, was eine gute flächige Behandlung im Präparationsfenster zur Untersuchung der Reizwirkung ermöglicht.

Die CAM dient in erster Hinsicht als Gasaustauschfläche (Rizzo u. DeFouw, 1993). Außerdem ist sie für den Kalziumtransport (Bellairs u. Osmond, 1998) von der Schale in den Embryo verantwortlich (DeFouw et al., 1989b; Schueller, 2005). Während der ersten 10 d erhält der Embryo sein Kalzium vom Dottersack. Da die benötigte Menge durch die Ossifikation in den letzten 11 d der Entwicklung stark ansteigt, wird Kalzium dann hauptsächlich durch Kontakt mit der CAM von der Schale bereit gestellt, welche dadurch bis zur Hälfte ihrer Masse verliert. Außerdem ist die CAM ein Sammelbecken für stickstoffhaltige Endabbauprodukte (Bellairs u. Osmond, 1998). Als Besonderheit des Vogelblutes gegenüber dem des Säugetiers enthalten sowohl die Erythrozyten als auch die Thrombozyten Zellkerne (Campbell u. Ellis, 1995).

Gewebereizungen und –inflammationen sind Antworten des Organismus auf chemische oder physikalische Noxen. Die CAM reagiert darauf ähnlich sensibel wie das Auge eines Säugetiers, weshalb der HET-CAM unter anderem zur Untersuchung von Reiz- und Inflammationsreaktionen geeignet ist und als prädiktives Modell für Augenverträglichkeit (Steiling et al., 1999), aber auch als Wundmodell (Ribatti et al., 1999; Ribatti et al., 1996a) und als Vorstufe zur Beurteilung der Wundverträglichkeit (Kramer et al., in print) eingesetzt wird. Schwierig für letztere Fragestellung ist, dass es keine Validierung des HET-CAM gegen Wundmodelle im Säugetier gibt und überdies kein etabliertes Tiermodell für chronische Wunden existiert. Unter Beachtung des chirurgischen Aphorismus „Wende nichts an der Wunde an, was Du nicht auch in Dein Auge geben würdest“ (Assadian u. Kramer, 2012; Leaper et al., 2010) und unter Berücksichtigung verschiedener Untersuchungen zur Wundverträglichkeit *in vitro* und *in*

vivo (Kramer, 1995; Kramer et al., 1998; Kramer et al., 2004; Reimer et al., 2000; Roth u. Kramer, 2009) wurde der HET-CAM als Modell für die Wundverträglichkeit ausgewählt, da er zudem aufgrund der hohen Spezifität des Tests einen Sicherheitsabstand beinhaltet (Scheel et al., 2011). Das von Spielmann et al. (Spielmann u. Liebsch, 1991) entwickelte Protokoll zur Beurteilung der Reizwirkung lässt sich im Falle der Plasmaapplikation nicht anwenden, da die Plasmadosis im Wesentlichen über die Dauer der Plasmaanwendung Einfluss findet. Daher wurden in Anlehnung an Kramer et al. (1998) zwei Scoringsysteme mit Zuordnung zur Verträglichkeit jeweils für die Reiz- und die Inflammationsuntersuchungen entwickelt, die sich aufgrund unterschiedlicher Basis der Beurteilung (Maximaleffekte für die Beurteilung der unmittelbaren Reizwirkung gegenüber Summationseffekten bei der Inflammationsbeurteilung nach 24h) voneinander unterscheiden. Die Ausbildung von Thrombosen und die Erhöhung der Opazität im extravaskulären Gewebe ist in beiden Fällen kritisch zu werten, da diese Erscheinungen permanente Gewebeveränderungen und möglicherweise assoziierte Schädigungen nach sich ziehen können.

4.2. Einfluss von Temperatur und Gasfluss

Durch Plasmabehandlung kann eine Erwärmung von exponierter Haut erreicht werden, die dosisabhängig ohne morphologisch fassbare Nebenwirkungen einschließlich Einfluss auf das Antioxidative Potential toleriert wird (Lademann et al., 2009; Lademann et al., 2010). Je nach Art und Einstellung der Plasmaquelle können jedoch thermische Effekte bei der Anwendung einen Einfluss nehmen. Im Fall der mäanderförmigen Applikation des gepulsten Plasmas zur Untersuchung der Reizwirkung konnten diese Effekte ausgeschlossen werden, da die Temperatur des Plasmas im physiologischen Bereich lag (Bender et al., 2010). Für den mäanderförmigen Einsatz des wärmeren kontinuierlichen Plasmas (54-79 °C) (Bender et al., 2010) sind thermische Beeinflussungen bei der punktuellen Applikation für die Dauer von 40 s anzunehmen, während bei der mäanderförmigen Anwendung bei einer Geschwindigkeit von 30 mm·s⁻¹ aufgrund der kurzen Kontaktzeiten von keiner thermischen Schädigung auszugehen ist. Dennoch kann es zu einer lokalen Temperaturerhöhung und damit zu einer Wirkungsverstärkung der physikalisch-chemischen Effekte des Plasmas kommen. Gleiches gilt für die Untersuchung der inflammatorischen Effekte. Das hierbei verwendete kontinuierliche Plasma wies eine Temperatur von 45 °C auf, was bei

kurzfristiger Anwendung von wenigen Sekunden keine eigenständige Schädigung provoziert. Die physiologische Körpertemperatur von Vögeln, so auch des Huhns, beträgt ca. 40 - 42 °C (Hildén u. Stenbäck, 1916), d.h. die thermische Toleranz der Vogelproteine ist höher als die der Säuger, bei denen Denaturierungsprozesse ab Temperaturen von 40 °C beginnen, die ab 42 °C irreversibel werden (Jakube u. Jeschkeit, 1994). Bei der Zumischung von 0,1% Sauerstoff war die Temperatur des kontinuierlichen Plasmas mit 49 °C allerdings höher. Diese Temperatur könnte bereits zu Denaturierungsprozessen geführt haben, so dass für diese Anwendung eine Beteiligung thermischer Effekte anzunehmen ist.

Der Gasfluss des APPJ stellt bei der Anwendung von Plasma auf der CAM einen weiteren Einflussfaktor dar, weil der durch den Gasfluss ausgeübte mechanische Druck zu Destruktionen der dünnen Membran führen kann. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass ein Gasfluss von 5 slm bei einem Düsen-CAM-Abstand von 10-12 mm zum Zerreißen der CAM führen kann. Daher wurden Gasflüsse von max. 4 slm gewählt. Das beinhaltet zugleich einen Temperaturanstieg im Plasma, da die Plasmatemperatur mit sinkendem Gasfluss ansteigt. Unter Berücksichtigung des Temperaturanstiegs und des Gasflusses wurden in Abhängigkeit vom Betriebsmodus (kontinuierlich oder gepulst) verschiedene Gasflüsse gewählt. Im gepulsten Modus war die Plasmatemperatur grundsätzlich geringer, was durch kalorimetrische Messungen belegt wurde (Bender et al., 2010; Bender et al., 2011).

Die Geschwindigkeit der mäanderförmigen Applikation ($30 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$) wurde so gewählt, wie sie beim manuellen Einsatz eines Plasmageräts in der Praxis etwa ausgeführt werden könnte.

4.3 Plasmaeffekte und Dosis-Wirkungs-Beziehungen

Für alle Plasmaanwendungen, insbesondere bei der punktuellen Untersuchung der Inflammationsreaktion (Abb.12), war eine deutliche Zeit-Wirkungs-Beziehung erkennbar.

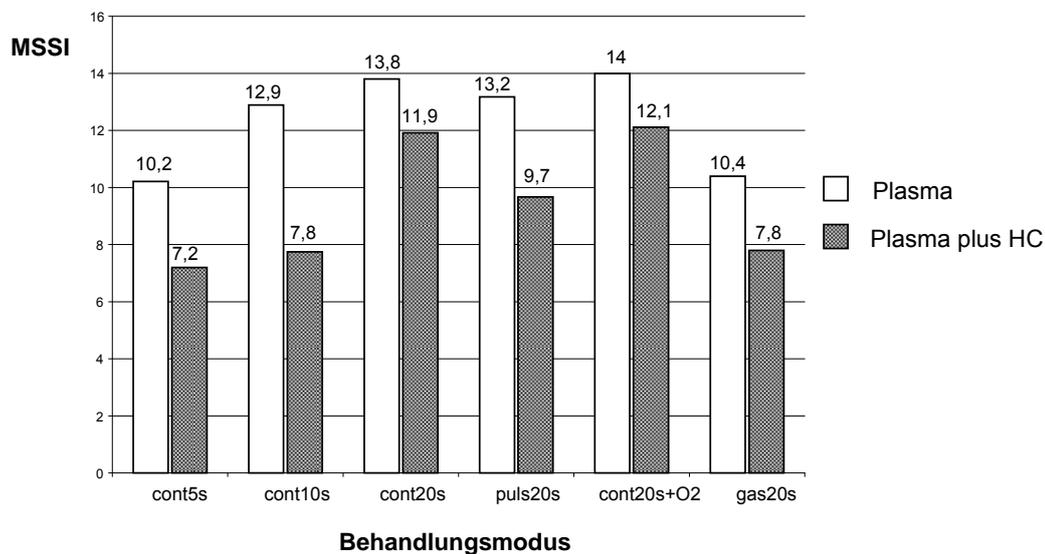


Abbildung 12. Scoresummenmittelwerte, 24 h nach punktueller Plasmaanwendung mit und ohne Hydrocortison (nach Bender et al., 2011).

Die Untersuchungen zur Reizwirkung haben gezeigt, dass der Plasma-Jet im gepulsten Modus die mildesten Reizwirkungen ausübte. Hier war das Plasma auch bei dreifacher mäanderförmigen Plasmaapplikation noch verträglich. Da für die Anwendung auf Wunden jedoch nur eine leichte Reizwirkung sinnvoll erscheint, kann für die getestete Plasmaquelle nur eine einfache Anwendung empfohlen werden.

Die Befeuchtung mit 0,9 % NaCl führte zu einer geringfügigen Verstärkung der Hämorrhagien. Ursprünglich sollte anhand der Befeuchtung untersucht werden, ob sich durch das Aufbringen der Lösung eventuell schädigende Einflüsse durch die gasstrombedingte Trocknung der CAM reduzieren oder ausschalten lassen könnten. Untersuchungen von Ohmingen et al. (Oehmigen et al., 2010) haben gezeigt, dass es zu deutlichen Veränderungen und Acidifizierung in ungepufferten Flüssigkeiten durch Plasmaeinwirkung kommt. Es ist denkbar, dass dieser Einfluss zu einer Wirkungsverstärkung führte. Andererseits entsteht durch einen höheren Gasstrom eine forcierte Verdunstung der Flüssigkeit, so dass ein Kühlungseffekt auf der CAM entsteht. Der kann dann relevant werden, wenn es durch die Anwendung eines wärmeren Plasmas zu lokalen Temperaturerhöhungen kommt, wie in diesem Fall beim Einsatz

des Plasma-Jets im kontinuierlichen Modus. Das führte offenbar zu einer Wirkungsabschwächung der temperaturabhängigen Effekte, resultierend in geringeren Scorewerten im kontinuierlichen Modus bei mäander- und punktförmiger Applikation (Tab. 5).

Auch bei der Anwendung des DBD-Plasmas zeigte sich eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung. Allerdings führte bereits eine einfache mäanderförmige Anwendung zu Thrombosierungen, was bei der Anwendung des Plasma-Jets nicht beobachtet wurde (Bender et al., 2010). Da eine Thrombosierung als kritisch einzustufen ist, kann die Anwendung dieser Plasmaquelle an Wunden nicht empfohlen werden. Weiterhin erwies sich der geringe Abstand von 2 mm, der zwischen der Elektrode und der Gewebefläche eingehalten werden musste damit das Plasma zünden konnte, für eine Anwendung an realen Wunden als unvorteilhaft, da Wundflächen in der Regel nicht plan sind und zudem häufig Kavitäten aufweisen. Bei der hier verwendeten DBD-Elektrode stellt das Gewebe die Gegenelektrode dar. Das bedeutet, dass die Methode nicht potentialfrei ist, und es im Rahmen von Entladungsvorgängen bei der Plasmagenerierung zu Stromflüssen in das Gewebe kommen kann. Auch das erscheint für eine Anwendung am nicht anästhesierten Patienten ungünstig, da der Stromfluss Schmerzen verursachen könnte. Aus den genannten nachteiligen Gründen wurde die DBD-Plasmaquelle nicht in die Untersuchungen zur Inflammationswirkung aufgenommen.

In Bezug auf die Reversibilität der Effekte lässt sich feststellen, dass diese von der Intensität der Reizwirkung abhängig waren. Lagen als Sofortwirkungen nur vereinzelte Hämorrhagien vor, waren diese nach 24 h komplett reversibel. Beim Vorliegen multipler Hämorrhagien zeigte sich eine partielle Reversibilität. Starke Reizwirkungen und Thrombosierungen führten zu einer Erhöhung der Opazität nach 24 h. Die Opazitätserhöhungen sind wahrscheinlich Ausdruck inflammationsassoziierter extravasaler Koagulationen. Aktuelle intravitalmikroskopische Untersuchungen zur Leukozyten–Endothel Interaktion (LEI) an der CAM nach Plasmaanwendung von Bender et al. (Bender et al., 2012b)¹ zeigen auf, dass die Plasmabehandlung zu einer Leukozytenanhaftung („Sticking“) an das Gefäßendothel als Vorstufe der Diapedese in das umliegende Gewebe führt (Schueller, 2005).

¹ An dieser Stelle richte ich meinen besonderen Dank an Herrn Dr. med. Axel Sckell, Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie der Universitätsmedizin Greifswald, für die gelungene Kooperation bei der interessanten und kreativen intravitalmikroskopischen Erweiterung der CAM-Untersuchungen und an Frau stud. med. Ines Lehmann für die engagierte Fortführung der Versuche im Rahmen Ihrer Doktorarbeit.

Durch HC werden die kapillären Membranen sowohl in einer Sofort- als auch in einer Spätreaktion stabilisiert (Auphan et al., 1995).

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Inflammation lassen die Schlussfolgerung zu, dass sich im HET-CAM durch Plasma Inflammationsreaktionen induzieren lassen, die ihrerseits durch HC in antiinflammatorisch effizienter Konzentration (0,5%) reduziert werden können (Abb.12).

Es lässt sich dadurch ableiten, dass Plasma Einfluss auf die kapilläre Permeabilität durch Senkung der Zell-Zell-Adhäsion nehmen könnte.

Die Überlegung deckt sich mit Untersuchungen an Zellkulturen von Bender et al. (Bender et al., 2012a), die gezeigt haben, dass Plasmabehandlungen den Transepithelialen Elektrischen Widerstand an 3-D Epidermismodellen senken, was auf eine Verminderung der Tight-Junction Aktivität zurückführbar ist.

Durch die Untersuchungen zur Inflammation konnte gezeigt werden, dass eine entsprechende Plasmabehandlung zu Koagulation, Kontraktur und Angiogenese im Gewebe führt, also zu Prozessen, die für die sekundäre Wundheilung relevant und bei der chronischen Wunde in der Regel gestört sind (Lange-Asschenfeldt, 2009). Angiogenese konnte für die Plasmaanwendung allerdings ausschließlich als inflammationsassoziiertes Prozess festgestellt werden. Für die weitere Interpretation werden eingehende Untersuchungen mit genaueren Quantifizierungen benötigt.

Die Plasmawirkungen zeigten neben der deutlichen Zeit-Wirkungs-Beziehung eine Abhängigkeit vom Plasmatyp. „Dichteres“ Plasma, wie das im kontinuierlichen Modus erzeugte, führte bei gleicher Zeiteinwirkung zu stärkeren Effekten als weniger „dichtes“ gepulstes Plasma (Abb.12). Zudem führte der Zusatz von Sauerstoff zu einer Zunahme der Effekte, was einerseits der erhöhten Temperatur geschuldet sein dürfte, andererseits durch gesteigerte Entstehung von ROS mit reaktiven Komponenten wie Ozon oder OH-Radikale (Laroussi, 2005; Nagatsu et al., 2005) als Reizsubstanzen für das vitale Gewebe erklärbar sein dürfte. Den insgesamt wichtigsten Einflussfaktor bei den getesteten Einstellungen stellte die Plasmabehandlungszeit dar. Während bei gleicher Behandlungszeit die MSSI im Vergleich von gepulstem, kontinuierlichem und mit Sauerstoff angereichertem kontinuierlichem Plasma nur geringfügig schwankten (13,2 für gepulstes Plasma bis 14,0 für mit O₂ angereichertes Plasma, Abb. 12), führte eine Verdopplung der Plasmabehandlungsdauer von 5 s auf 10 s zu einem Anstieg des MSSI von 10,2 auf 12,9, eine Verdopplung von 10 s auf 20 s zu einem Anstieg des MSSI von 12,9 auf 13,8.

Da bei der Behandlung chronischer Wunden nur geringe Inflammationsinduktionen zum Einsatz kommen sollten um eine Aktivierung der physiologischen Heilung zu stimulieren, lässt sich von den hier untersuchten Einstellungen ableiten, dass bei der Verwendung des kINPen09 mit 4 sIm eine punktuelle Behandlung von maximal 5 s empfehlenswert erscheint, da diese eine milde Inflammation mit wahrscheinlichster Gewebeverträglichkeit hervorruft. Berücksichtigt man, dass auch bei der punktuellen Applikation aufgrund der radialen Ausbreitung des Plasmas das Gewebe im Bereich eines Durchmessers von ca. 1 cm Veränderungen aufweist, sollte die Behandlungsdauer stets für eine bestimmte Wundfläche empfohlen werden; abgeleitet für die hiesigen Ergebnisse ergibt sich eine Behandlungsdauer von $5 \text{ s} \cdot \text{cm}^{-1}$ Wundfläche für den kontinuierlichen Modus. Die Zusammenführung der Ergebnisse aus beiden Untersuchungen führt zu dem Schluss, dass eine mäanderförmige Plasmaanwendung zu einer weniger starken Autorespons des Gewebes führt als eine punktuelle Anwendung und daher aus Sicherheitsgründen vorzuziehen ist. Allerdings führten in den CAM-Untersuchungen die mehrfachen mäanderförmigen Anwendungen zu extravasalen Koagulationen, während bei der punktuellen Anwendung eine Dosissteigerung zu einer insgesamt verstärkten Inflammationsreaktion führte. Die Interpretation der Scorewerte sollte daher stets in Hinblick auf das angestrebte Behandlungsziel erfolgen. Durch die Abstufung und Modulation der Effekte erscheint es möglich, gezielte Plasmatherapien zu konzipieren. Demzufolge ist der Einsatz nach Wahl der Parameter vielfältig möglich wie zur Koagulation, zur Antiseptik, zum Debridement, zur Biofilmentfernung oder zur Reiztherapie bei funktionellen Störungen wie bei chronischen Wunden.

Während die extravasale Koagulation bei einer Behandlung sezernierender Problemwunden einen positiven Effekt erzielen könnte, erscheint die Induktion einer Inflammation geeignet, bei bradytrophem Gewebe wie dem Ulcus cruris zu einer Revitalisierung des Gewebes beitragen zu können. Der Erfolg der Methoden unter Verwendung der aus dieser Untersuchung abgeleiteten Plasmabehandlungszeiten konnte im Rahmen erster therapeutischen Fallbeispiele an Kleintieren (Bender et al., 2012a) vorläufig bestätigt werden.

4.4 Weiterführende Gedanken und Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit diente zur Einschätzung der Eignung von Plasma zur Behandlung chronischer Wunden, ohne den Anspruch auf Ausschluss möglicher Langzeitriskiken zu erheben. Noch immer stellt die erfolgreiche Behandlung chronischer Wunden für die moderne Medizin eine der größten Herausforderungen dar. In Ermangelung einer evidenzbasierten Präferenz für eine Behandlungsart resultiert das Dilemma der Polypragmasie der Wundbehandlung (Kramer et al., 2008). Im Allgemeinen beinhaltet die Behandlung chronischer Wunden folgenden Ablauf:

- Débridement, ggf. auch nur Reinigung der Wunde
- bei kritisch kolonisierten oder infizierten Wunden Antiseptik und abschließend
- Wundabdeckung unter Einsatz einer dem Wundzustand angepassten Wundauflage.

Dabei variieren die gewählten Techniken für das Débridement bzw. für die ggf. weiter reichende chirurgische Versorgung, das antiseptische Vorgehen, sofern hierfür die Indikation gegeben ist, und die Auswahl der Wundauflage (Hinz et al., 2011).

Die lokale Wundbehandlung kann nur dann erfolgreich sein, wenn parallel die dem Geschehen zugrunde liegende Grundkrankheit behandelt wird. Deshalb ist die Abklärung der Ätiopathogenese bei jeder Behandlung einer Wunde unabdingbar, um die die Wundheilung beeinträchtigenden lokalen und systemischen Faktoren ggf. zu eliminieren.

Ohne den circulus vitiosus der chronische Wunde zu durchbrechen, dessen Kennzeichen im Allgemeinen Minderdurchblutung, Nekrose, kritische Kolonisation oder Infektion, erneute Nekrosenbildung und letztlich stagnierende Wundheilung sind, ist eine erfolgreiche Wundbehandlung kaum möglich. Dieser Aufgabenstellung kann unter Berücksichtigung der folgenden Problempunkte durch den Einsatz von kaltem Atmosphärendruckplasma entsprochen werden (Kramer et al., 2009).

- Heilungsprozesse verlaufen endotherm. Dem entgegen ist das Zentrum einer chronischen Wunde oft hypoxisch und hypotherm. Die Wundheilung wird durch defizitäre Energiebereitstellung im Gewebe behindert, bei einer Gewebetemperatur $<28^{\circ}\text{C}$ stagniert sie. Dem entgegen fördern ein bedingt erhöhter Sauerstoffpartialdruck (erforderlich für aerobe Energiebereitstellung) und eine erhöhte Durchblutung (erforderlich für Antransport energiereicher Substrate und Abtransport von Stoffwechselschlacken) die Wundheilung.

- Eine infizierte Wunde vermag nicht zu heilen. In diesem Sinne kommt Biofilmentfernung, bzw. -inaktivierung sowie der Endotoxinabsorption, -bindung oder -inaktivierung und der Eliminierung gewebedegenerierender Enzyme (z.B. Proteasen oder Hyaluronidasen) eine adjuvante therapeutische Bedeutung zu.
- Last but not least sollte die chronische Wunde aus ihrem Stadium der Stagnation in die Phase der akuten Wundheilung überführt werden, was z.B. durch inflammatorische und proliferationsfördernde Reize möglich erscheint.

Da die Gewebeverträglichkeit die Voraussetzung für den Einsatz von Plasma an Wunden darstellt, wurden von Kramer et al. der Begriff Tissue Tolerable Plasma (TTP) für kaltes Atmosphärendruckplasma geprägt, das für medizinische Zwecke bestimmt und aufgrund seiner Gewebekompatibilität für den Einsatz an sensiblen Geweben und Wunden geeignet ist (Kramer et al., 2009).

Für das TTP des kINPen09 konnten folgende für die Wundheilung relevanten Wirkungen nachgewiesen werden:

- Einfluss auf Zellmigration und Zellteilung: Die Existenz induzierter Ströme sowie die den elektrischen Signalen zugrunde liegende Ionenverteilung sind von entscheidender Bedeutung für die Steuerung der Zellmigration und Zellteilung am Wundrand (Tai et al., 2009). Das bei Atmosphärendruck mit dem kINPen09 generierte TTP enthält als hoch energetischer Zustand der Materie elektrische Ladungen und somit elektrische Felder.
- Gewebeerwärmung: Die Temperatur des kINPen09 ist steuerbar und im physiologischen Bereich justierbar. Durch TTP kann eine Erwärmung des behandelten Gewebes erreicht werden, die dosisabhängig ohne Nebenwirkungen toleriert wird (Lademann et al., 2009; Lademann et al., 2010).
- Debridement: Die durch TTP erreichbare Oberflächenveränderung, bewirkt durch Lockerung der Tight-Junctions (Bender et al., 2012a; Fluhr et al., 2012) in Verbindung mit der auf das Stratum corneum begrenzten Wirkung als thermal bedingte Oberflächendegradation auf gesunder Haut, kann als debridierende Wirkung aufgefasst werden (Lademann et al., 2010).
- Antiseptische Wirksamkeit und Biofilmhemmung: Durch den Gehalt der Plasmen vor allem an Radikalen ist eine antiseptische Wirksamkeit erzielbar (Lademann et al., 2011). Für Wunden ist vor allem die Wirksamkeit gegen Biofilme relevant,

weshalb die Wirksamkeit von TTP an verschiedenen *in vitro* Biofilmen getestet wurde. Hierbei erwies sich TTP als hoch wirksam und übertraf Antiseptika wie Chlorhexidin und Polihexanid an Effektivität (Hübner et al., 2010a; Koban et al., 2011; Koban et al., 2009). Mit TTP war es möglich, im 3-D-Epidermismodell *P. aeruginosa* zu inaktivieren, ohne dass die Struktur der Epidermis zerstört wurde (Matthes et al., 2009). Die antiseptische Wirksamkeit konnte am frisch entnommenen artifiziell kontaminierten Auge des Schlachtschweins bestätigt werden. Mit diesem Prüfmodell ist die Möglichkeit gegeben, sowohl die antiseptische Wirksamkeit als auch zumindest orientierend die Verträglichkeit zu ermitteln (Hamman et al., 2010).

Da mit dem TTP des kINPen09 keine remanente Wirksamkeit erzielbar ist, empfiehlt es sich, bei kritischer Kolonisation oder Infektion einer chronischen Wunde zwischen den TTP - Anwendungen ein gut verträgliches Antiseptikum mit remanenter Wirksamkeit angewendet werden. Hierfür kommen die Antiseptika Polihexanid und Octenidin in Betracht (Bender et al., 2012a; Hübner et al., 2010b; Koban et al., 2012; Roth et al., 2010).

- Gewebeverträglichkeit und Aktivierung von Heilungsprozessen: Im HET-CAM konnte die dosisabhängige Gewebeverträglichkeit und eine steuerbare Induktion milder Inflammationen für TTP bestätigt werden. Gleichzeitig waren eine Durchblutungsförderung und eine inflammationsassoziierte Förderung der Angiogenese nachweisbar (Bender et al., 2010; Bender et al., 2011). Weitere für die sekundäre Wundheilung wichtige Prozesse wie Kontraktur und Koagulation konnten durch Plasma im HET-CAM induziert werden (Bender et al., 2011). Die in weiterführenden Untersuchungen im HET-CAM nachgewiesene LEI (Bender et al., 2012b) belegt die immunologische Antwort des Organismus auf Plasma als inflammatorischen Stimulus.
- Verträglichkeit am Menschen: Die in Hinblick auf die Anwendung von TTP bei chronischen Wunden bisher durchgeführten Untersuchungen mit der Plasmaquelle kINPen09 ergaben keinerlei Anhaltspunkte für kritische Nebenwirkungen, nachgewiesen anhand der Struktur, der unbedenklichen UV-Emission und des antioxidativen Potentials (Fluhr et al., 2012; Lademann et al., 2009; Lademann et al., 2010). TTP dringt lediglich in die oberen Zellschichten des Stratum corneum ein (Fluhr et al., 2012). In Auswertung der Testungen im HET-CAM und dieser

Ergebnisse und unter Berücksichtigung der nachgewiesenen Verträglichkeit wurde die antiseptische Wirksamkeit auf menschlicher Haut geprüft. Dabei erwies sich TTP dem Antiseptikum Octenidin als gleichwertig, dringt aber im Unterschied zu Octenidin bis in den Haarfollikel ein (Lademann et al., 2009; Lademann et al., 2011; Lademann et al., 2010). Das ist insofern von besonderer Bedeutung, da die Haarfollikel ein bisher für Antiseptika unerreichbares mikrobielles Reservoir darstellen (Lange-Asschenfeldt et al., 2011).

Bei den Haustierarten Hund und Katze konnten bei chronischen Wunden mit dem kINPen09 in Kombination sowohl mit Polihexanid als auch mit Octenidin überzeugende Behandlungsergebnisse erzielt werden (Bender et al., 2012a; Bender u. Kramer, 2012). So kam es in Abhängigkeit von der ursprünglichen Wundgröße und dem Behandlungsregime über einen Zeitraum von 3 bis 24 Wochen zur kompletten Ausheilung.

Auf chronischen Wunden des Menschen konnte durch Plasmaanwendung eine signifikante Reduktion der Wundkolonisation ohne Nebenwirkungen auf die Wundheilung nachgewiesen werden (Isbary et al., 2010). Heilungsergebnisse mit dem kINPen09 beim humanen *U. cruris* sind in gleicher Weise überzeugend ausgefallen wie die Wundbehandlungen am Haustier (Lademann et al. in Vorb).

Unter integrierender Betrachtung der Ergebnisse kann folgende Hypothese zum Wirkmechanismus formuliert werden. Durch das elektrische Feld (Rajnicek et al., 2006) und vermutlich in Kombination vor allem mit den in Plasma enthaltenen Radikalen mit Aktivierung des respiratorischen Bursts (Sen, 2009) und der Redox-gekoppelten Wundheilung (Sen u. Roy, 2008) wird der Übergang von der chronischen Wunde zur resorptiven Entzündung mit Förderung von Zellproliferation und –differenzierung (Tipa u. Kroesen, 2011) und einer erhöhten LEI (Bender et al., 2012b) ausgelöst. Letztere spiegelt eine gesteigerte lokale inflammatorische und immunologische Reaktion des Organismus auf den Stimulus des TTP wider.

Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass der HET-CAM geeignet ist, um das Reiz- und Inflammationspotential von kaltem Atmosphärendruckplasma zu determinieren und daraus geeignete Parameter für die Wundbehandlung abzuleiten. Der klinische Heilungsverlauf bei chronischen Wunden bei Haustier und Mensch unter der Behandlung mit TTP spricht für die Hypothese, dass durch Einwirkung von TTP der

Heilungsprozess von chronischen Wunden über das Zwischenstadium einer akuten Entzündung in Gang gesetzt werden kann. Dabei sind bisher keine relevanten Nebenwirkungen beobachtet worden, so dass der Einsatz von TTP als neue Option zur Behandlung chronischer Wunden erfolgversprechend ist.

5. Zusammenfassung

Der Einsatz von atmosphärischem Niedertemperaturplasma zur Behandlung chronischer Wunden stellt eine erfolgsversprechende, in Entwicklung befindliche Therapieoption dar. Dabei wird von der Hypothese ausgegangen, dass chronische Wunden durch die Stimulation mittels Plasma aktiviert werden können, wodurch die über die Stufe der resorptiven Inflammation die physiologische Heilung wieder in Gang gesetzt werden kann. Daher wurde zur Identifizierung des Reiz- und Inflammationspotential des Plasmas und zur Ableitung geeigneter Behandlungsparameter Plasma im HET-CAM geprüft.

Zunächst wurden mit einem Atmosphärendruck Plasma-Jet unter Verwendung von Argongas und einer Dielectric-Barrier Discharge (DBD)-Plasmaquelle die Reizwirkungen an der CAM durch mäanderförmige Plasmabehandlung und punktuelle Anwendung getestet. Dabei wurden neben mäanderförmigen und punktuellen Applikationsmustern unterschiedliche Anwendungsfrequenzen und damit unterschiedliche Plasmadosen untersucht. Die Temperatur des Plasmas nahm v. a. bei längeren Behandlungszeiten Einfluss und führte zu einer Wirkungsverstärkung bis hin zu thermischen Schädigungen. Der Gasfluss erwies sich als limitierend für das geprüfte Modell. Der gepulste Modus war bei mäanderförmiger Anwendung am verträglichsten. Die Überprüfung auf Reversibilität der Effekte ergab, dass geringe Reizungen vollständig reversibel waren, während schwere Reizungen zu nicht reversiblen Koagulationen führten.

Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse mit sehr schneller Bildung von Thrombosen, geringem Arbeitsabstand und fehlender Potentialfreiheit wurde die DBD-Elektrode von der weiteren Untersuchung ausgenommen und der kINPen09 als Weiterentwicklung des Plasma-Jets mit geringerer Plasmatemperatur auf inflammatorische Wirkung bei punktueller Anwendung mit verschiedenen Expositionszeiten im kontinuierlichen Modus und im gepulsten Modus mit Argon als Trägergas, sowie im kontinuierlichen Modus unter Zusatz von 0,1 % Sauerstoff, getestet. In dieser Testreihe war ebenfalls das gepulste Plasma am verträglichsten, das mit Sauerstoff angereicherte Plasma führte zu den schwersten Inflammationen. Alle Reaktionen wurden durch die kombinierte Anwendung mit Hydrocortison deutlich abgeschwächt. Mit der Inflammationsinduktion konnten Gewebeprozesse in Form von Kontraktion, Koagulation und inflammationsassoziiierter Angiogenese auf der CAM erzeugt werden, die für

Aktivierung der sekundären Wundheilung relevant sein dürften. Ableitend aus den Untersuchungen kann für die Anwendung an chronischen Wunden eine Behandlungszeit von maximal $5 \text{ s} \cdot \text{cm}^{-1}$ Wundfläche für den kontinuierlichen Modus empfohlen werden. Dabei sollte wegen der besseren Verträglichkeit der mäanderförmigen Behandlung gegenüber der punktuellen Anwendung der Vorzug gegeben werden. Unter Berücksichtigung der vorliegenden Untersuchung zur Reiz- und Inflammationswirkung von Plasma im HET-CAM und weiteren Prüfungen zur Wirksamkeit und Verträglichkeit *in vivo* und *in vitro* erweist sich die Plasmaapplikation mit dem kINPen09 als vielversprechende Option zur Behandlung chronischer Wunden.

6. Summary

The use of atmospheric low-temperature plasma for the treatment of chronic wounds is a promising therapeutic option. It is expected that chronic wounds can be stimulated by plasma treatment, so that the physiological healing process can restart. To determine a reliable test and validate the use of nonthermal atmospheric pressure plasma on wounds, we selected the Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) to determine the irritation and inflammation potential of different plasmas. First, the irritation potential was tested on the CAM, using an atmospheric pressure plasma jet (APPJ) and a dielectric barrier discharge (DBD) plasma source to perform meandering plasma treatment and application at specific sites. In addition to various application patterns (meandering and spot-on CAM treatment), different application frequencies and thus different plasma doses were tested. The temperature of the plasma, especially at longer treatment times, had an impact and led to an enhanced effect and even thermal damage. The gas flow was found to be limiting for the tested model. The pulsed mode in the meandering course was most tolerable. Investigation of reversibility of the plasma effects indicated that minor irritations were completely reversible, but severe irritation led to irreversible extravasale coagulation. Due to the unsatisfactory results with fast formation of thromboses, short working distance and its electrical potential, the DBD-electrode was excluded from further investigation of inflammation potential. Instead, the kINPen09 – a more recent development of the initially used APPJ, providing lower plasma temperature – was tested using different time settings in continuous mode, pulsed mode, and continuous mode with addition of 0.1% oxygen. In the test series, the pulsed mode was again most tolerable, and the oxygen-enriched plasma led to the most severe inflammation. All reactions were significantly weakened by the combined use of hydrocortisone. Following the inflammation, the tissue processes of contraction, coagulation and inflammation-associated spoke-wheel like angiogenesis on the CAM were induced, which are also relevant for activating secondary wound healing. Based on these tests, a maximum treatment time of 5 s cm^{-1} wound surface for the continuous mode is recommended for application on chronic wounds. Meandering treatment is preferable because of the better tolerability compared to the application at specific sites.

Considering this investigation on the irritation and inflammation potential of plasma in the HET-CAM and other studies on the safety and efficacy *in vivo* and *in vitro*, the

kINPen09 plasma application can be seen as a promising option for chronic wound treatment.

7. Literaturverzeichnis

- Assadian, O., Kramer, A., **2012**. Wundinfektionen und Wundantiseptik., In: Lippert, H. (Ed.), Wundatlas: Kompendium der komplexen Wundbehandlung. Thieme, Stuttgart.
- Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmberg, A., Karin, M., **1995**. Immunosuppression by Glucocorticoids: Inhibition of NF-KB Activity Through Induction of IKB Synthesis. *Science* 270, 286-290.
- Awakowicz, P., Bibinov, N., Born, M., Busse, B., Gesche, R., Helmke, A., Kaemling, A., Kolb-Bachofen, V., Kovacs, R., Kuehn, S., Liebmann, J., Mertens, N., Niemann, U., Oplaender, C., Porteanu, H.E., Scherer, J., Suschek, C., Viuel, W., Wandke, D., **2009**. Biological Stimulation of the Human Skin Applying HealthPromoting Light and Plasma Sources. *Contributions to Plasma Physics* 49, 641-647.
- Bellairs, R., Osmond, M., **1998**. The Atlas of Chick Development. Academic Press, London, San Diego.
- Bender, C., Huebner, N.O., Weltmann, K.D., Scharf, C., Kramer, A., **2012a**. Tissue tolerable plasma and polihexanide: Are synergistic effects possible to promote healing of chronic wounds? , In: Machala, Z., Hendsel, K., Akishev, Y. (Eds.), Plasma for Bio-Decontamination, Medicine and Food Security. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 321-334.
- Bender, C., Kramer, A., **2012**. Wundheilungsförderung durch kombinierte Anwendung von Tissue Tolerable Plasma und Antiseptika: Fallbeispiele ausder Veterinärmedizin. *Hyg Med* 37, 8.
- Bender, C., Matthes, R., Kindel, E., Kramer, A., Lademann, J.r., Weltmann, K.-D., Eisenbeiß, W., Hübner, N.-O., **2010**. The Irritation Potential of Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma in the HET-CAM. *Plasma Processes and Polymers* 7, 318-326.
- Bender, C., Partecke, L.-I., Kindel, E., Döring, F., Lademann, J.r., Heidecke, C.-D., Kramer, A., Hübner, N.-O., **2011**. The modified HET-CAM as a model for the assessment of the inflammatory response to tissue tolerable plasma. *Toxicology In Vitro* 25, 530-537.
- Bender, C., Pavlovic, D., Wegner, A., Hinz, P., Ekkernakamp, A., Kramer, A., Sckell, A., **2012b**. Intravital Fluorescence Microscopy for the Assessment of Microcirculation and Leucocyte-Endothel Interaction after application of Tissue Tolerable Plasma in the HET-CAM, In: Mikikian, M., Rabat, H., Robert, E., Pouvesle, J.M. (Eds.), Book of Abstracts 4th Int Conf Plasma Medicine, Orleans, p. 86.
- Brand, C.U., Blum, A., Schlegel, A., Farin, G., Garbe, C., **1998**. Application of argon plasma coagulation in skin surgery. *Dermatology*, 152-157.
- Bussiahn, R., Brandenburg, R., Gerling, T., Kindel, E., Lange, H., Lembke, N., Weltmann, K.D., von Woedtke, T., Kocher, T., **2010**. The hairline plasma: An intermittent negative dc-corona discharge at atmospheric pressure for plasma medical applications. *Applied Physics Letters* 96, . 143701 - 143701-3
- Campbell, T.W., Ellis, C.K., **1995**. Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology 3. ed. Blackwell Pub Professional, Oxford.
- Chu, P.K., Chen, J.Y., Wang, L.P., Huang, N., **2002**. Plasma-surface modification of biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports* 36, 143-206.
- Crookes, W., 1883. On Radiant Matter Spectroscopy: A New Method of Spectrum Analysis. *Proc Roy Soc.* 35, 262-271.
- Crovetti, G., Martinelli, G., Issi, M., Barone, M., Guizzardi, M., Campanati, B., Moroni, M., Carabelli, A., **2004**. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfusion and Apheresis Science* 30, 145-151.
- Daeschlein, G., Scholz, S., Arnold, A., Woedtke, T.v., Kindel, E., Niggemeier, M., Weltmann, K.-D., Jünger, M., **2010a**. In vitro Activity of Atmospheric Pressure Plasma Jet (APPJ) Plasma Against Clinical Isolates of Demodex Folliculorum, *IEEE Transactions on Plasma Science* 38, 2969-2973.

- Daeschlein, G., Scholz, S., von Woedtke, T., Niggemeier, M., Kindel, E., Brandenburg, R., Weltmann, K.D., Jünger, M., **2011**. In Vitro Killing of Clinical Fungal Strains by Low-Temperature Atmospheric-Pressure Plasma Jet IEEE Transactions on Plasma Science 39, 815-821.
- Daeschlein, G., Woedtke, T.v., Kindel, E., Brandenburg, R., Weltmann, K.-D., Jünger, M., **2010b**. Antibacterial Activity of an Atmospheric Pressure Plasma Jet Against Relevant Wound Pathogens in vitro on a Simulated Wound Environment. Plasma Processes and Polymers 7, 224-230.
- Dannhardt, G., Kreher, M., Nowe, U., Pies, A., **1996**. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Agents, Part 20 Method for Testing Non-Steroidal Anti-Inflammatories: The Modified Hen's Egg Chorioallantoic Membrane Test (HET-CAM Test) Compared to Other Procedures. Archiv der Pharmazie 329, 301-310.
- DeFouw, D.O., Rizzo, V.J., Steinfeld, R., Feinberg, R.N., **1989a**. Mapping of the microcirculation in the chick chorioallantoic membrane during normal angiogenesis. Microvasc Res 38, 136-147.
- DeFouw, D.O., Rizzo, V.J., Steinfeld, R., Feinberg, R.N., **1989b**. Mapping of the microcirculation in the chick chorioallantoic membrane during normal angiogenesis. Microvascular Research 38, 136-147.
- Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O., **1944**. Methods for the Studys of irritation and toxicity of substancec applied topically to the skin and mucous membrane. J Pharmacol Exp 82, 377.
- Ermolaeva, S.A., Varfolomeev, A.F., Chernukha, M.Y., Yurov, D.S., Vasiliev, M.M., Kaminskaya, A.A., Moisenovich, M.M., Romanova, J.M., Murashev, A.N., Selezneva, I.I., Shimizu, T., Sysolyatina, E.V., Shaginyan, I.A., Petrov, O.F., Mayevsky, E.I., Fortov, V.E., Morfill, G.E., Naroditsky, B.S., Gintsburg, A.L., **2011**. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. Journal of Medical Microbiology 60, 75-83.
- Fluhr, J.W., Sassning, S., Lademann, O., Darvin, M.E., Schanzer, S., Kramer, A., Richter, H., Sterry, W., Lademann, J., **2012**. In vivo skin treatment with tissue-tolerable plasma influences skin physiology and antioxidant profile in human stratum corneum. Experimental Dermatology 21, 130-134.
- Fridman, G., Friedman, G., Gutsol, A., Shekhter, A.B., Vasilets, V.N., Fridman, A., **2008**. Applied Plasma Medicine. Plasma Processes and Polymers 5, 503-533.
- Fridman, G., Shereshevsky, A., Jost, M.M., Brooks, A.D., Friedmaan, A., Gutsol, A., Vasilets, V.N., Friedman, G., **2007**. Floating Electrode Dielectric Barrier Discharge Plasma in Air Promoting Apoptotic Behavior in Melanoma Skin Cancer Cell Lines. Plasma Chem. Plasma Process. 27, 163-176.
- Fuchs, A., Lindenbaum, E.S., **1988**. The two- and three-dimensional structure of the microcirculation of the chick chorioallantoic membrane. Acta Anat (Basel) 131, 271-275.
- Gostev, V.A., Ignakhin, V.S., Popova, E.K., Ostashkov, O.A., **2008**. Cold Plasma – A Powerful Agent for Biological Applications. Plasma Assisted Decontamination of Biological and Chemical Agents, In: Güçeri, S., Fridman, A., Gibson, K., Haas, C. (Eds.). Springer Netherlands, pp. 65-77.
- Gronau, S., Thess, B., Riechelmann, H., Fischer, Y., Schmitt, A., Schmitt, M., **2006**. An autologous system for culturing head and neck squamous cell carcinomas for the assessment of cellular therapies on the chorioallantois membrane. Eur Arch Otorhinolaryngol 263, 308-312.
- Haddow, D.B., Steele, D.A., Short, R.D., Dawson, R.A., Macneil, S., **2003**. Plasma-polymerized surfaces for culture of human keratinocytes and transfer of cells to an in vitro wound-bed model. Journal of biomedical materials research Part A 64, 80-87.
- Haertel, B., Volkmann, F., von Woedtke, T., Lindequist, U., **2011**. Differential sensitivity of lymphocyte subpopulations to non-thermal atmospheric-pressure plasma. Immunobiology. 217 (6) 628–633.

- Hammann, A., Hübner, N.O., Bender, C., Ekkernkamp, A., Hartmann, B., Hinz, P., Kindel, E., Koban, I., Koch, S., Kohlmann, T., Lademann, J., Matthes, R., Müller, G., Titze, R., Weltmann, K.D., Kramer, A., **2010**. Antiseptic Efficacy and Tolerance of Tissue-Tolerable Plasma Compared with Two Wound Antiseptics on Artificially Bacterially Contaminated Eyes from Commercially Slaughtered Pigs. *Skin Pharmacology and Physiology* 23, 328-332.
- Hildén, A., Stenbäck, K.S., **1916**. Zur Kenntnis der Tagesschwankungen der Körpertemperatur bei den Vögeln. *Skandinavisches Archiv Für Physiologie* 34, 382-413.
- Hinz, P., Boeningk, I., Ekkernkamp, A., Wolf, A., Kramer, A., **2011**. Prinzipien der chirurgischen Wundbehandlung. Rules of the surgical debridement. *Gynäkologische Praxis* 35, 711-711.
- Hübner, N.O., Matthes, R., Koban, I., Müller, G., Bender, C., Kindel, E., Kocher, T., Kramer, A., **2010a**. Efficacy of Chlorhexidine, Polihexanide and Tissue-Tolerable Plasma against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Grown on Polystyrene and Silicone Materials. *Skin Pharmacol Physiol* 23.
- Hübner, N.O., Siebert, J., Kramer, A., **2010b**. Octenidine Dihydrochloride, a Modern Antiseptic for Skin, Mucous Membranes and Wounds. *Skin Pharmacology and Physiology* 23, 244-258.
- Inagaki, N., **1996**. Plasma Surface Modification and Plasma Polymerisation. CRC Press, p. 265.
- Inoue, M., Sato Eisuke, F., Nishikawa, M., Park, A.-M., Kira, Y., Imada, I., Utsumi, K., **2003**. Mitochondrial Generation of Reactive Oxygen Species and its Role in Aerobic Life. *Current Medicinal Chemistry* 10, 2495-2505.
- Isbary, G., Morfill, G., Schmidt, H.U., Georgi, M., Ramrath, K., Heinlin, J., Karrer, S., Landthaler, M., Shimizu, T., Steffes, B., Bunk, W., Monetti, R., Zimmermann, J.L., Pompl, R., Stolz, W., **2010**. A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. *British Journal of Dermatology* 163, 78-82.
- Jakube, H.D., Jeschkeit, H., **1994**. Aminosäuren, Peptide, Proteine. Verlag Chemie, Weinheim, Germany.
- Kalghatgi, S., Friedman, G., Fridman, A., Clyne, A., **2010**. Endothelial Cell Proliferation is Enhanced by Low Dose Non-Thermal Plasma Through Fibroblast Growth Factor-2 Release. *Annals of Biomedical Engineering* 38, 748-757.
- Kim, J.Y., Ballato, J., Foy, P., Hawkins, T., Wei, Y., Li, J., Kim, S.-O., **2011**. Apoptosis of lung carcinoma cells induced by a flexible optical fiber-based cold microplasma. *Biosensors and Bioelectronics* 28, 333-338.
- Koban, I., Bender, C.P., Assadian, O., Kramer, A., Hubner, N.O., **2012**. Clinical Use of the Antiseptic Polihexanide for Genital Tract Infections. *Skin Pharmacol Physiol* 25, 298-304.
- Koban, I., Holtfreter, B., Hübner, N.-O., Matthes, R., Sietmann, R., Kindel, E., Weltmann, K.-D., Welk, A., Kramer, A., Kocher, T., **2011**. Antimicrobial efficacy of non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs in vitro – proof of principle experiment. *Journal of Clinical Periodontology* 38, 956-965.
- Koban, I., Hübner, N.O., Matthes, R., Welk, A., Kindel, E., Weltmann, K.D., Kramer, A., Kocher, T., **2009**. Antiseptic efficacy of selected agents and tissue tolerable plasma (TTP) on *C. albicans* biofilms – has the biofilm maturity influence on it? Antiseptische Wirksamkeit ausgewählter Wirkstoffe und von tissue tolerable plasma (TTP) auf *C. albicans*-Biofilme – hat der Reifegrad des Biofilms einen Einfluss? *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 4, Doc09.
- Kramer, A., **1995**. Prüfsystem zur Erfassung der Verträglichkeit antimikrobiell wirksamer Stoffe und Zubereitungen zur episodischen Applikation durch In-Vitro- und tierexperimentelle Test (Episomatikerest) und die toxikohygienische Bewertung als Bestandteil krankenhaushygienischer Aufgabenstellungen.
- Kramer, A., Adrian, V., Rudolph, P., Wurster, S., Lippert, H., **1998**. Explantationstest mit Haut und Peritoneum der neonatalen Ratte als Voraussagetest zur Verträglichkeit lokaler Antiinfektiva für Wunden und Körperhöhlen. *Der Chirurg* 69, 840-845.

- Kramer, A., Behrens-Baumann, W., **1997**. Prophylactic Use of Topical Anti-Infectives in Ophthalmology. *Ophthalmologica* 211, 68-76.
- Kramer, A., Hübner, N.-O., Weltmann, K.-D., Lademann, J., Ekkernkamp, A., Hinz, P., Assadian, O., **2008**. Polypragmasia in the therapy of infected wounds - conclusions drawn from the perspectives of low temperature plasma technology for plasma wound therapy. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 3, Doc13.
- Kramer, A., Hübner, N.O., Assadian, O., Below, H., Bender, C., Bröker, B., Ekkernkamp, A., Eisenbeiß, W., Hammann, A., Hartmann, B., Heidecke, C.D., Hinz, P., Koban, I., Koch, S., Kocher, T., Lademann, J., Lademann, O., Lerch, M.M., Maier, S., Matthes, M., Müller, M., Partecke, I., Rändler, C., Weltmann, K.D., Zygmunt, M., **2009**. Chances and perspectives of the plasma medicine by use of Tissue Tolerable Plasma (TTP) gms | Chancen und Perspektiven der Plasmamedizin durch Anwendung von gewebekompatiblen Atmosphärendruckplasmen (Tissue Tolerable Plasmas, TTP). *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 4, 1-15.
- Kramer, A., Lademann, J., Bender, C., Sckell, A., Hartmann, B., Hinz, P., Ekkernkamp, A., Matthes, R., Koban, I., Partecke, I., Heidecke, C.D., Assadian, O., Suitability of Tissue Tolerable Plasmas (TTP - cold atmospheric-pressure plasmas with tissue applicable properties) for chronic wound management and its importance in wound antisepsis. *Clin Plasmamed*, accepted.
- Kramer, A., Roth, B., Müller, G., Rudolph, P., Klöcker, N., **2004**. Influence of the Antiseptic Agents Polyhexanide and Octenidine on FL Cells and on Healing of Experimental Superficial Aseptic Wounds in Piglets. *Skin Pharmacology and Physiology* 17, 141-146.
- Krenn, L., Paper, D.H., **2009**. Inhibition of angiogenesis and inflammation by an extract of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Phytomedicine* 16, 1083-1088.
- Kunzi-Rapp, K., Genze, F., Küfer, R., Reich, E., Hautmann, R.E., Gschwend, J.E., **2001**. Chorioallantoic membrane assay: Vascularized 3-dimensional cell culture system for human prostate cancer cells as an animal substitute model. *The journal of Urology* 166, 1502-1507.
- Lademann, J., Richter, H., Alborova, A., Humme, D., Patzelt, A., Kramer, A., Weltmann, K.-D., Hartmann, B., Ottomann, C., Fluhr, J.W., Hinz, P., Hubner, G., Lademann, O., **2009**. Risk assessment of the application of a plasma jet in dermatology. *Journal of Biomedical Optics* 14, 054025-26.
- Lademann, O., Kramer, A., Richter, H., Patzelt, A., Meinke, M.C., Czaika, V., Weltmann, K.D., Hartmann, B., Koch, S., **2011**. Skin Disinfection by Plasma-Tissue Interaction: Comparison of the Effectivity of Tissue-Tolerable Plasma and a Standard Antiseptic. *Skin Pharmacology and Physiology* 24, 284-288.
- Lademann, O., Richter, H., Patzelt, A., Alborova, A., Humme, D., Weltmann, K.D., Hartmann, B., Hinz, P., Kramer, A., Koch, S., **2010**. Application of a plasma-jet for skin antisepsis: analysis of the thermal action of the plasma by laser scanning microscopy. *Laser Physics Letters* 7, 458-462.
- Lange-Asschenfeldt, B., **2009**. Modulation der kutanen Angiogenese bei Entzündung und Wundheilung. *Charité Centrum für Innere Medizin und Dermatologie, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Berlin*.
- Lange-Asschenfeldt, B., Marenbach, D., Lang, C., Patzelt, A., Ulrich, M., Maltusch, A., Terhorst, D., Stockfleth, E., Sterry, W., Lademann, J., **2011**. Distribution of Bacteria in the Epidermal Layers and Hair Follicles of the Human Skin. *Skin Pharmacology and Physiology* 24, 305-311.
- Langmuir, I., **1928**. Oscillations in Ionized Gases. *Proceedings of the National Academy of Science* 14, 627-637.
- Laroussi, M., **2005**. Low Temperature Plasma-Based Sterilization: Overview and State-of-the-Art. *Plasma Processes and Polymers* 2, 391-400.
- Leaper, D., McBain, A., Kramer, A., Assadian, O., Sanchez, J.L.A., Lumio, J., Kiernan, M., **2010**. Healthcare associated infection: novel strategies and antimicrobial implants to prevent surgical site infection. *Annals of The Royal College of Surgeons of England* 92, 453-458.

- Leduc, M., Guay, D., Coulombe, S., Leask, R.L., **2010**. Effects of Non-thermal Plasmas on DNA and Mammalian Cells. *Plasma Proc. Polymers* 7, 899-909.
- Lee, H.J., et al., **2009**. Degradation of adhesion molecules of G361 melanoma cells by a non-thermal atmospheric pressure microplasma. *New Journal of Physics* 11, 115026.
- Link, W.J., Incropera, F.P., Glover, J.L., **1976**. A plasma scalpel: comparison of tissue damage and wound healing with electrosurgical and steel scalpels. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)* 111, 392-397.
- Luepke, N.P., **1985**. Hen's egg chorion allantoic membrane test for irritation potential. *Fd. Chem. Toxicol.* 287-291.
- Martens, P.A., Galliani, V., Graham, G., Caputo, R.A., **1998**. Sterilization of Medical Products Using Gas Plasma Technology, Nordhauser FM, Olson WP (eds), *Sterilization of Drugs and Devices*, pp. 157-196.
- Matthes, R., Bender, C., Hübner, N.O., Müller, G., Kohl, K., Mentz, J., Koban, I., Kindel, E., Kocher, T., Weltmann, K.D., Lademann, J., Kramer, A., **2009**. Influencing of the penetration of *Pseudomonas aeruginosa* into a 3-D epidermis model and the inactivation with tissue tolerable plasma. *GMS Krankenhaushyg Interdisziplinär* 4, Doc08.
- Matthes, R., Hubner, N.O., Bender, C., Koban, I., Weltmann, K.D., Kramer, A., **2010**. Screening test for quality control of surface barrier discharged plasma sources with the microorganism-agar test (MAT). *GMS Krankenhaushyg Interdisziplinär* 5.
- Moisan, M., Barbeau, J., Moreau, S., Pelletier, J., Tabrizian, M., Yahia, L.H., **2001**. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics* 226, 1-21.
- Morfill, G.E., Kong, M.G., Zimmermann, J.L., **2009**. Focus on Plasma Medicine. *New Journal of Physics* 11, 115011.
- Nagatsu, M., Terashita, F., Nonaka, H., Xu, L., Nagata, T., Koide, Y., **2005**. Effects of oxygen radicals in low-pressure surface-wave plasma on sterilization. *Applied Physics Letters* 86, 211502-211503.
- Nosenko, T., Shimizu, T., Morfill, G.E., **2009**. Designing plasmas for chronic wound disinfection. *New Journal of Physics* 11, 115013.
- OConnell, D., Cox, L.J., Hyland, W.B., McMahon, S.J., Reuter, S., Graham, W.G., Gans, T., Currell, F.J., **2011**. Cold atmospheric pressure plasma jet interactions with plasmid DNA. *Applied Physics Letters* 98, 043701 - 043703
- Oehmigen, K., Hahnel, M., Brandenburg, R., Wilke, C., Weltmann, K.D., von Woedtke, T., **2010**. The Role of Acidification for Antimicrobial Activity of Atmospheric Pressure Plasma in Liquids. *Plasma Proc. Polymers* 7, 250-257.
- Ptasinska, S., Bahnev, B., Stypczynska, A., Bowden, M., Mason, N.J., Braithwaite, N.S.J., **2010**. DNA strand scission induced by a non-thermal atmospheric pressure plasma jet. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12, 7779-7781.
- Raiser, J., Zenker, M., **2006**. Argon plasma coagulation for open surgical and endoscopic applications: state of the art. *J. Phys.D:Appl. Phys.*, 3520-3523.
- Rajnicek, A.M., Foubister, L.E., McCaig, C.D., **2006**. Growth cone steering by a physiological electric field requires dynamic microtubules, microfilaments and Rac-mediated filopodial asymmetry. *Journal of Cell Science* 119, 1736-1745.
- Reimer, K., Vogt, P.M., Broegmann, B., Hauser, J., Rossbach, O., Kramer, A., Rudolph, P., Bosse, B.S., H., Fleischer, W., **2000**. An Innovative Topical Drug Formulation for Wound Healing and Infection Treatment: In vitro and in vivo Investigations of a Povidone-Iodine Liposome Hydrogel. *Dermatology* 201, 235-241.
- Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Roncali, L., Presta, M., **1999**. Endogenous and exogenous fibroblast growth factor-2 modulate wound healing in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Angiogenesis* 3, 89-95.
- Ribatti, D., Vacca, A., Ranieri, G., Sorino, S., Roncali, L., **1996a**. The chick embryo chorioallantoic membrane as an in vivo wound healing model. *Pathol Res Pract* 192, 1068-1076.

- Ribatti, D., Vacca, A., Roncali, L., Dammacco, F., **1996b**. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. *Int J Dev Biol* 40, 1189-1197.
- Rizzo, V., DeFouw, D.O., **1993**. Macromolecular selectivity of chick chorioallantoic membrane microvessels during normal angiogenesis and endothelial differentiation. *Tissue & cell* 25, 847-856.
- Rizzo, V., Kim, D., Duran, W.N., DeFouw, D.O., **1995**. Ontogeny of microvascular permeability to macromolecules in the chick chorioallantoic membrane during normal angiogenesis. *Microvasc Res* 49, 49-63.
- Roth, B., Kramer, A., **2009**. Antiseptische Begleittherapie des Ulcus cruris mit Polihexanid. *GMS Krankenhaushyg Interdiszip* 4.
- Roth, C., Beule, A.G., Kramer, A., Hosemann, W., Kohlmann, T., Scharf, C., **2010**. Response analysis of stimulating efficacy of polihexanide in an in vitro wound model with respiratory ciliary epithelial cells. *Skin Pharmacol Physiol* 23, 35-40.
- Ruckley, C.V., **1997**. Socioeconomic Impact of Chronic Venous Insufficiency and Leg Ulcers. *Angiology* 48, 67-69.
- Schaffer, M.R., Efron, P.A., Thornton, F.J., Klingel, K., Gross, S.S., Barbul, A., **1997**. Nitric oxide, an autocrine regulator of wound fibroblast synthetic function. *The Journal of Immunology* 158, 2375-2381.
- Scheel, J., Kleber, M., Kreutz, J.r., Lehringer, E., Mehling, A., Reisinger, K., Steiling, W., **2011**. Eye irritation potential: Usefulness of the HET-CAM under the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 59, 471-492.
- Schueller, M., **2005**. Entwicklung eines geeigneten Modells zur Untersuchung des selektinvermittelten Zellrollens – Das Chorioallantoismembran (CAM) -Modell, Institut für Physiologische Chemie. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, Germany, p. 80.
- Sen, C.K., **2009**. Wound healing essentials: Let there be oxygen. *Wound Repair and Regeneration* 17, 1-18.
- Sen, C.K., Roy, S., **2008**. Redox signals in wound healing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1780, 1348-1361.
- Sensenig, R., Kalghatgi, S., Cerchar, E., Fridman, G., Shereshevsky, A., Torabi, B., Arjunan, K., Podolsky, E., Fridman, A., Friedman, G., Azizkhan-Clifford, J., Brooks, A., **2011**. Non-thermal Plasma Induces Apoptosis in Melanoma Cells via Production of Intracellular Reactive Oxygen Species. *Annals of Biomedical Engineering* 39, 674-687.
- Sladek, R.E.J., Stoffels, E., **2005**. Deactivation of Escherichia coli by the plasma needle. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 1716.
- Spielmann, H., Liebsch, M., **1991**. Eye Irritation Validation Study Test Procedure, In: ZEBET (Ed.). BGA, pp. 1-8.
- Steiling, W., Bracher, M., Courtellemont, P., de Silva, O., **1999**. The HET-CAM, a Useful In Vitro assay for Assessing the Eye Irritation Properties of Cosmetic Formulations and Ingredients. *Toxicology In Vitro*, 375-384.
- Tai, G., Reid, B., Cao, L., Zhao, M., **2009**. Electrotaxis and wound healing: experimental methods to study electric fields as a directional signal for cell migration. *Methods Mol Biol* 571, 77-97.
- Tipa, R.S., Kroesen, G.M.W., **2011**. Plasma-Stimulated Wound Healing *IEEE Transactions on Plasma Science* 39, 2978 - 2979.
- Watts, A.E., Fubini, S.L., Vernier-Singer, M., Golkowski, C., Shin, S., Todhunter, R.J., **2006**. In vitro analysis of nonthermal plasma as a disinfecting agent. *Am J Vet Res* 67, 2030-2035.
- Weltmann, K.D., Kindel, E., Brandenburg, R., Meyer, C., Bussiahn, R., Wilke, C., von Woedtke, T., **2009**. Atmospheric Pressure Plasma Jet for Medical Therapy: Plasma Parameters and Risk Estimation. *Contributions to Plasma Physics* 49, 631-640.

- Weltmann, K.D., Kindel, E., von Woedtke, T., Hähnel, M., Stieber, M., Brandenburg, R., **2010**. Atmospheric-pressure plasma sources: Prospective tools for plasma medicine. *Pure Appl. Chem.* 82, 1223-1237.
- Wolcott, R.D., Rhoads, D.D., Dowd, S.E., **2008**. Biofilms and chronic wound inflammation. *J Wound Care*, 17, 333-341.
- Zwadlo-Klarwasser, G., Gorlitz, K., Hafemann, B., Klee, D., Klosterhalfen, B., **2001**. The chorioallantoic membrane of the chick embryo as a simple model for the study of the angiogenic and inflammatory response to biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* 12, 195-199.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere gilt mein Dank dem überaus kreativen, engagierten und herzlichen Prof. Dr. med. Axel Kramer für die vertrauensvolle Überlassung des Themas, das beständige Interesse am Fortgang der Arbeit, die vielfältige, unermüdliche kreative Unterstützung und für seine Freundschaft.

Besonders danken möchte ich Herrn PD Dr. med. habil. Nils-Olaf Hübner für die Betreuung, die gute, humorvolle und freundschaftliche Zusammenarbeit und für viele inspirative, fachliche Diskussionen sowie Herrn Dr. rer. nat. Gerald Müller für wertvolle praktische Labortipps.

Ich danke

- meinen lieben Kollegen aus den Projekten PlasmaDent und PlasmaCure, Frau Dr. rer. med. Ina Koban und Herrn Dipl. hum. Biol. Herrn Rutger Matthes für ein stets harmonisches Zusammenarbeiten auf noch so engem Raum und allzeit gute kollegiale Unterstützung; darüber hinaus danke ich Frau Dr. Koban besonders für die Koordination und Abwicklung vieler bürokratischer Notwendigkeiten,
- aus dem INP Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Weltmann für die Überlassung der Plasma-Quellen und Herrn Prof. von Woedtke für die Bereitstellung des Plasma-Labors,
- Herrn Dr. Eckehard Kindel und Dr. René Bussiahn für die Unterstützung in Fragen der Physik,
- Herrn Rüdiger Titze und Fr. Christiane Meyer, beide INP, sowie Frau Heike Lühder, Neoplas GmbH, für den technischen Support zur Funktion der Plasmaquellen und Frau Liane Glawe (INP) für die fotografische Unterstützung,
- Frau Katharina Kohl, Frau Juliane Jeschke und Frau Claudia Lehnert für die Unterstützung im Labor und bei der Durchführung der „Eierläufe“,
- Chefsekretärin Frau Brigitte Sümnick für manche „Erste-Hilfe-Maßnahme“, ihre Unterstützung im Bestellwesen und bei der Organisation,
- weiterhin allen Mitarbeitern des Instituts für Hygiene und Umweltmedizin für das angenehme Arbeitsklima und das kollegiale Miteinander: Herrn Dr. rer. nat. Harald Below, Herr Hicham Benkai, Frau Gudrun Lindstedt für Hilfe in

Pilzuntersuchungen, Frau Jaqueline Mentz, Frau Kerstin Sümnick, Frau Margret Schultz, Frau Elke Zellmer,

- Herrn Prof. Dr. Thomas Kocher, Herrn Dr. med Ivo Partecke und Herr Sander Bekeschus für interessante fachliche Diskussionen und Anregungen im Rahmen der interdisziplinären Zusammenarbeit,
- Frau Dr. vet. med. Carola Urhausen, TiHo Hannover, für ihre motivierende praktische und mentale Unterstützung in allen Jahren unserer Freundschaft, ohne die ich nie Tierärztin geworden wäre.

Meinen Eltern, meinem Mann und besonders meinen Kindern danke ich für die Unterstützung und die unendliche Geduld während der letzten Jahre:

Danke

Publikationsliste Claudia Bender:

- Matthes R, **Bender C**, Hübner NO, Müller G, Kohl K, Mentz J, Koban I, Kindel E, Kocher T, Weltmann KD, Lademann J, Kramer A. Influencing of the penetration of *Pseudomonas aeruginosa* into a 3-D epidermis model and the inactivation with tissue tolerable plasma. *GMS Krankenhaushyg Interdiszip* 2009; 4(2):Doc08 (20091216)
- Kramer A, Hübner NO, Assadian O, Below H, **Bender C**, Benkhail H, Bröker B, Ekkernkamp A, Eisenbeiß W, Hammann A, Hartmann B, Heidecke CD, Hinz P, Koban I, Koch S, Kocher T, Lademann J, Lademann O, Lerch MM, Maier S, Matthes R, Müller G, Partecke I, Rändler C, Weltmann KD, Zygmunt M. Chances and perspectives of the plasma medicine by use of Tissue Tolerable Plasma (TTP). *GMS Krankenhaushyg Interdiszip* 2009; 4(2):Doc10 (20091216)
- **Bender C**, Matthes R, Kindel E, Kramer A, Lademann J, Weltmann KD, Eisenbeiß W, Hübner NH. The Irritation Potential of Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma in the HET-CAM. *Plasma Process. Polym.* 2010; 7 (3-4) 318-326.
- Hammann A, Huebner NO, **Bender C**, Ekkernkamp A, Hartmann B, Hinz P, Kindel E, Koban I, Koch S, Kohlmann T, Lademann J, Matthes R, Müller G, Titze R, Weltmann KD, Kramer A. Antiseptic efficacy and tolerance of tissue tolerable plasma (TTP) compared with two wound antiseptics on artificial bacterially contaminated eyes from commercially slaughtered pigs. *Skin pharmacol Skin Pharmacol Physiol* 2010;23:328–332
- Hübner NO, Matthes R, Koban I, Rändler C, Müller G, **Bender C**, Kindel E, Kocher T, Kramer A. Efficacy of Chlorhexidine, Polihexanide and Tissue-Tolerable Plasma against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Grown on Polystyrene and Silicone Materials. *Skin Pharmacol Physiol* 2010;23(suppl 1):28–34 DOI: 10.1159/000318265
- Kramer A, Assadian O, Below H, **Bender C**, Hammann A, Hübner NO, Koban I, Kocher T, Lademann J, Matthes R, Weltmann KD. Perspektiven der Plasmamedizin durch Anwendung von gewebekompatiblen Atmosphärendruckplasmen (Tissue Tolerable Plasma, TTP). *Vakuum Forsch Prax* 2010; 22 (2) 33–38

- Matthes R, Hübner NO, **Bender C**, Koban I, Weltmann KD, Kramer A. Screening test for quality control of surface barrier discharged plasma sources with the microorganism-agar test (MAT). GMS Krankenhaushyg Interdiszip 2010; 5(2):Doc02 (20100921)
- Kramer A, Assadian O, Frank M, **Bender C**, Hinz P, Prevention of post-operative infections after surgical treatment of bite wounds. GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär 2010, Vol. 5(2), , 2010. 5(2).
- **Bender C**, Partecke LI, Kindel E, Döring F, Lademann J, Heidecke CD, Kramer A, Hübner NO. The modified HET-CAM as a model for the assessment of the inflammatory response to tissue tolerable plasma. Toxicology in vitro. 2011; 25, 530-537
- Kramer A, Koban I, Matthes R, **Bender C**, Hübner N, Weltmann K, et al. Wirkungsvoll gegen Mikroorganismen. labor&more. 2011; 11(5):50-54.
- Matthes R, Bekeschus S, **Bender C**, Koban I, Huebner NO, Kramer A. Pilot-study on the influence of carrier gas and plasma application modifications on physical plasma and its antimicrobial effect against Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. GMS Krankenhhyg Interdiszip, 2012. 7(1): p. Doc02.
- **Bender C**, Huebner NO, Weltmann KD, Scharf C, Kramer A. Tissue tolerable plasma and polihexanide: Are synergistic effects possible to promote healing of chronic wounds? In vivo and in vitro results. NATO Science for Peace and Security Series – A: Chemistry and Biology, Springer February 29,2012
- **Bender C**, Kramer A. Wundheilungsförderung durch kombinierte Anwendung von Tissue Tolerable Plasma und Antiseptika: Fallbeispiele aus der Veterinärmedizin. Hyg Med 2012; 37 – Supplement: DGKH-Kongress 2012
- **Bender C**, Pavlovic D, Wegner A, Hinz P, Ekkernakamp A, Kramer A, Sckell A. Intravital Fluorescence Microscopy for the Assessment of Microcirculation and Leukocyte-Endothelium Interaction after application of Tissue Tolerable Plasma in the HET-CAM. In: Mikikian M, Rabat H, Robert E, et al (eds) Abstracts 4th Int Conf Plasma Medicine, Orleans, 2012. <http://icpm4.sciencesconf.org/browse/speaker?authorid=183254>

- **Bender C**, Pavlovic D, Wegner A, Hübner NO, Hinz P, Ekkernkamp A, Kramer A, Sckell A. Beurteilung der Effekte von Niedertemperaturplasma auf die Chorioallantoismembran zur Entwicklung therapeutischer Konzepte für die Behandlung chronischer Wunden, Z f W 2012 B; 78-79
- Koban I, **Bender C**, Assadian O, Kramer A, Hübner NO. Clinical Use of the Antiseptic Polihexanide for Genital Tract Infections. Skin Pharmacol Physiol 2012. 25(6), 298-304, DOI: 10.1159/000340063, published online 20.08.2012