

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie
(Direktor Univ. Prof. Dr. med. Martin Burchardt)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema:
Wirkung von kaltem Atmosphärendruckplasma auf die menschliche Haut

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Universitätsmedizin
der
Universität Greifswald
2021

vorgelegt von:
Hesham Al-Haddad
geboren am: 01.01.1991
in: Sana'a, Jemen

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Martin Weiss

(3. Gutachter:)

Ort, Raum: Greifswald

Tag der Disputation: 09.03.2022

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Aufbau und Histologie der menschlichen Haut	1
1.2 Physiologie und Funktion der menschlichen Haut	4
1.3 Kaltes Atmosphärendruckplasma (CAP)	5
1.4 Klinische Anwendungen von CAP auf der menschlichen Haut:	8
1.5 DNA, DNA-Schäden und apoptotische Doppelstrangbrüche.....	9
2 Zielsetzung.....	12
3 Material.....	13
3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	13
3.2 Chemikalien, Lösungen und Puffer	14
3.3 Zellkultur: Medien, und Zusätze	16
3.4 Zelllinien.....	17
3.5 Antikörper	17
4 Methoden.....	18
4.1 Kultivierung der Zelllinien B16 und HaCaT	18
4.2 Kultivierung des Epidermismodells (epiCS®).....	19
4.3 CAP-Behandlung mit dem Plasmajet kINPen MED	20
4.4 Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Epidermismodells epiCS®	21
4.5 Statistische Analyse.....	23
5 Ergebnisse	24
5.1 Untersuchung der antiproliferativen Wirkung vom CAP auf zwei Zellarten im Zellkulturmodell.....	24
5.1.1 Wirkung vom CAP auf der HaCaT-Zelllinie	24
5.1.2 Wirkung vom CAP auf der B16-Zelllinie	26

5.2	Untersuchung der CAP-Wirkung auf das Epidermismodell epiCS®	28
5.3	Einfluss vom CAP auf den Anteil an γ -H2AX-Positiven Zellen im Epidermismodell epiCS®	31
5.4	Einfluss vom CAP auf den Anteil an Caspase-3 positiven Zellen im Epidermismodell epiCS®	33
6	Diskussion	37
7	Zusammenfassung	45
8	Litratuerverzeichnis.....	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mikroskopische Aufnahme der drei Hautschichten	1
Abbildung 2: Mikroskopische Aufnahme der Epidermis	3
Abbildung 3: Plasmagerät kINPen MED.....	7
Abbildung 4: Geometrie des Plasmageräts kINPen MED	8
Abbildung 5: Das Epidermis-Modell epiCS®	20
Abbildung 6: Einfluss vom CAP auf die HaCaT-Zelllinie	25
Abbildung 7 : Einfluss vom CAP auf die B16-Zelllinie	27
Abbildung 8: Mikroskopische Aufnahme des Epidermismodells	28
Abbildung 9 : Mikroskopische Aufnahmen des Epidermismodells nach verschiedenen Inkubationszeiten.	30
Abbildung 10: Einfluss vom CAP auf den Anteil an γ -HA2X-Positiven Zellen.	32
Abbildung 11: Einfluss vom CAP auf den Anteil an Caspase-3 positiven Zellen	34

Abkürzungsverzeichnis

APPJ	Atmospheric Pressure Plasma Jet
B16	Murine Melanom-Zelllinie
CAP	Kaltes Atmosphärendruck Plasma
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DBD	Dielectric Barrier Discharge
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Solution
DSB	Doppelstrangbrüche
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
epiCS®	3D-Epidermismodell aus epidermalen Keratinozyten
FBS	Fetal Bovine Serum
HaCaT	Human adult low Calcium high Temperature
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
MSSA	Methicillin-sensibler Staphylococcus aureus
PBS	Phosphate-buffered Saline
RNA	Ribonukleinsäure
RONS	Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies
SSB	Einzelstrangbruch
UV	Ultraviolett
γ -H2AX	gamma-H2AX Phosphoryliertes Histon als DSB-Marker

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Histologie der menschlichen Haut

Die menschliche Haut bildet als Grenzorgan eine Barriere zwischen inneren Organen und der Umwelt. Somit ist die Haut zahlreichen physikalischen und chemischen Einflüssen ausgesetzt (1). Mit einer Oberfläche von 1,5 bis 2m² und einem Gewicht von circa 20% des Körpergewichts gilt die Haut als das größte Organ des Menschen (2, 3). Makroskopisch wird zwischen zwei Hautarten unterteilt, die Leistenhaut und die Felderhaut. Die Felderhaut bedeckt den größten Teil des Körpers und verfügt über Haare und Talgdrüsen, wohingegen die Leistenhaut nur am Fuß und an den Handflächen vorkommt (1).



Abbildung 1: Mikroskopische Aufnahme der drei Hautschichten

Die mikroskopische Aufnahme der Haut zeigt einen Querschnitt der drei Hautschichten eines Hautareals aus der Hohlhand. Man erkennt Struktur und Aufbau der Hautschichten bestehend aus Epidermis, Dermis und Subcutis. Abbildung aus Welch (2).

Die menschliche Haut besteht mikroskopisch aus: Epidermis, Dermis und Subcutis. Jede Hautschicht besteht aus mehreren Zellschichten mit verschiedenen Zellarten (2). Neben den speziellen Epithelzellen, den Keratinozyten befinden sich andere Zellentypen zum Beispiel Immunzellen (Langerhanszellen), Sinneszellen (Merkelzellen) und melaninproduzierende Zellen (Melanozyten). Embryologisch stammen Dermis und Subdermis aus dem Mesoderm, während die Epidermis und ihre speziellen Zellen im Ektoderm ihren Ursprung haben (3).

Epidermis

Die Epidermis ist die Epithelschicht der Haut. Sie besteht aus mehreren Zellschichten und beinhaltet verschiedene Zellarten. Es handelt sich hier um ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel (2). Diese Hautschicht besteht aus vier Zellschichten: Stratum basale (Basalzellschicht), Stratum spinosum (Stachelzellschicht), Stratum granulosum (Körnschicht) und Stratum corneum (Hornschicht).

Die Epidermis ist mit der Dermis durch eine Basalmembran mit Anker und Mikrofibrillen verankert. Direkt auf der Basalmembran befindet sich die Basalzellschicht. Bestehend aus einer Zellreihe von Keratinozyten und teilungsfähigen Stammzellen dient die Basalzellschicht als Keratinozyten-Nachschub (3). Die Stachelzellschicht besteht aus drei bis fünf Zellschichten. Die Zellen haben stachelförmige Fortsätze, die durch Desmosomen mit anderen Zellen Kontakt aufnehmen (2). Die Körnerzellschicht zeichnet sich durch basophile Keratinozytengranula aus (1). Die äußerste Zellschicht der Epidermis ist die Hornzellschicht. Je nach Hautareal variiert die Dicke der Hornzellschicht aus den bereits abgestorbenen Keratinozyten. In der Leistenhaut ist die Hornzellschicht dicker als in der Felderhaut (3). Die Keratinozyten dieser Zellschicht haben keinen Zellkern oder Zellorganellen und bestehen nur noch aus dem Zytoskelett, den Keratinfilamenten (2).

Neben den epithelialen Keratinozyten beinhaltet die Epidermis drei weitere Zellarten: Langerhanszellen, Merkelzellen und Melanozyten. Die Langerhanszellen wurden vom Medizinstudenten Paul Langerhans 1867 entdeckt und nach ihm benannt. Diese Zellen stammen aus Zelllinien des Knochenmarks und sind antigenpräsentierende dendritische Zellen und damit dem Immunsystem zuzuordnen (1).

Die Merkelzellen sind nach dem Göttinger Anatomen Friedrich Merkel benannt. Diese Zellen stammen aus der Neuralleise und dienen als Mechano-Druck-Rezeptoren der

menschlichen Haut. Die Melanozyten befinden sich in der basalen Zellschicht und entstammen auch wie die Merkelzellen aus der Neuralleiste. Die Melanozyten sind für die Bildung des braunen Pigments, dem Melanin zuständig (1).

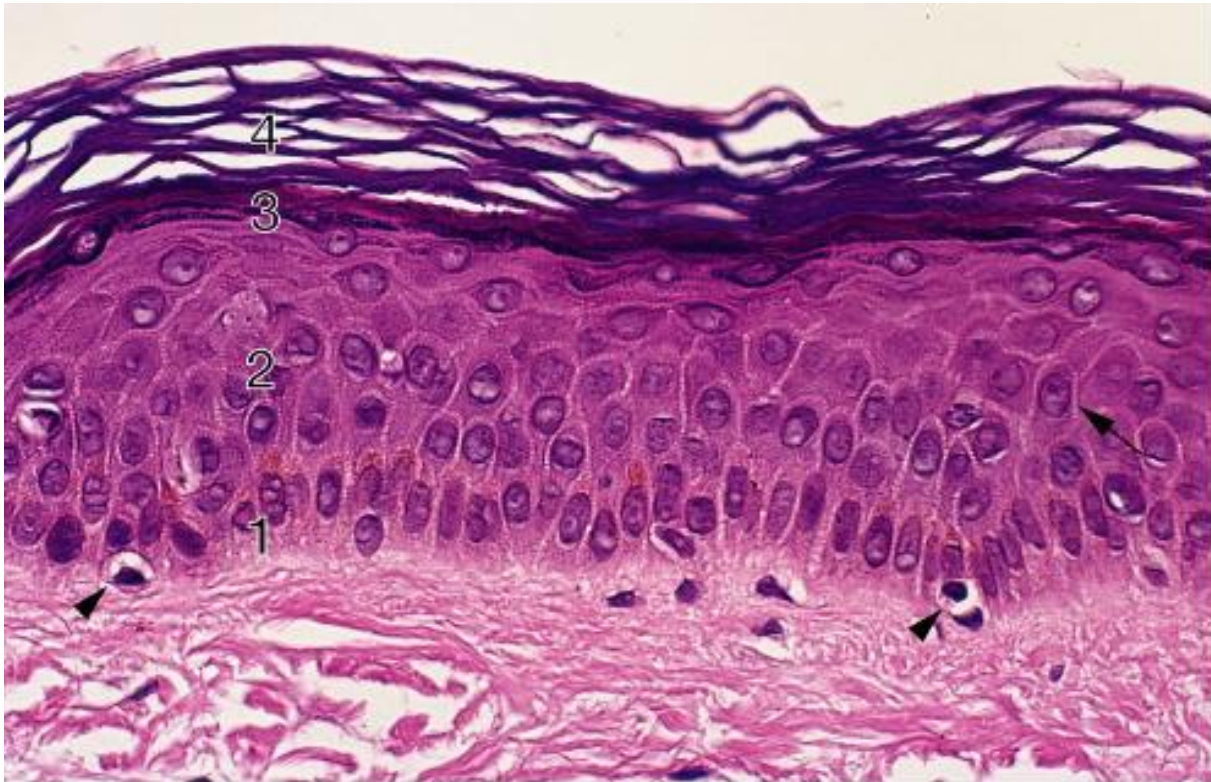


Abbildung 2: Mikroskopische Aufnahme der Epidermis

Die Mikroskopie der Epidermis zeigt den Aufbau der verschiedenen Zellschichten der Epidermis (450fach). (1) Stratum basale, (2) Stratum spinosum, (3) Stratum granulosum, (4) Stratum corneum. ► Melanozyten. → feine Zytoplasmfortsätze mit Desmosomen Abbildung aus Welch (2).

Dermis

Die Dermis (Corium, Lederhaut) ist mit der Epidermis durch eine dermo-epidermale Junktionszone verankert. Wesentlicher Bestandteil dieser Junktionszone sind Hemidesmosomen, Integrin und Kollagen Typ IV (1). Die Dermis bildet die spezielle Bindegewebeschicht der Haut. In der Dermis wird zwischen zwei Schichten unterschieden: Stratum papillare und Stratum reticulare. Das Stratum papillare liegt direkt unter der Epidermis und versorgt sie durch Diffusion mit Nährstoff und Sauerstoff. Im Stratum papillare befinden sich zahlreiche Blutgefäße, Lymphgefäße, Nervenendungen und die Meisner-Tastkörperchen, welche als Sinnesorgan für den Tastsinn von Bedeutung sind (3). Das Stratum reticulare ist mechanisch zugfest. Diese Schicht ist arm an Zellen aber reich an Bindegewebe. Hauptbestandteil sind Kollagen Typ 1 und dicke elastische Fasern. Dank dieser Schicht kann die Haut ihre Ausgangsposition nach Zug wieder aufnehmen (1).

Subkutis

Der wesentliche Bestandteil dieser Hautschicht ist Fettgewebe. Dabei liegt das Fettgewebe unterteilt durch Septen aus lockerem Bindegewebe in Fettläppchen. Außer Fettzellen befinden sich in der Subkutis die Vater-Pacini-Lamellenkörperchen, welche als Sinnesrezeptoren für Druck und Vibration dienen. Darüber hinaus liegt der Ursprung der Haarfollikel und der Schweißdrüsen in der Subcutis. Durch ihren hohen Gehalt an Fettgewebe dient die Subcutis als Energiespeicher, Wärmeisolator und mechanisches Schutzpolster (2).

1.2 Physiologie und Funktion der menschlichen Haut

Durch ihren komplexen Aufbau und ihre komplexe Physiologie erfüllt die Haut viele biologische, physikalische und physiologische Funktionen. Die Haut verfügt über zahlreiche Zellarten, die verschiedenen physiologischen Systemen zuzuordnen sind. Die Barriere Funktion, der Schutz vor Mikroorganismen, der Schutz vor großen und kleinen Molekülen und der Schutz gegen UV-Strahlen sind durch den speziellen Aufbau und Struktur der Epidermis gewährleistet (1). Die Epidermis ist wasserdicht und schützt dadurch den Körper vor dem Austrocknen. Somit trägt sie wesentlich zur Regulation des Wasserhaushalts bei (3). Die Schweißdrüsen in der Dermis sind durch

das autonome Nervensystem reguliert und für die Thermoregulation des menschlichen Körpers mitzuständig. Durch die Aktivierung der Schweißdrüsen wird Wärme in die Umgebung abgegeben (1, 3).

Die menschliche Haut hat eine bedeutsame immunologische Funktion. Einerseits durch die physikalische Barriere gegenüber Keimen, andererseits durch spezielle Immunzellen leistet sie einen wichtigen Beitrag zum immunologischen Schutz. Die Langerhanszellen der Epidermis sind spezielle Immunzellen, die für die Antigenpräsentation auf der Haut zuständig sind (2). Darüber hinaus dient die Haut als wichtiges Sinnesorgan und erfüllt damit zahlreiche Sinnesfunktionen. Die Merkelzellen (Druckrezeptoren), die Vater-pacini-Körperchen (Vibrationsrezeptoren) und die Meisner-Körperchen (Tastrezeptoren) sind spezielle Sinneszellen und Sinnesorganellen, die auf der Haut ihren Sitz haben. Außerdem verfügt die menschliche Haut über große Mengen an freien Nervenendungen, die für Thermorezeption und Nozizeption verantwortlich sind (4).

Ferner hat die menschliche Haut hormonelle Funktionen. In der Haut findet der erste Schritt der Vitamin-D-Synthese statt. Durch Ultraviolett-Strahlung (UV-B) mit einer Wellenlänge von 280–320 nm wird in der Haut 7-Dehydrocholesterin in Prävitamin D3 und dann weiter in Cholecalciferol D3 umgewandelt (5).

1.3 Kaltes Atmosphärendruckplasma (CAP)

CAP (vom eng. cold atmospheric plasma) ist ein Plasmatyp, welches unter normalem Atmosphärendruck erzeugt wird und niedrige Temperaturen hat (6). Der Begriff physikalisches Plasma bezeichnet ein hochreaktives ionisiertes Gas, welches sich in wechselnden Anregungszuständen und in ständiger Wechselwirkung mit der Umgebung befindet (7). Aufgrund dieser besonderen Eigenschaften vom Plasma wird es neben fest, flüssig, und gasförmig als den vierten Aggregatzustand der Materie bezeichnet (8, 9). Der Begriff Plasma hat mit der im allgemeinen Sprachgebrauch verwendeten Bezeichnung von Zellfreiem Bestandteil des Bluts nichts zu tun und wurde in diesem Sinne erstmals im Jahr 1928 vom US-amerikanischen Nobelpreisträger Langmar verwendet (10).

Das Plasma entsteht aus Gas, dem große Energie hinzugefügt wird (11). Wenn die Energie groß genug ist, damit Elektronen die elektrostatische Potentialbarriere überwinden können, treten freie Elektronen auf und ein positiv geladenes Ion entsteht (12). Plasma ist insgesamt ein neutral ionisiertes Gas, besteht aber aus positiv geladenen Ionen, Elektronen, Neutralteilchen und UV-Strahlen (6, 13, 14).

Technisch unterscheidet man zwei Formen der physikalischen Plasmen. Das thermische (heiße) Plasma und das non-thermische (kalte) Plasma. Thermisches Plasma erreicht Temperaturen von bis zu 1000° wohingegen nicht-thermische Plasmen (CAP) deutlich niedrigere Temperaturen bis maximal 40° erreichen. Solche nicht-thermischen Plasmen haben biologische Effekte und sind auf lebende Zellen und Gewebe anwendbar, und somit für medizinische Anwendungen geeignet (10, 13, 15, 16).

In den letzten Jahrzehnten wurde die biomedizinische Anwendung von kalten Atmosphärendruck Plasmen (CAP) intensiv erforscht und die Suche nach neuen therapeutischen Einsatzmöglichkeiten stieg rasant an. Dabei wurde über ein breites Spektrum verschiedener Plasmaquellen für biomedizinische Anwendungen berichtet (17). Technisch kann man drei CAP-Quellen für biomedizinische Anwendungen unterscheiden: Dielectric Barrier Discharge (DBD), Atmospheric Pressure Plasma Jet (APPJ) und das Corona-Discharge Plasma (13). Gemeinsam haben alle CAP-Quellen das Vorhandensein von freien Elektronen und Ionen, freien Radikalen und neutralen Molekülen in ständiger Wechselwirkung. Die wichtigste biologisch aktive Komponente des Plasmas ist die Vielzahl reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS), die bei der Reaktion mit Molekülen (Sauerstoff, Stickstoff und Wasser) in der Umgebungsluft gebildet werden (18). Viele wissenschaftliche Arbeiten belegen, dass die RNOS eine wesentliche Rolle für die Stimulation physiologischer und pathologischer Prozesse in Zellen spielen (19-23).

Die antimikrobielle und apoptotische Wirkung sowie die Stimulation von Gewebsregeneration macht CAP zu einer vielversprechenden therapeutischen Möglichkeit in vielen Bereichen der Medizin (12, 13, 24-26). Beispielsweise bietet CAP zahlreiche therapeutische und klinische Anwendungen in der Dermatologie (z.B. Ulcera, Wundbehandlung), in der Chirurgie zur Blutstillung oder Tumorchirurgie, in der Onkologie zur Krebsbehandlung, in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde für eine Wurzelkanalbehandlung oder eine Implantat-Desinfektion (27).



Abbildung 3: Das Plasmagerät kINPen MED

Die Abbildung zeigt den Aufbau des Plasmageräts kINPen MED. Rechts sieht man das Handgerät (Plasmastift), aus dem der Plasmastrahl austritt. Abbildung aus (28).

In dieser Arbeit wurde das Plasmagerät kINPen MED für die CAP-Behandlung eingesetzt. Der kINPen MED ist ein APPJ welches von neoplastools (Greifswald) für medizinische Anwendungen entwickelt wurde. Dieser Plasmajet erreicht nur niedrige Temperaturen und verwendet Argon als Trägergas. Die typische Länge des Plasmaabflusses beträgt 9 bis 12mm und 1mm Durchmesser. Der kINPen MED bekam als erstes Plasmajet weltweit eine Zulassung und Zertifizierung als medizinisches Gerät (Class IIa) (29). Der kINPen MED wird zur Behandlung von chronischen und/ oder infizierten Wunden und Ulcera der menschlichen Haut eingesetzt (30). Neben der Behandlung von Wundheilungsstörungen gibt es zahlreiche Einsatzmöglichkeiten vom CAP in der Dermatologie (31).

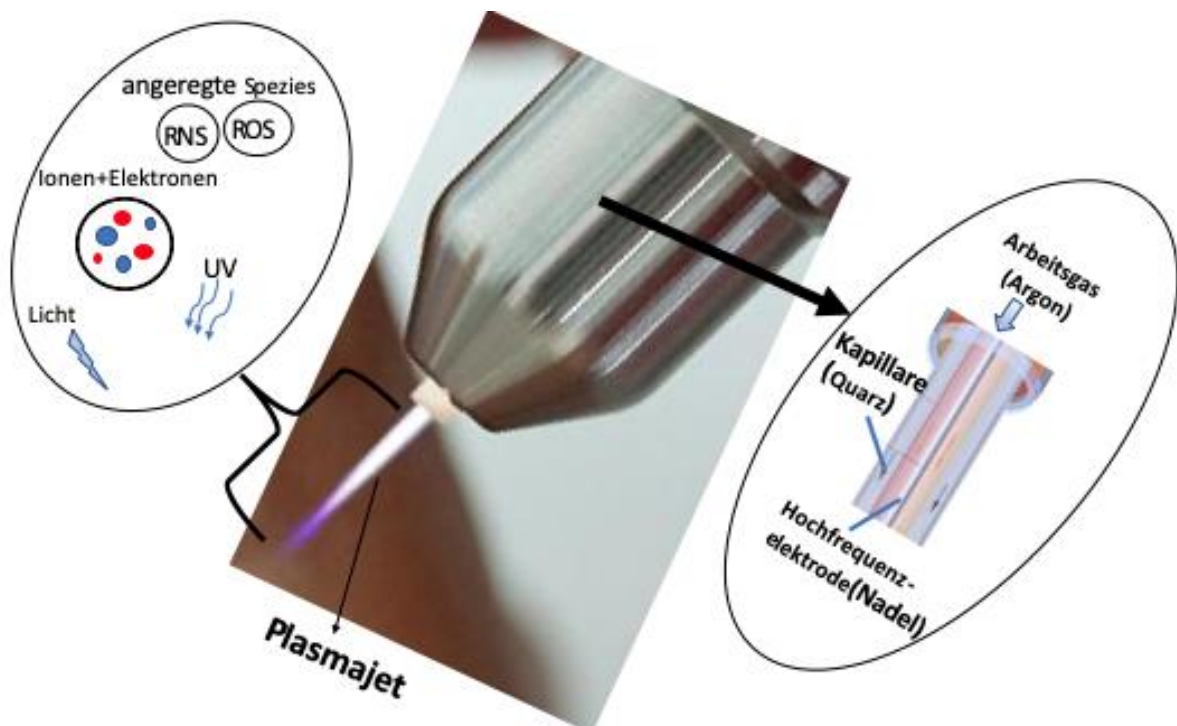


Abbildung 4: Geometrie des Plasmageräts kINPen MED

Das Plasmajet oder Plasmastrahl tritt aus der Spitze des Handgeräts aus. Das Arbeitsgas, hier Argon, wird durch Hinzufügen von Energie zu CAP. Wichtige biologisch aktive Wirkungskomponenten des Plasmajets sind angeregte Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies (RONS), Ionen+Elektronen und UV. In Anlehnung an (6).

1.4 Klinische Anwendungen von CAP auf der menschlichen Haut:

Die menschliche Haut ist das einzige Organ des Körpers, welches für eine direkte therapeutische Anwendung vom CAP vollständig zugänglich ist. Der therapeutische CAP-Einsatz findet meistens topisch statt. Aus diesem Grund bietet die Hautoberfläche eine sehr gute und unkomplizierte Einsatzmöglichkeit für klinische CAP-Anwendungen mittels APPJ oder DBD wie kINPen MED oder PlasmaDerm® (31).

CAP zeigt sowohl in vitro als auch in vivo sehr effiziente antimikrobielle Wirksamkeit gegen zahlreiche Hautkeime inklusive multiresistente Keime wie Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus (MRSA) (32, 33). Es wurde gezeigt, dass CAP zu signifikanter Keiminaktivierung von 168 MSSA und 56 MRSA Stämmen führt (34). Außerdem zeigt

der CAP-Einsatz auf infizierten Ulzera und chronischen Wunden der Haut eine hohe Wirksamkeit (35-37).

Durch die gewebergenerierenden und durchblutungsstimulierenden Eigenschaften zeigt CAP eine signifikante Verbesserung bei der Behandlung chronischer und akuter Wunden und bei Wundheilungsstörungen auf der Haut (36, 38, 39). Hierbei spielen die durch die CAP-Behandlung entstandenen RONS eine wichtige Rolle bei der Stimulation und Regeneration des Gewebes während der Wundheilung (40-43).

Außer der Behandlung von Wunden und Ulcera wird CAP mittlerweile oft in der Dermatologie eingesetzt. In der klinischen Anwendung zeigte CAP positive Wirksamkeit gegen verschiedene Erkrankungen oder Störungen der Haut, z.B. bei atopischem Ekzem, Pruritus, Ichthyosen, epidermalem Barrieredefekt, Narben, Akne, oder Psoriasis (31, 44, 45).

Darüber hinaus kann CAP selektiv die Apoptose von Tumorzellen induzieren (26, 40). Somit stellt CAP eine neue und vielversprechende therapeutische Möglichkeit für die Behandlung von Hauttumoren dar. Im Gegensatz zur Chemo- und Strahlentherapie ist das attraktivste Merkmal von CAP die Selektivität, Krebszellen abzutöten (46). Bei In-vitro-Arbeiten wurden Melanomzellen mit CAP behandelt. Diese Behandlung führte zur Induktion der Apoptose sowie zu einer sofortigen und langanhaltenden irreversiblen Inaktivierung der Melanomzellen (47, 48).

1.5 DNA, DNA-Schäden und apoptotische Doppelstrangbrüche

Die Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist der Träger der Erbanlagen. Sie speichert die Information für die Bildung und Erhaltung eines Organismus. Die Bausteine der DNA sind Nucleotide. Ein Nucleotid besteht aus einem Phosphatrest, einer 2-Desoxyribose, und einer Base. Das bis heute gültige Modell der DNA als Doppelhelix wurde von Francis Crick und James Watson im Jahr 1953 entwickelt (49). Wesentliche Merkmale des Doppelhelix-modells sind folgendermaßen beschrieben: Die DNA liegt in den Zellen doppelsträngig vor. Zusammengehalten werden die Stränge über Wasserstoffbrückenbindungen. Die Basen Adenin (A) und Thymin (T) sowie Guanin (G) und Cytosin (C) sind jeweils komplementär zueinander, die Orientierung ist dabei gegenläufig oder antiparallel (50).

DNA kann als B-Form (rechtsgängig), A-Form (kristalline) oder Z-Form (linksgängig) vorliegen. Allerdings ist die B-Form-DNA die gängige Konformation in lebenden Zellen. Die B-Form-DNA ist durch einen Helixdurchmesser von 2nm, eine große und eine kleine Furche charakterisiert (50). Ein dominantes Merkmal der B-Form-DNA ist das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Furchen. Diese Furchen bieten eine sehr unterschiedliche Oberfläche, an der zahlreiche Proteine an die DNA binden und darüber Prozesse wie Replikation, Transkription und Reparatur regulieren (49).

Die DNA liegt im Zellkern als Chromatin vor. Chromatin ist ein Komplex aus DNA, verschiedenen Proteinen und RNA Molekülen. Somit wird DNA im Zellkern auf mehreren Ebenen dicht gepackt, um sie im Zellkern unterzubringen. Im Chromatin werden die Proteine in Histone und Nicht-Histone unterschieden. Histone sind sehr wichtige und evolutionär stark konservierte Proteine, die bei der Verpackung der DNA von essentieller Bedeutung sind. Man kann Linker-Histone und Core-Histone unterscheiden. Die Histone H2A, H2B, H3 und H4 sind Core-Histone. Sie bilden zusammen ein Histonoktamer, um das sich DNA wickelt und das Nucleosom bildet. Mehrere Nucleosome bilden eine Chromatinfaser (50).

Darüber hinaus werden Histone durch Enzyme modifiziert und erfüllen zahlreiche Aufgaben im Zellkern. Dabei unterliegen Histone einem komplexen und dynamischen Muster kovalenter Modifikationen. Es wird angenommen, dass diese Histonmodifikationen an der Modulation der Transkription, an der Inaktivierung von X-Chromosomen bei weiblichen Säugetieren sowie an der Genomstabilität und der Dynamik meiotischer Chromosomen beteiligt sind. Bisher berichtete Histonmodifikationen umfassen Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung, ADP-Ribosylierung und Ubiquitylierung (51). Beispielsweise ist die Phosphorylierung des Histon H2AX zu γ -H2AX von essenzieller Bedeutung für die DNA (52, 53). γ -H2AX gilt als biologischer Marker für DNA-Schäden. Bei Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB) werden durch die Phosphorylierung von H2AX essenzielle Vorgänge für die Zelle aktiviert, nämlich DNA-Reparaturmechanismus oder die Induktion des natürlichen Zelltodes, der Apoptose (52, 54-57).

DNA-Schäden treten in allen Zellen auf und können in zwei Arten eingeteilt werden, endogen und exogen. Endogene DNA-Schäden werden von der Zelle selbst verursacht und können auf verschiedenen Wegen wie Apoptose, Exzisionsreparatur, oxidativen Schäden oder Depurinierung auftreten. Exogene Schäden treten auf, wenn

Zellen physikalischen (radioaktive oder UV-Strahlung) oder chemischen (Zytostatika) Noxen ausgesetzt sind. Der daraus resultierende DNA-Schaden kann Basenschaden, Einzelstrangbruch (SSB) oder DSB sein, wobei letztere für die Zellen tödlich sind (58).

Die Zellen verfügen jedoch über DNA-Reparaturmechanismen und können größtenteils diese Schäden reparieren. Im günstigen Fall werden die DNA-Schäden durch die Reparaturmechanismen aufgehoben. Gegebenenfalls kann aber auch die Apoptose induziert werden, um Zellen mit beschädigter DNA zu eliminieren. Bei gravierenden und nicht zu reparierenden DNA-Schäden kann es zu Mutationen und oder zu fehlerhaften Funktionen beziehungsweise bösartigen Zellen führen (59). DSB sind schwerer zu reparieren als Einzelstrangbrüche oder Basenschäden, und ihre Fehlreparatur ist häufig mit Chromosomenaberrationen und Apoptose verbunden (60).

Die DSB sind DNA-Schäden mit gravierenden Folgen für die Zellen. Sie können durch ionisierende Strahlen, UV-Strahlen, Chemikalien oder reaktive Spezies entstehen (61, 62). Die reaktiven Spezies wie RONS können als Folge von Stoffwechsel- und anderen biochemischen Reaktionen sowie externen Faktoren in lebenden Zellen gebildet werden. Durch RONS verursachte DNA-Schäden sind die am häufigsten auftretenden Schäden (63). RONS umfassen Superoxid ($O_2^- \cdot$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikale ($OH \cdot$), Singulett-Sauerstoff, Stickoxid (NO), Stickstoffdioxidradikal (NO_2), Peroxynitrit ($ONOO^-$), Peroxynitrige Säure (OONOH) und Alkylperoxynitrit (ROONO) (102). RONS können DNA oxidieren, was zu verschiedenen Arten von DNA-Schäden führen kann, einschließlich oxidierter Basen, SSB und DSB (64, 65).

Es wurde berichtet, dass DNA-DSB die Phosphorylierung vom Histon H2AX in der C-terminalen Region von Serin 139 und die Bildung von γ -H2AX induzieren können (52). H2AX ist eine Variante der H2A-Proteinfamilie, die ein Bestandteil des Histonoktamer in Nucleosomen der DNA ist (57). Zum Nachweis von DNA-DSB in den behandelten Zellen wurde das γ -H2AX herangezogen.

2 Zielsetzung

Plasmamedizin ist ein innovatives und therapeutisch vielversprechendes Forschungsfeld in der Medizin, welches in den letzten Jahren eine enorme internationale Entwicklung bekommen hat (66). CAP wird mit Hilfe von Plasmageräten produziert, um therapeutische Effekte an Patienten zu bewirken. Aktuell sind einige Plasmageräte zur Behandlung von chronischen, akuten und infizierten Wunden der Haut zugelassen (66). Die zugrundeliegenden zell- und molekularbiologischen Mechanismen der Wechselwirkungen zwischen Plasma und lebenden Zellen oder Gewebe sind jedoch noch nicht vollständig charakterisiert. Wissenschaftliche Arbeiten belegen, dass RONS die biologisch aktiven Komponenten der biologischen CAP Wirkung sind. Die RONS des CAP haben antiproliferative Wirkung und können auch Wechselwirkungen mit der zellulären DNA auslösen. Die Sicherheit und Wirksamkeit vom CAP auf der menschlichen Haut wurde in einigen Arbeiten untersucht. Jedoch berichten einige Arbeitsgruppen, dass die RONS von CAP zu DNA-Schäden führen können.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die antiproliferative Wirkung von CAP auf Zellkulturen untersucht und die Abhängigkeit zwischen Behandlungszeit und antiproliferative Wirkung mittels Wachstumskurven dargestellt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Wirkung vom CAP auf die DNA der Epidermiszellen. Hierfür wird ein dreidimensionales Epidermismodell, das epiCS[®] eingesetzt. Das epiCS[®] ist aus primären Keratinozyten gezüchtet und ähnelt stark der Epidermis der menschlichen Haut. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es nach der CAP-Behandlung mit 30s, 60s und 120s Behandlungszeit zu DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB) kommt. Darüber hinaus wird untersucht, ob die Apoptose vermehrt oder in Zusammenhang mit DNA-DSB nach der CAP-Behandlung auftreten könnte. In beiden Behandlungsgruppen wird das Plasmagerät kINPen MED eingesetzt.

Mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen werden γ -H2AX positive Zellen zum Nachweis von DSB und aktivierte Caspase 3-positive Zellen zum Nachweis von apoptotischen Zellen herangezogen.

3 Material

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/ Verbrauchsmaterial	Hersteller
15 ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
50 ml Falcon®	BD Biosciences, Heidelberg
Absaugvorrichtung Integra Vacusafe	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz)
Absaugvorrichtung VACUSIP Integra	Biosciences (Zizers, Schweiz)
Autoklav VX150	Systec, Wetzlar
Brutschrank function line	Heraeus Instruments (Hanau)
CASY Röhrchen	Roche Innovatis, Reutlingen
CASY TT Cell Counter and Analyzer	Roche Diagnostics, (Basel, Schweiz)
Feinwaage ABS 120-4	Kern & Sohn, Balingen
Filterpapier	Whatman, Dassel
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	Keyence, Neu-Isenburg
Gewebekulturflasche 25 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturflasche 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Heizblock QBT1	CLF Laborgeräte, Emersacker
Glaspasteurpipette	VWR International (Darmstadt)
Inkubator Nuaire™	US Autoflow NuAire (Plymouth, USA)
kINPen® MED, Plasma-Jet	neoplas tools GmbH i. G., Greifswald
Klimageräte (4°C, -20°C, -80°C, -140°C)	Liebherr, Biberach an der Riß
Kühl-/Gefrierkombi Mediline Lcexv 4010	Liebherr, Biberach an der Riß

Lichtmikroskop	VWR International, Darmstadt
Pipettensatz 0,5 - 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettensatz 0,5 - 1000 µl	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Reagiergefäß 0,5 ml, 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 2 ml, SafeSeal	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipette 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Rockford (USA)
TC-Platte 6 Well /24 Well	Sarstedt, Nümbrecht
Vortex-Schüttler peqTWiST	VWR PeqLab, Erlangen
Vortex-Schüttler RS-VF10	Phoenix Instrument, Garbsen
Waage EMB 2000-2	Kern&Sohn, Balingen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbad WNB10	Memmert, Schwabach
Zentrifuge Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Centrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg

3.2 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Chemikalie	Hersteller
D(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
D-Glucose	Carl Roth, Karlsruhe

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Phosphate-buffered Saline (PBS)	Biochrom AG, Berlin
Formaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Konservierer für Wasserbäder	Carl Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	SERVA, Heidelberg
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, USA
Toluol	Carl Roth, Karlsruhe
Paraffin	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe

Puffer/Lösung	Herstellung
Poly-L-Lysin Lösung	0,01 % w/v Poly-L-Lysin in sterilem A. bidest
10x PBS	1,37 M NaCl; 26,8 mM KCl; 17,6 mM KH ₂ PO ₄ ; 101,1 mM Na ₂ PO ₂ × 2 H ₂ O; pH 7,4
CASYton®	0,9 % NaCl; 0,02925 % EDTA
PBTG-Puffer	0,1% Rinderserumalbumin, 0,05% Polysorbat-20 und 0,3% Fischgelatine
PBS/Formaldehyde	PBS;3,7% Formaldehyde
PBS / Glycin	PBS ; 0.1% Glycin

3.3 Zellkultur: Medien, und Zusätze

Medium/Zusatz	Hersteller
10x Trypsin-EDTA 0,5/0,2 % in DPBS	PAN Biotech, Aidenbach
2x Trypsin/EDTA	20 % v/v 10x Trypsin/EDTA in DPBS
fetales Rinderserum (fetal bovine serum, FBS)	PAN Biotech, Aidenbach
Vollmedium	1 % Penicillin/Streptomycin 10 % FCS (hitzeinaktiviert) in DMEM
Einfriermedium	70 % v/v DMEM 20 % v/v FCS 10 % v/v DMSO
epiCS® Culture Medium	CellSystems GmbH, Troisdorf

3.4 Zelllinien

Zellart	Anwendung
B16 (Murine Melanom-Zelllinie)	Zellkultur
HaCaT (Human adult low Calcium high Temperature) Keratinocyten	Zellkultur
ePiCS® (aus epidermalen Keratinocyten)	3D-Epidermismodell

3.5 Antikörper

Primäre Antikörper

Mouse anti-c-H2AX, 1/500

Rabbit polyclonal anti-active Caspase-3, 1/200

Hersteller

Milipore

Abcam

Sekundäre Antikörper

Goat anti-mouse Alexa 488 1/600

Donkey anti-rabbit-Cy3 1/800

Dianova

Dianova

4 Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl Zellkulturen als auch ein dreidimensionales Epidermismodell für die CAP-Behandlung eingesetzt. Die Zelllinien HaCaT und B16 wurden für die Herstellung von Wachstumskinetiken verwendet. Die Zellzahl wurde jeweils nach 4h, 24h, 48h, 72h, 96h und 120h mittels des CASY Cell Counter + Analyser System Model TT bestimmt. Das Epidermismodell wurde nach der CAP-Behandlung für die fluoreszenzmikroskopische Analyse fixiert, eingebettet und immungefärbt. Anhand von den fluoreszenzmikroskopischen Bildern wurde die Gesamtzellzahl der γ -H2AX und Caspase-3 positiven Zellen manuell bestimmt und statistisch ausgewertet.

4.1 Kultivierung der Zelllinien B16 und HaCaT

Die B16 und HaCaT Zellen wurden nach dem Auftauen passagiert und für die CAP-Behandlung ausgesät. Zum Auftauen wurden die Zellen in Cryogefäßen überführt und bei 37°C inkubiert. Danach wurden sie langsam in mehrere Milliliter Medium überführt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zum Schluss wurden die Zellen erneut in warmem Medium vorsichtig aufgenommen und in eine Zellkulturflasche gegeben. Während der Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit fanden täglich lichtmikroskopische Kontrollen, um zu erkennen, wann man die Zellen wieder passagieren muss.

Die Kultivierung der beiden Zelllinien fand in T75-Flaschen in DMEM-Kulturmedium und unter Zusatz von 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin statt. Die Zelllinien wurden bei Erreichen einer Konfluenz von circa 90 % in neue Flaschen umgesetzt. Meistens wurden die Zellen innerhalb von circa 48 Stunden umgesetzt.

Zum Passagieren der Zellkultur wurde das Zellmedium abgesaugt. Danach wurde der Flaschenboden mit 5ml PBS gewaschen, um den überstehenden Detritus zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 2ml Trypsin 3 Minuten lang behandelt, um sie vom Boden der Zellkulturflaschen zu lösen. Die Zellsuspension wurde mit Medium verdünnt und in einem bestimmten Verhältnis (1:4, 1:8) neu ausgesät. Bei einer Konfluenz von 90%, werden sie erneut passagiert.

4.2 Kultivierung des Epidermismodells (epiCS®)

Für die Durchführung der Versuche mit dem Epidermismodell wurde ein dreidimensionales, der humanen Epidermis äquivalentes Modell, das epiCS® bei Cellsystems® GmbH bestellt. Die dreidimensionalen epiCS® ähneln stark der menschlichen Epidermis und werden aus normalen primären epidermalen Keratinozyten des Menschen rekonstruiert. Laut Angaben des Herstellers werden die epiCS® im Labor in mehreren Phasen hergestellt. Erstens werden die Keratinozyten in Zellkultureinsätzen (0,6 cm²) unter untergetauchten Bedingungen kultiviert. Danach werden die Gewebe in die Luft-Flüssigkeits-Interphase gehoben, um Differenzierung, epitheliale Schichtung und Verhornung zu induzieren (67). Die Zellstruktur von epiCS® ähnelt stark einer natürlichen menschlichen Epidermis, die eine Basalmembran, proliferierende Keratinozyten und ein Stratum corneum mit einer intakten Barrierfunktion zeigt. Darüber hinaus zeigt es eine hervorragende In-vitro / In-vivo-Vergleichbarkeit (67).

Die epiCS® Proben wurden ein Tag vor der CAP-Behandlung bei 4°C in (0.6cm²) Transportplatten geliefert. Das notwendige Kulturmedium wurde mitgeliefert. Bei Empfang der Lieferung wurden die epiCS® Proben gemäß Angaben des Herstellers vorbereitet (67). Dabei wurden die epiCS® Proben inklusive Transportplatten für die Inkubation und weitere Verwendung in 6-Well-Platten mit 1ml *epiCS® Kulturmedium* eingebracht (siehe Abb.5). Vor der CAP-Behandlung wurden die epiCS® Proben für 24 Stunden bei 37°, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.



Abbildung 5: Das Epidermismodell epiCS®

Epidermismodell epiCS® in einem (0,6 cm²)Transportinsert über einer 6-Well-Platte mit epiCS® Kulturmedium. Abbildung aus (67).

4.3 CAP-Behandlung mit dem Plasmajet kINPen MED

Grundsätzlich erfolgte die CAP-Behandlung in dieser Arbeit mit dem Plasmajet kINPen MED, Neoplas Tools, Greifswald. (Argon als Trägergas, Gasfluss: 4 l / min; Versorgungsspannung = 65 V DC; Frequenz: 1,1 MHz) (30). Die CAP-Behandlung wurde je nach Versuch mit verschiedenen Behandlungszeiten mittels manueller, gleichmäßiger und kreisender Bewegung des Plasmajets über den Zellen durchgeführt. Während der Behandlung wurde ein Abstand von 0,5 cm zwischen dem Plasmajet und der Oberfläche der Zellen eingehalten.

Für die Behandlung der Zelllinien wurden die HaCaT-Zellen beziehungsweise B16-Zellen in 24-Well-Platten ausgesät. Wegen unterschiedlicher Wachstumseigenschaften der beiden Zelllinien wurde für jede Zelllinie eine bestimmte Anfangszellzahl pro Well festgelegt. Für die HaCaT-Zelllinie wurden pro Well 10000 Zellen ausgesät. Für die B16-Zelllinie wurden 5000 Zellen pro Well ausgesät. Die CAP-Behandlung wurde in Zellsuspension mit 200µl Kulturmedium durchgeführt. Anschließend wurde zu den 200µl Zellsuspension/Medium 800µl unbehandeltes

Medium hinzugefügt, damit die Zellen 120 Stunden lang wachsen konnten. Nach der CAP-Exposition wurden die 24-Well-Zellkulturplatten bei gesättigter Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂-Gehalt und 37°C inkubiert. Nach 120h Inkubation wurden mittels regelmäßigen Zellzahlmessungen Werte für die Erstellung von Wachstumskinetiken ermittelt. Die Zellzahlmessungen fanden jeweils nach 4h, 24h, 48h, 72h, 96h und 120h Inkubation statt. Der CASY Cell Counter + Analyser System Model TT wurde für die Zellzahlmessung verwendet. Das Prinzip der Zellzahlbestimmung besteht in der Änderung des elektrischen Widerstands. Intakte Zellen unterscheiden sich im elektrischen Widerstand von toten Zellen oder von Zelltrümmern (68).

Die CAP-Behandlung des Epidermismodells epiCS[®] erfolgte nach einer 24-stündigen Inkubation ab Eintreffen der Proben. Somit konnten die Zellen sich nach dem Transport und Vorbereitung erholen. Kurz vor der Behandlung wurde das alte Medium abgesaugt und 1ml neues Medium in die 6-Well-Platten zugegeben. Die gesamte Behandlung erfolgte unter der sterilen Bank. Zuerst wurde das Plasmagerät kINPen MED vorbereitet und mit der Gas-Quelle (Argon) angeschlossen. Der Glasfluss wurde für alle Behandlungen konstant bei 4l/min eingestellt. Der Plasmastift wurde sterilisiert und in die Behandlungsbank eingebracht. Die Behandlung erfolgte manuell. Dabei wurde auf eine gleichmäßige CAP-Exposition der ganzen Oberfläche des Epidermismodells durch eine standardisierte, kreisförmige und gleichmäßige Bewegung geachtet. Der Abstand zwischen der Oberfläche des Epidermismodells und dem Plasmastift wurde während der gesamten Behandlungszeit möglichst bei 0,5cm konstant gehalten. Die CAP-Behandlungszeit betrug je nach Versuch 30s, 60s oder 120s. Die Kontroll-Proben erhielten jeweils die gleichen Behandlungszeiten mit dem Trägergas Argon. Nach der Behandlung wurden die Epidermis-Proben bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Fixierung, Paraffineinbettung und somit die Vorbereitung für die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte je nach Versuchsreihe nach 1h, 4h, 8h, und 24h Inkubationszeit.

4.4 Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Epidermismodells epiCS[®]

Zur Herstellung von dünnen Epidermis-Schnitten wurden die epiCS[®]-Proben nach der CAP-Behandlung und nach entsprechender Inkubationszeit (1h, 4h, 8h, oder 24h) über Nacht in neutral gepuffertem 4%igem Formaldehyd fixiert. Danach wurden die Proben 3 mal 5 min in PBS / 0,1% Glycin gewaschen, mit Alkohol dehydratisiert und gemäß Routineverfahren in Paraffin eingebettet. Die in Paraffin eingebetteten epiCS[®]-Proben

wurden zur Herstellung von fluoreszenzmikroskopischen Bildern zum Institut für Radiobiologie der Bundeswehr (Sanitätsakademie der Bundeswehr, München) geschickt. Die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde freundlicherweise von Prof. Harry Scherthan durchgeführt. Zum Nachweis γ -H2AX und Caspase-3 positiver Zellen im Epidermismodell epiCS[®] wurden die Gewebeproben immungefärbt. Die Methode ist ausführlich in (69, 70) beschreiben. In Kürze: Die Paraffin-Epidermisgewebeschnitte (8 mm) wurden auf supergefrorenen Objektträgern montiert und über Nacht bei 37°C getrocknet. Die Schnitte wurden in Xylol entwachst und in einer abgestuften Reihe von Alkoholen hydratisiert. Die Objektträger wurden 40 min in 0,01M Natriumcitrat (pH 5) bei 95° C gehalten und in PBTG-Puffer blockiert. Die Objektträger wurden 1 Stunde bei 37°C in PBTG-Puffer mit den Primärantikörpern inkubiert, gefolgt von 3 mal 5-minütigem Waschen in PBS und 35-minütiger Inkubation mit den Sekundärantikörpern. Nach Inkubation mit den sekundären Antikörpern wurden die Schnitte in PBS bei 37°C gewaschen (3 mal 5 min). Die Objektträger wurden mit 18ul VectaShield[®] Antifade Mounting Medium (Vector Labs, California) geliefert, das DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindol) als DNA / Kern-Gegenfärbung enthielt und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Präparationen wurden unter Verwendung eines motorisierten Zeiss Axioplan 2-Fluoreszenzmikroskops analysiert, das mit dem Isis-Fluoreszenzbildgebungssystem (MetaSystems, Altlusheim) ausgestattet war. Digitale Bilder mehrerer optischer Ebenen der Proben wurden aufgezeichnet und zu maximalen Projektionsbildern kombiniert, die manuell auf das Vorhandensein von Kernsignalen oder auf das Vorhandensein von γ -H2AX und Caspase-3 positiven Zellen analysiert wurden.

4.5 Statistische Analyse

Die Berechnung der statistischen Parameter (Mittelwerte, Standardabweichungen, Signifikanzen per t-Test) erfolgte mittels GraphPad Prism V 8.0, ebenso die Erstellung der Diagramme. Für die Auswertung wurden, wenn möglich, mindestens drei unabhängige Durchgänge pro Versuch berücksichtigt. Der statistischen Auswertung diente der studentische T- Test, wobei die Signifikanzen wie folgt festgelegt wurden: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***). Die abgebildeten Darstellungen sind repräsentativ.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchung der antiproliferativen Wirkung vom CAP auf zwei Zellarten im Zellkulturmodell

In den letzten Jahren stieg das Interesse an kaltem Atmosphärendruckplasma (CAP) für die Behandlung von bösartigen Tumoren rasant an. Die antiproliferative Wirkung vom CAP auf Tumorzellen wird ausgiebig in verschiedenen Arbeiten untersucht. Durch die Vielzahl von biologisch aktiven Substanzen, die im CAP enthalten sind, hat das CAP unter anderem eine antiproliferative Wirkung auf verschiedene Krebsarten. Besonders untersucht ist die Wirkung des CAPs auf Krebszellen in Zellkulturen.

Um die antiproliferative Wirkung des CAPs auf die Zellen darzustellen, wurden zwei Zelllinien (HaCaT, B16) mit dem Plasmagerät kINPen MED behandelt und durch Wachstumskinetiken dargestellt. Die HaCaT-Zellen sind primäre humane Keratinozyten. Bei den B16-Zellen handelt es sich um Maus-Melanomzellen, die in der Forschung als Hautkrebsmodell verwendet werden.

Für die Untersuchungen wurden die HaCaT und B16 Zellen mit CAP und Argon behandelt. Das Argon dient hierbei als Behandlungskontrolle. Je Zelllinie wurden drei verschiedene Behandlungszeiten (5, 10 und 30 Sekunden) ausgewählt. Die Analyse der Zellzahl mittels CASY® Model TT System erfolgte erstmals nach 4h danach alle 24h.

5.1.1 Wirkung vom CAP auf der HaCaT-Zelllinie

Für die Behandlung der HaCaT-Zellen wurden 10000 Zellen/Well im 24-Well Maßstab eingesetzt. Abbildung 6 zeigt die Wachstumskinetik der HaCaT-Zelllinie nach der Argon- und CAP-Behandlung. Es wurde festgestellt, dass es in der HaCaT-Zelllinie ein signifikanter Unterschied zwischen der CAP-Behandlung und der Argon-Behandlung gibt. Im Vergleich zur Argon-Behandlung nimmt mit zunehmender Behandlungszeit die Zellzahl nach der CAP-Behandlung ab. Somit hat CAP eine antiproliferative Wirkung auf die HaCaT-Zelllinie.

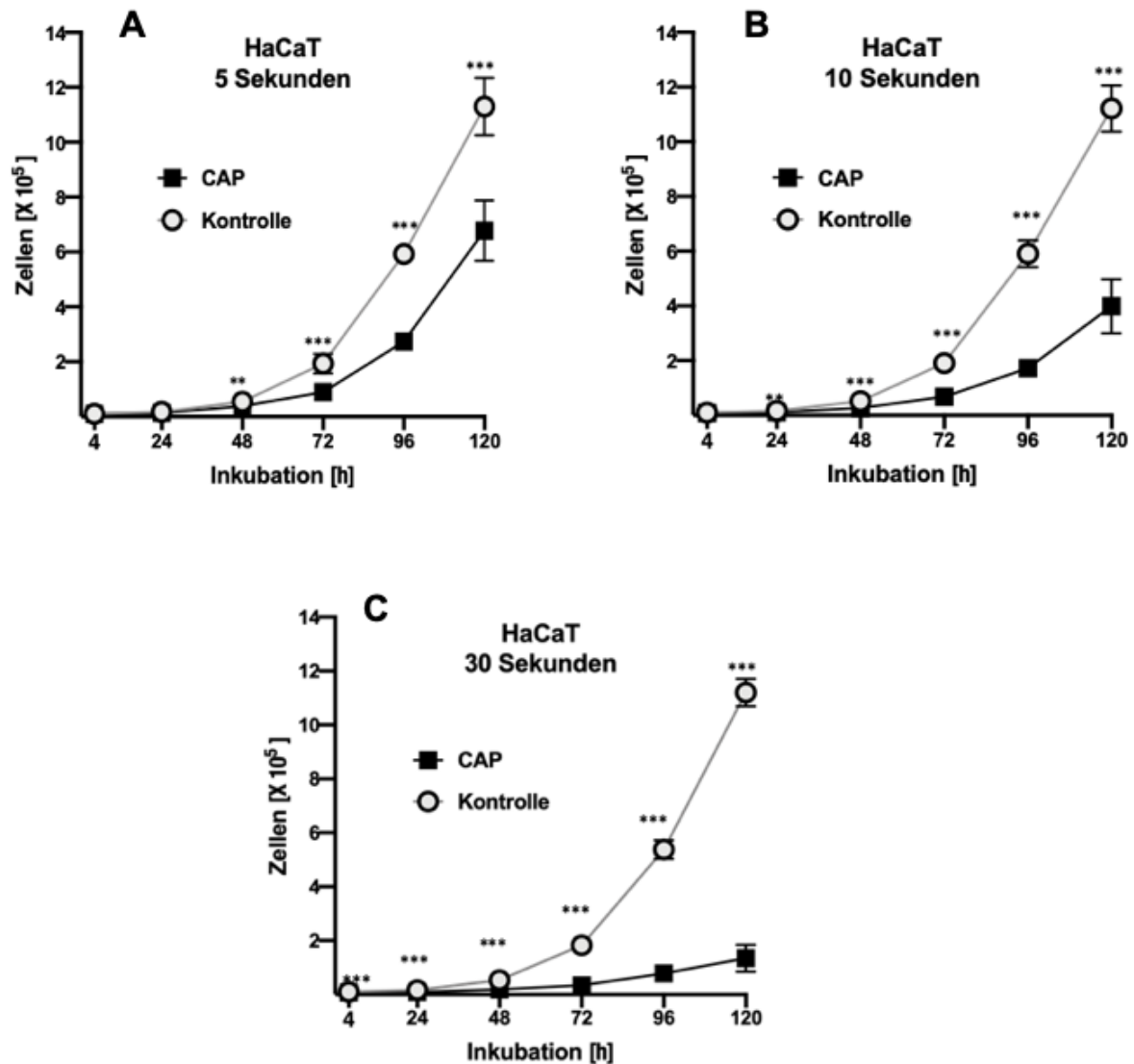


Abbildung 6: Einfluss vom CAP auf die HaCaT-Zelllinie

Die CAP- beziehungsweise Argon-Behandlung wurde mit dem Plasmagerät kINPen MED durchgeführt. Für die Behandlung wurden drei unterschiedliche Behandlungszeiten (A) 5 Sekunden, (B) 10 Sekunden, (C) 30 Sekunden festgelegt. Die Zellzahl wurde jeweils nach 4h, 24h, 48h, 72h, 96h, und 120h. Der CASY Cell Counter + Analyser System Model TT wurde für die Zellzahlmessung verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Student's T-tests (*= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$).

Die Diagramme in Abbildung 6 zeigen die antiproliferative Wirkung der CAP-Behandlung auf die HaCaT-Zelllinie. Die antiproliferative Wirkung trat schon nach 5 Sekunden CAP-Behandlung auf, und nahm mit zunehmender Behandlungszeit zu. Den Diagrammen A-C kann man entnehmen, dass die Zellzahl nach Argon-

Behandlung Werte von größer als 10^6 nach 120h Inkubation erreichte. Im Gegensatz dazu erreichte die Zellzahl nach der CAP-Behandlung abhängig von der Behandlungszeit Werte von maximal 6×10^5 nach 5 Sekunden CAP-Behandlung, und nur noch 1.3×10^5 nach 30 Sekunden CAP-Behandlung. Erwähnenswert ist, dass sich kein signifikanter Unterschied in der Zellzahl zwischen Argon- und CAP-Behandlung nach 4h Inkubation bei 5 und 10 Sekunden CAP-Behandlung zeigte. Bei 30 Sekunden CAP-Behandlung zeigte sich jedoch schon nach 4h Inkubation eine signifikante Hemmung des Zellwachstums. Das Diagramm 1C zeigt, wie stark die antiproliferative Wirkung bei 30 Sekunden CAP-Behandlung ist.

5.1.2 Wirkung vom CAP auf der B16-Zelllinie

Für die Untersuchungen mit B16 Zellen wurden zur CAP Behandlung je 5000 Zellen/Well eingesetzt. In Abbildung 7 ist die Wachstumskinetik der B16-Zelllinie nach 5 Sekunden, 10 Sekunden, und 30 Sekunden CAP- beziehungsweise Argon-Behandlung dargestellt. Die CAP Behandlung hat bei dieser Zelllinie im Vergleich zur HaCaT-Zelllinie einen etwas stärkeren antiproliferativen Effekt gezeigt. Jedoch auch bei B16-Zellen war dieser abhängig von der Behandlungszeit.

Bei allen Behandlungszeiten (5s, 10s, 30s) wurde eine kleinere Zunahme der Zellzahl bei den CAP behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt. Die größte antiproliferative Wirkung der CAP-Behandlung auf diese Zelllinie wurde bei der Behandlungszeit von 30 Sekunden beobachtet (Abb. 7C). Bei 30 Sekunden CAP-Behandlung wurde einen signifikanten Unterschied in der Wachstumskinetik zwischen Argon- und CAP-behandelten Zellen in fünf analysierten Zeitpunkten beobachtet. Lediglich nach 4h Inkubation war keine Signifikanz nachweisbar. Die antiproliferative Wirkung auf die B16-Zellen war so stark, dass es kaum Wachstum bis 72h nach der CAP-Behandlung beobachtet wurde. In Abbildung 7C sieht man wie die Wachstumskurve für CAP kaum steigt.

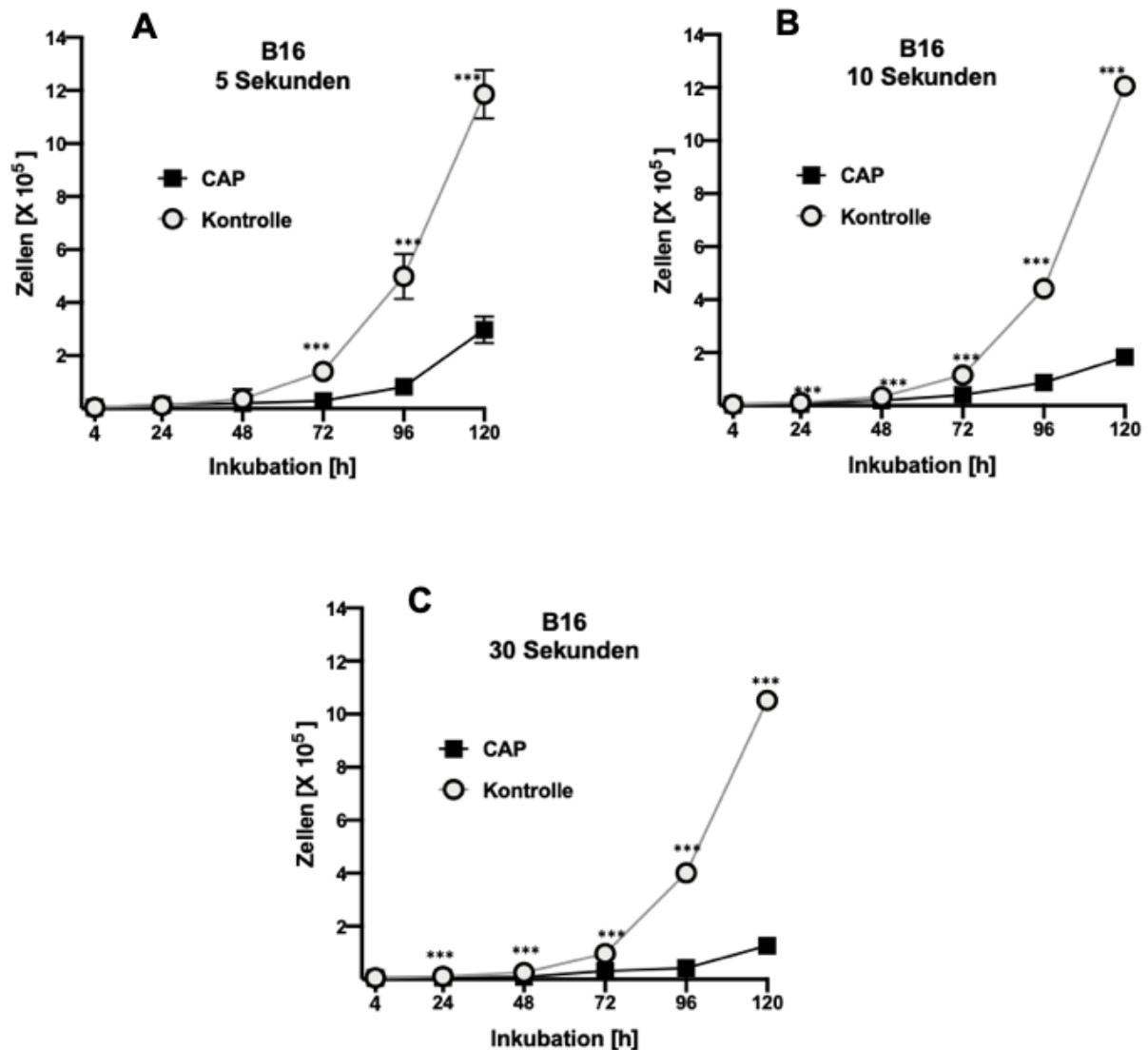


Abbildung 7 : Einfluss vom CAP auf die B16-Zelllinie

Die CAP- beziehungsweise Argon-Behandlung wurde mit dem Plasmagerät KINPen MED durchgeführt. Für die Behandlung wurden drei unterschiedliche Behandlungszeiten (A) 5 Sekunden, (B) 10 Sekunden, (C) 30 Sekunden festgelegt. Die Zellzahl wurde jeweils nach 4h, 24h, 48h, 72h, 96h, und 120h. Der CASY Cell Counter + Analyser System Model TT wurde für die Zellzahlmessung verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Student's T-tests (*= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$).

5.2 Untersuchung der CAP-Wirkung auf das Epidermismodell epiCS®

Nachdem die Wirkung vom CAP auf zwei verschiedenen Zelllinien im Zellkulturmodell untersucht wurde, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit die Wirkung vom CAP auf ein zusammenhängendes Gewebesystem untersucht. Um ein näheres Modell zur menschlichen Hautgewebe zu nutzen, wurde mit einem dreidimensionalen Epidermismodell, dem epiCS® (CELL SYSTEMS®) gearbeitet. Das epiCS® ist ein künstlich hergestelltes Epidermismodell, das aus normalen primären epidermalen Keratinozyten des Menschen rekonstruiert wurde. Die Zellen des epiCS® zeigen Wachstum und Regeneration aus dem Stratum basale (Basalzellschicht) der Epidermis (Abb. 8).

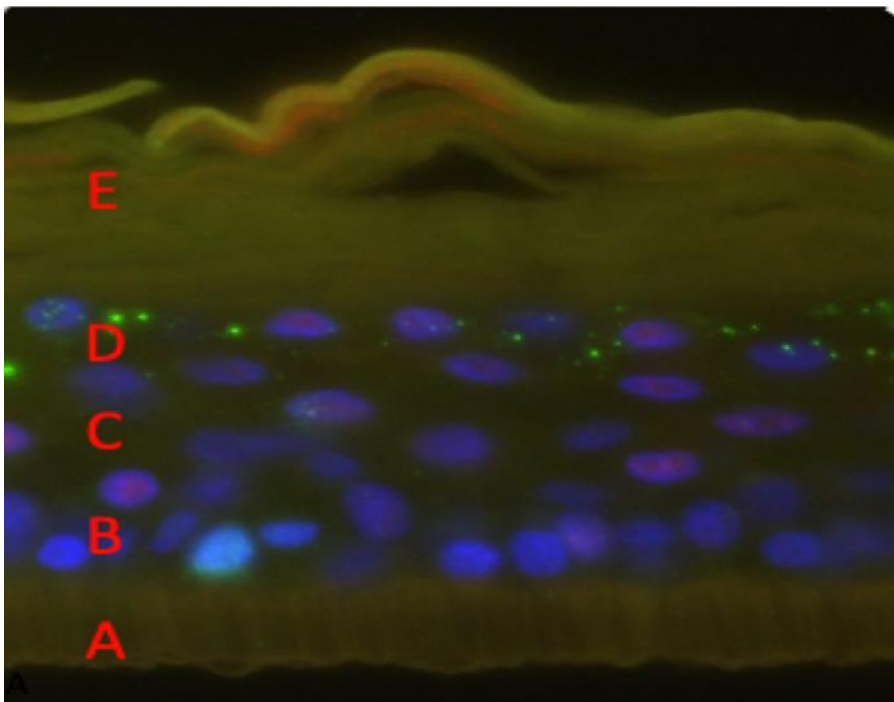


Abbildung 8: Mikroskopische Aufnahme des Epidermismodells

Die dreidimensionalen epiCS® der menschlichen Epidermis stammen aus normalen primären epidermalen Keratinozyten des Menschen. Hier kann man erkennen, dass dieses Epidermismodell die Zellschichten ausbildet und somit der normalen menschlichen Epidermis sehr ähnlich ist. (A) Stützmembran, (B) Stratum basale, (C) Stratum spongiosum, (D) Stratum granulosum, (E) Stratum corneum. Blau: Zellkern Rot: Caspase 3positive Zellen. Grün: γ -HA2X positive Zellen.

Bei dieser Versuchsreihe wurde das epiCS[®] mit CAP und Argon behandelt. Mithilfe dieses dreidimensionalen Epidermismodells konnten wir die Wirkung vom CAP auf die Zellen in einem zusammenhängenden Gewebesystem untersuchen.

Abbildung 9 zeigt histologische Aufnahmen von Gewebeproben des Epidermismodells, die nach der Behandlung mit CAP oder Argon Anhand von Immunfluoreszenz dargestellt wurden. Die Zellkerne wurden mit DAPI markiert und damit sichtbar gemacht.

Man kann deutlich erkennen, dass dieses Epidermismodell aus verschiedenen Zellschichten besteht. So sieht man basal die Zellen des Stratum basale auf einer Biomembran liegend. Dann kommen die verschiedenen Epidermis-Zellschichten bis einschließlich des Stratum corneum. Die Zahl der Schichten und die zunehmende Dicke der Gewebeprobe lassen ein Wachstum und damit die Proliferation der basalen Zellen herleiten.

Abbildung 9 zeigt 8 verschiedene Abschnitte aus Gewebeproben, die mit Argon oder CAP behandelt und nach 1h, 4h, 8h und 24h Inkubation fixiert wurden. Die Analysen zeigten, dass sowohl nach Argon als auch nach CAP-Behandlung Zellwachstum stattgefunden hat. In Abb. 9A wurde die Gewebeprobe 1h nach der Argon-Behandlung fixiert. Hier sieht man nur 3 bis 4 Zellschichten. Deutlich mehr Zellschichten, circa 14 bis 15, sind in Abb. 9G zu sehen. Diese Gewebeprobe wurde nach der Argon-Behandlung für 24h inkubiert und dann fixiert. Auch die Gewebeproben, die mit CAP behandelt wurden, zeigten diese Wachstumstendenz. So sieht man in Abbildung 9 die kontinuierliche Zunahme der Zellschichten in den Aufnahmen 9B, 9D, 9F und 9H.

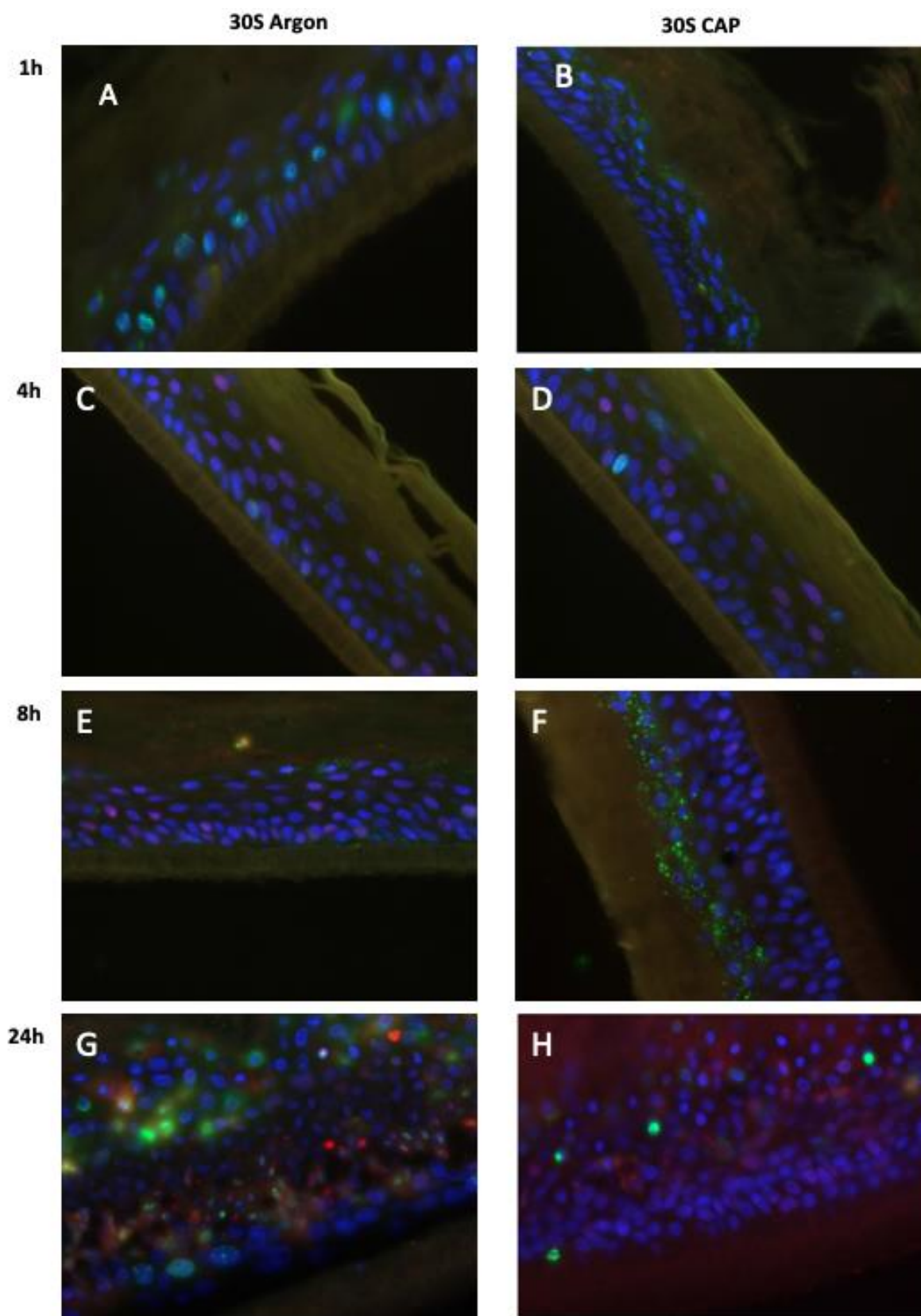


Abbildung 9 : Mikroskopische Aufnahmen des Epidermismodells nach verschiedenen Inkubationszeiten.

Durch die Zunahme der Zellschichten analog zur Inkubationszeit kann man das Wachstum und die Proliferation der Zellen herleiten.

5.3 Einfluss vom CAP auf den Anteil an γ -H2AX-Positiven Zellen im Epidermismodell epiCS®

Abbildung 10 zeigt den Anteil der γ -H2AX-positiven Zellen nach drei verschiedenen Behandlungszeiten (30s, 60s, 120s). Die mit Argon oder CAP behandelten Proben wurden nach vier unterschiedlichen Inkubationszeiten (1h, 4h, 8h, 24h) fixiert und für die mikroskopischen Analysen präpariert. Die γ -H2AX-Positiven Zellen wurden mittels fluoreszierenden Farbstoffes markiert und quantifiziert.

Die CAP-Behandlung verursachte im Vergleich zur Argon-Behandlung nahezu keinen detektierbaren Unterschied am Anteil von γ -H2AX-Positiven Zellen. Lediglich nach 60s Behandlung und 24h Inkubation war ein signifikanter Unterschied zwischen der CAP-Behandlung und der Kontrolle zu sehen.

Aus Abbildung 10 kann man entnehmen, dass sowohl bei Argon-Behandlung als auch bei CAP-Behandlung γ -H2AX-Positiven Zellen zu finden waren. Der Unterschied zwischen dem Anteil an γ -H2AX-Positiven Zellen nach CAP-Behandlung und nach Argon-Behandlung zeigte allerdings keine Dosisabhängigkeit. Zum Beispiel wurde bei 24h Inkubation der größte Anteil an γ -H2AX-positiven Zellen unabhängig von der Behandlungszeit festgestellt. Der Anteil an γ -H2AX-Positiven Zellen nach 30s (16,5%) CAP-Behandlung war fast gleich mit dem Anteil der γ -H2AX-Positiven Zellen nach 60s (16%) oder 120s (17,7%) CAP-Behandlung.

Bei 4h Inkubationszeit wurden nach der CAP-Behandlung bei allen 3 Behandlungszeiten (30s, 60s und 120s) circa 8% γ -H2AX-Positiven Zellen festgestellt. Bei 4h Inkubationszeit wurden tendenziell mehr γ -H2AX-Positive Zellen nach der CAP-Behandlung als nach der Argon-Behandlung beobachtet. Dies war allerdings bei keiner Behandlungszeit signifikant und auch nicht dosisabhängig.

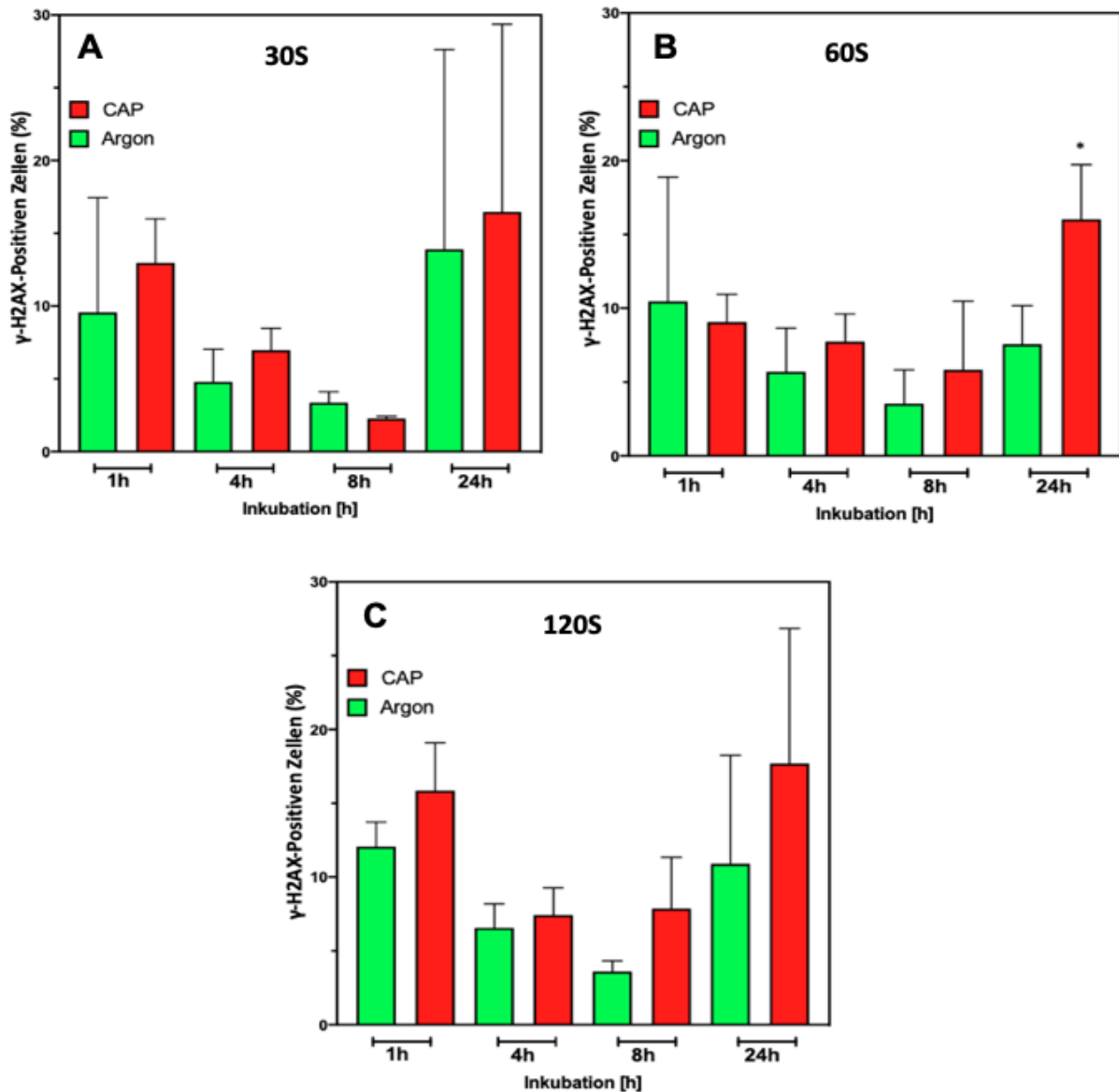


Abbildung 10: Einfluss vom CAP auf den Anteil an γ -HA2X-Positiven Zellen

Die CAP- und Argon-Behandlung wurde mit dem Plasmagerät kINPen MED durchgeführt. Für die Behandlung wurden drei unterschiedliche Behandlungszeiten (A) 30 Sekunden, (B) 60 Sekunden, (C) 120 Sekunden festgelegt. Die γ -H2AX-Positiven Zellen wurden mittels fluoreszierenden Farbstoffes markiert. Aus den mikroskopischen Bildern wurde der Prozentuelle Anteil an γ -H2AX-Positiven Zellen ausgerechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Student's T-tests (*= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$)

In Abbildung 10A fällt auf, dass es durch 30s Argon-Behandlung mehr γ -H2AX-Positiven Zellen (ca. 3,4%) als 30s CAP-Behandlung (ca.2,3%) festgestellt wurde. Es zeigte sich ebenfalls, dass bei 30s CAP-Behandlung und 1h Inkubation mehr als 10% γ -H2AX-Positiven Zellen vorhanden waren. Nach 8h Inkubation und gleicher Behandlungszeit waren jedoch nur noch weniger als 5% γ -H2AX-Positiven Zellen feststellbar. Eine ähnliche Tendenz der Abnahme γ -H2AX-Positiver Zellen nach 8h Inkubation war auch bei 60s und 120s Behandlungszeit zu detektieren.

Interessanterweise war die Veränderung des Anteils an γ -H2AX-Positiven Zellen mehr von der Inkubationszeit abhängig als von der Behandlung oder der Behandlungszeit. Bei beiden Behandlungsarten (Argon oder CAP) und bei allen Behandlungszeiten (30s, 60s, 120s) war nach 1h Inkubation mehr als 10 Prozent γ -H2AX-Positiven Zellen zu finden (Durchschnitt 10% bei Argon, 12% bei CAP). Dieser Anteil an γ -H2AX-Positiven Zellen zeigte Werte von weniger als 10% nach 4h beziehungsweise 8h Inkubation. Nach 24h Inkubation stieg der Anteil an γ -H2AX-Positiven Zellen auf Werte von mehr als 15% sowohl bei Argon als auch CAP-Behandlung.

5.4 Einfluss vom CAP auf den Anteil an Caspase-3 positiven Zellen im Epidermismodell epiCS®

Einer der wichtigsten Mechanismen in der frühen Phase der Apoptose ist die Aktivierung von Caspasen (Cysteinproteasen). Der Nachweis von aktiver Caspase-3 in Zellen und Geweben ist daher eine wichtige Methode für den Nachweis von Apoptose. Zur Detektion Caspase-3 positiver Zellen im Epidermismodell epiCS® wurden die Proben nach der CAP- beziehungsweise Argon-Behandlung und Inkubation mit spezifischen fluoreszierenden Farbstoffen gefärbt.

Zur Detektion Caspase-3 positiver Zellen wurde Das Epidermismodell epiCS® jeweils für 30s, 60s, 120s mit Argon bzw. CAP behandelt, fixiert und für die mikroskopische Auswertung nach 1h, 4h, 8h oder 24h Inkubationszeit präpariert.

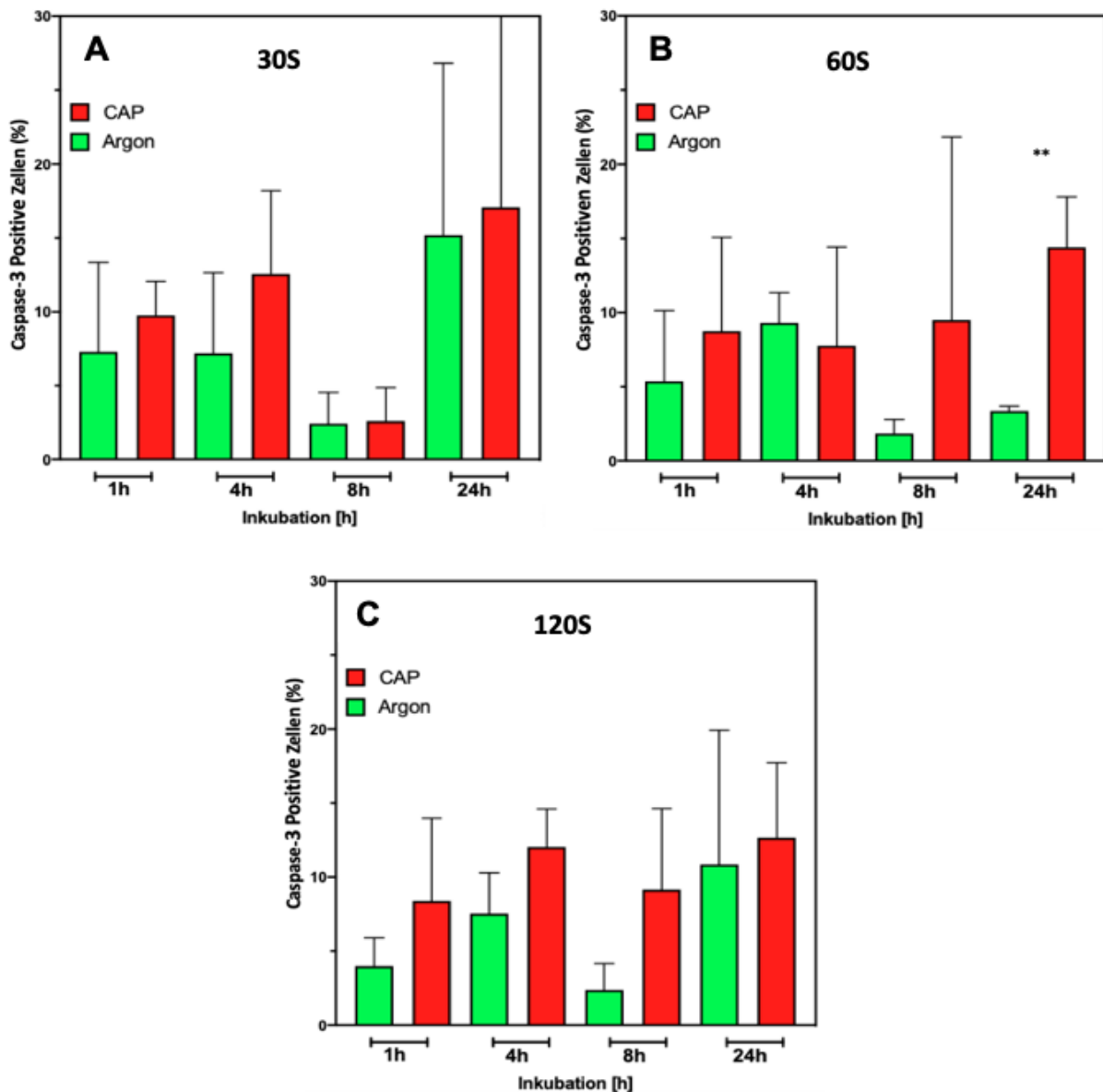


Abbildung 11: Einfluss vom CAP auf den Anteil an Caspase-3 positiven Zellen

Die CAP- und Argon-Behandlung wurde mit dem Plasmagerät kINPen MED durchgeführt. Für die Behandlung wurden drei unterschiedliche Behandlungszeiten (A) 30 Sekunden, (B) 60 Sekunden, (C) 120 Sekunden festgelegt. Die Caspase-3 positiven Zellen wurden mittels fluoreszierenden Farbstoffes markiert. Aus den mikroskopischen Bildern wurde der Prozentuelle Anteil an Caspase-3 positiven Zellen ausgerechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Student's T-tests (*= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$)

Die Behandlung mit 30s CAP zeigte bei den Inkubationszeiten 1h, 4h und 24h einen Anteil von Caspase-3 positiven Zellen von mehr als 10%. Im Gegensatz dazu führte die gleiche Behandlung bei 8h Inkubationszeit nur zu 2,5% Caspase-3 Positiven Zellen. Der größte Anteil an Caspase-3 positiven Zellen konnte man nach 24h Inkubation beobachten. Hierbei führte sowohl die CAP-Behandlung als auch die Argon-Behandlung zu mehr als 15% Caspase-3 positiven Zellen. (Abb. 11A)

Bei der Behandlungsdauer von 30s konnte man eine Tendenz zu mehr Caspase-3 positiven Zellen nach der CAP Behandlung erkennen. Einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der CAP-Behandlung und der Argon Kontrolle wurde bei der 30s Behandlungszeit nicht beobachtet. Interessanterweise verursachte die 30s Argon-Behandlung bei 24h Inkubationszeit mehr Caspase-3 positiven Zellen als die 30s CAP-Behandlung bei 8h, 4h oder 1h Inkubationszeit.

Im Vergleich zur 60s Argon-Behandlung führte die 60s CAP-Behandlung bei 1h, 8h und 24h Inkubationszeit zu einem größeren Anteil an Caspase-3 positiven Zellen (Abb. 11B). Der Unterschied zwischen dem Anteil an Caspase-3 positiven Zellen nach der CAP-Behandlung und dem der Argon-Kontrolle war bei 24h Inkubationszeit am größten. Hier wurde ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt ($P=0.0050$).

Es fiel auf, dass bei 60s Behandlungszeit und 4h Inkubationszeit mehr Caspase-3 positive Zellen durch die Argon Behandlung als durch die CAP Behandlung entstanden sind.

Die Behandlung mit 120s zeigte Ergebnisse mit etwas deutlicher Tendenz zu mehr Caspase-3 positiven Zellen nach der CAP-Behandlung. Bei 120s und 1h Inkubationszeit zeigte die CAP-Behandlung einen Anteil von 8.4 % wobei nur 4% Caspase-3 positive Zellen durch die Argon-Behandlung entstanden sind. Dieser Unterschied ist wegen der großen Standardabweichung statistisch nicht signifikant. Weiterhin zeigte die 120s CAP-Behandlung bei 8h Inkubationszeit 9.2% Caspase-3 positive Zellen, wohingegen die Argon-Behandlung einen Anteil von 2.4% Caspase-3 positive Zellen zeigte (Abb. 11C).

Es fiel auf, dass bei 120s CAP-Behandlung und 24h Inkubationszeit weniger Caspase-3 positive Zellen nachweisbar waren (12.7%), als bei 30s Argon-Behandlung nach gleicher Inkubationszeit (15.2%) (siehe Abb. 8 A und C).

Auffällig war auch, dass bei 30s CAP-Behandlung und 4h Inkubationszeit fast der gleiche Prozentanteil (12%) an Caspase-3 positiven Zellen wie bei der 120s CAP-Behandlung nach 4h Inkubationszeit zu detektieren waren (siehe Abb. 11 A und C).

6 Diskussion

Das physikalische Plasma hat in den letzten Jahren an Bedeutung in der Medizin zugenommen. Aus diesem Grund wird die Plasmamedizin als eigenständiger medizinischer Forschungsbereich definiert. Die Nutzung physikalischer Plasmen für medizinische Anwendungen nimmt rasant zu. Es gibt mehrere biomedizinische Anwendungsfelder für physikalisches Plasma, sodass diese in drei große Felder: Oberflächenmodifikation, therapeutische Anwendung und biologische Dekontamination unterteilt werden. (6)

Besonders für therapeutische Anwendungen wird das CAP eingesetzt. Das CAP kommt bereits in verschiedenen Bereichen der Medizin zum Einsatz. (14, 71, 72) Es gibt verschiedene Plasmageräte und Plasmaquellen, die für verschiedene medizinische und therapeutische Zwecke eingesetzt werden. (73) Die Grundlagenforschung ist eine fundamentale Voraussetzung jeder neuen Therapie in der Medizin. Diese Arbeit liefert Grundlagenkenntnisse bezüglich der Wirkung und Nebenwirkung von CAP auf die Hautzellen.

In Zellkulturen konnten wir zeigen, dass der Einsatz von CAP eine stärkere antiproliferative Wirkung auf die murine Tumorzelllinie B16 hat als auf die menschliche epidermale Keratinozytenzelllinie HaCaT. Im 3D-Epidermismodell epiCS[®] konnten wir zeigen, dass die Anwendung von CAP bis zwei Minuten auf der Epidermis nicht zu mehr γ -HA2X-positiven Zellen im Vergleich zur Argon-Kontrolle geführt hat. Hieraus kann man schlussfolgern, dass der CAP-Einsatz auf der Epidermis nicht zu DNA-DSB führt.

Darüber hinaus führte die CAP-Behandlung nicht zu vermehrtem Auftritt vom Apoptose-Marker Caspase 3 in den Epidermis Zellen. Im Vergleich zur Argon-Kontrolle waren die Caspase 3-positiven Zellen nicht signifikant erhöht nach der CAP-Behandlung. Man kann schlussfolgern, dass der CAP-Einsatz bis zwei Minuten auf der Epidermis nicht zum apoptotischen Zelluntergang führt.

In den letzten Jahren wurde vermehrt in der Plasmaonkologie geforscht. Die antiproliferative Wirkung des CAP wurde in vielen Arbeiten untersucht und nachgewiesen. Die Forschung konzentriert sich hauptsächlich auf die Beschreibung der Antikrebswirkung der CAP-Behandlung auf verschiedene Krebszelllinien und

Tumoren in Tiermodellen. (74) Mittlerweile gibt es klinische Studien, welche das CAP zur Behandlung oberflächlicher Tumoren verwenden. Eine Arbeitsgruppe behandelte Patienten mit Tumoren des Kopfhalsbereichs mit dem Plasmagerät kINPen MED. Diese klinische Studie zeigte eine sichtbare Reduktion der Tumormasse, welche auf die antiproliferative Wirkung des CAP zurückzuführen ist. (75)

Die verschiedenen Effekte von CAP werden durch Auslösung biochemischer Mechanismen auf zellulärer Ebene hervorgerufen. Die antiproliferative Wirkung beruht unter anderem auf der Freisetzung von reaktivem Sauerstoff und Stickstoff Spezies RONS. (23, 40, 76) Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass das CAP eine antiproliferative Wirkung besonders auf die Krebszellen hat. Bis heute ist die Wirksamkeit der CAP-Behandlung auf eine signifikante Antikrebskapazität auf über 20 Krebsarten in vitro nachgewiesen. (74) Studien legen nahe, dass Krebszellen empfindlicher auf die RONS nach der CAP-Behandlung reagieren als normale Zellen, was auf eine selektive Abnahme der Lebensfähigkeit von Krebszellen und weniger zytotoxischer Wirkung auf nicht maligne Zellen schließen lässt. (23, 26, 76)

In dieser Arbeit wurde die antiproliferative Wirkung vom CAP auf zwei Zelllinien (HaCaT und B16) untersucht. Die Ergebnisse sind deckungsgleich mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen, die dem CAP eine stärkere antiproliferative Wirkung auf Tumorzellen als auf die normalen gesunden Gewebszellen zuschreiben. Man kann aus der Wachstumskinetik von HaCaT-Zellen (s. Abbildung 6) und B16-Zellen (s. Abbildung 7) eine stärkere antiproliferative Wirkung der CAP-Behandlung auf die B16-Zellen als auf die HaCaT-Zellen ableiten. Gesteigerte intrazelluläre RONS-Konzentrationen können zur Induktion der Apoptose führen. Dieser Mechanismus erscheint stärker ausgeprägt in den Tumorzellen. Denn Tumorzellen sind vulnerabler gegenüber oxidativem Stress der RONS. (40, 77) Dies könnte die stärkere antiproliferative Wirkung der CAP-Behandlung auf die B16-Zellen erklären.

Die Wirkung von CAP variiert bei Veränderungen verschiedener Parameter wie z.B. Abstand zu den Zellen, Trägergas, Medium der Zellkultur und Expositionszeit. Entscheidend für die antiproliferative Wirkung von CAP ist die Behandlungsdauer. (14, 16, 68) In Arbeiten mit verschiedenen Zellarten wurde eine zunehmende Wirkung von CAP mit zunehmender Behandlungszeit beschrieben. (68, 78) In unseren Untersuchungen wurden alle variablen Parameter konstant gehalten. Die Behandlungszeit wurde variiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die antiproliferative

Wirkung von CAP von der Behandlungszeit abhängig ist und mit steigender Behandlungszeit zunimmt. Die zeitabhängige antiproliferative Wirkung der CAP-Behandlung wurde durch die Wachstumskinetik der jeweiligen Zelllinie dargestellt. Zum Beispiel führte die 30s CAP-Behandlung zu einer stärkeren antiproliferativen Wirkung als die 10s CAP-Behandlung.

Zur Untersuchung zelltoxischer Nebenwirkungen der CAP-Behandlung auf die Haut wurden die Caspase 3 und γ -HA2X nach der CAP-Behandlung des 3D-Epidermismodells bestimmt. Somit konnten wir die Wirkung der CAP-Behandlung nicht nur auf Zellkulturebene, sondern auch auf einem komplexen und zusammenhängenden System, dem 3D-Epidermismodell epiCS[®] untersuchen.

Das Epidermismodell epiCS[®] ist äquivalent der menschlichen Epidermis und wird aus primären epidermalen Keratinozyten des Menschen rekonstruiert. Die Zellstruktur von epiCS[®] ähnelt stark einer natürlichen menschlichen Epidermis und zeigt eine ausgezeichnete In-vitro / In-vivo-Vergleichbarkeit. (67)

Die mikroskopische Analyse nach der DABI-Färbung zeigt die verschiedenen Zellschichten der Epidermis (s. Abbildung 8). Nach Argon und CAP-Behandlung zeigten die Zellen Wachstum und Stoffwechsel (s. Abbildung 9). Alle Proben nach 30s, 60s und 120s CAP-Behandlung zeigten keine Veränderung in Integrität, Aufbau oder Irritation der Epidermiszellschichten. Auch Isbary et al. zeigten in einer Arbeit mit ex vivo Hautproben, dass die CAP-Behandlung über 300 Sekunden keine Zerstörung der Zellschichten der Epidermis verursachte. (79) Eine andere Arbeit mit humanen Hautproben zeigte auch eine gute Integrität der Epidermis nach CAP-Behandlung, es wurden keine Anzeichen von Reizung oder thermischer Schädigung nach 1, 3 oder 5 Minuten CAP-Behandlung mit dem Plasmagerät kINPen MED beobachtet. (80)

Dieses 3D-Epidermismodell kann man verwenden für CAP-Experimente auf Epidermis Zellen. Dabei könnte man ex vivo ähnliche Experimente durchführen ohne den Gebrauch von humanen Hautproben oder Tiermodellen. Somit kann man aufwendige Verfahren, wie Patienten Zustimmung und Ethik-Komitee umgehen. Natürlich würden solche Experimente die Notwendigkeit der klinischen Studien nicht ersetzen.

Das Epidermismodell wurde für diese Arbeit herangezogen, nicht nur weil es im Vergleich zum Zellkulturmodell ein komplexeres System mit ex vivo ähnlichen Bedingungen darstellt, sondern auch gerade weil die Plasmaquelle (kINPen MED) für

die Behandlung chronischer Wunden der Haut zugelassen ist. (30) Man kann somit die Sicherheit der Anwendung von kINPen MED auf die Epidermis untersuchen.

Arbeitsgruppen berichteten über DNA-Schäden nach CAP-Exposition von Zellen oder bei verschiedenen Krankheitserregern. (81-83) Viele der analysierten DNA-Schäden waren Doppel- oder Einzelstrangbrüche. (84) Durch die Annahme, dass die CAP-Behandlung zu gesteigerten intrazellulären RONS-Konzentrationen führt, ergibt sich die Frage, ob diese zu DNA-Schäden der gesunden Epidermis Zellen führen können. Bekannte DNA-Schäden, die durch RONS entstehen können, sind DNA-DSB. (76, 85, 86)

Könnte die CAP-Behandlung gesunder Epidermis-zellen zu DSB führen? Um diese Frage zu beantworten, wurde die Wirkung drei unterschiedlicher CAP-Behandlungszeiten (30s, 60s, 120s) auf das Epidermismodell epiCS[®] untersucht. Zur Detektion von DSB in den Zellen wurde das γ -H2AX genommen. γ -H2AX ist die phosphorylierte Form vom H2AX, welches kurz nach der Entstehung von DSB in den Zellen nachweisbar ist. (52, 56) Laut Literatur gilt γ -H2AX als biologischer Marker für DSB in der DNA. (60, 87-89)

Aus Abbildung 10 ist erkennbar, dass ein Anteil an γ -H2AX-positiven Zellen sowohl nach der CAP-Behandlung als auch nach der Argon-Behandlung nachweisbar war. Dieser Anteil an γ -H2AX-Positiven Zellen zeigte jedoch keine Abhängigkeit von der CAP-Behandlungszeit. Die CAP-Behandlung des Epidermismodells epiCS[®] führte nicht zu mehr γ -H2AX-Positiven Zellen als die Argon-Behandlung. Ähnliche Ergebnisse zeigten andere Arbeiten nach der CAP-Behandlung von Hautbiopsien. Dabei waren bis zu 40% der unbehandelten Zellen γ -H2AX positiv. Sowohl CAP behandelte Zellen als auch unbehandelte Zellen zeigten relativ hohe γ -H2AX -positive Zellen. (80)

Die Diagramme in Abbildung 10 zeigen keine adäquate Zunahme an γ -H2AX bei Steigerung der Behandlungsdauer. Zum Beispiel konnte nach 120s CAP-Behandlung kein größerer Anteil an γ -H2AX-Positiven Zellen als nach 30s CAP-Behandlung detektiert werden. Somit kann man davon ausgehen, dass der Anteil an γ -H2AX-Positiven Zellen nicht durch das CAP entstanden ist.

Isbary et al. zeigten nach Behandlung von ex vivo Hautbiopsien keine Steigerung der γ -H2AX nach zwei Minuten CAP-Behandlung im Vergleich zu einer Minute CAP-

Behandlung. Es waren grundsätzlich hohe γ -H2AX Konzentrationen sowohl in behandelten als auch in unbehandelten Hautbiopsien vorhanden. Die Autoren vermuteten, dass dies auf das Patientenalter oder die Experimentdurchführung zurückzuführen sei. (79) Das Epidermismodell epiCS[®] ist unabhängig von Patienten Eigenschaften, infolgedessen ist davon auszugehen, dass der Nachweis von γ -H2AX eher experimentbedingt ist.

γ -H2AX entsteht bei verschiedenen Bedingungen in der Zelle und ist nicht nur bei DSB nachweisbar. (90, 91) γ -H2AX kann beispielsweise im Rahmen der Apoptose in den Zellen nachgewiesen werden. (54, 55, 92) Es wurde gezeigt, dass es im Rahmen der Apoptose in verschiedenen Zellarten zur Entstehung von γ -H2AX aufgrund der DNA Fragmentierung kommt. Dabei wurde die γ -H2AX-Bildung auf eine Caspase-kontrollierte DNA-Fragmentierung im Verlauf der Apoptose zurückgeführt. (54) In einer Arbeit mit dem Plasmagerät kINPen MED wurde gezeigt, dass der Nachweis an phosphoryliertem γ -H2AX nach der CAP-Behandlung nicht durch DNA-Schäden, sondern als Folge der Apoptose zustande gekommen ist. (92)

Die Phosphorylierung von H2AX findet auch bei normal proliferierenden Zellen statt. (93) Es wurde gezeigt, dass γ -H2AX im Zellzyklus proliferierender Zellen ohne DNA-Schäden wie DSB vorhanden war. Besonders in der M-Phase der Mitose war viel γ -H2AX nachweisbar. (93) Eine mögliche Erklärung für den detektierten Anteil an γ -H2AX-Positiven Zellen im Epidermismodell epiCS[®] wäre, dass dieser im Rahmen der Apoptose oder bei der Zellteilung entstanden ist.

An dieser Stelle ergibt sich die folgende Frage. Könnte das CAP die Apoptose in den Epidermiszellen verursacht haben, worauf die γ -H2AX im Rahmen der Apoptose bedingten DNA-Fragmentierung zustande gekommen ist?

Der Nachweis von aktivierten Caspasen stellt eine validierte Methode zur Detektion von apoptotischen Zellen dar. (94-96) Die aktivierte Caspase 3 spielt eine wichtige Rolle bei der Apoptose und wird deshalb zum Nachweis apoptotischer Zellen herangezogen. (97-99) Viele Arbeitsgruppen haben nach der CAP-Behandlung den Nachweis von aktivierter Caspase 3 als Maß für apoptotische Zellen sowohl in der Zellkultur als auch in (ex) vivo Hautbiopsien genommen. (79, 80, 92, 100) Auch bei unseren Untersuchungen wurde die Caspase 3 zum Nachweis apoptotischer Zellen herangezogen.

Nach der CAP- beziehungsweise Argon-Behandlung wurden Caspase 3-positive Zellen im Epidermismodell epiCS® detektiert. Die Ergebnisse zeigen, dass ein Anteil an Caspase-3 positiven Zellen nachweisbar war, jedoch war dieser Anteil nicht auf die CAP-Behandlung zurückzuführen. Sowohl nach der CAP-Behandlung als auch nach der Argon-Behandlung konnte ein Anteil an Caspase-3 positiven Zellen detektiert werden.

Außerdem war der Prozentanteil an Caspase-3 positiven Zellen nicht von der CAP-Behandlungszeit abhängig. Eine längere CAP-Behandlungszeit führte nicht zum Anstieg des Anteils an Caspase-3 positiven Zellen. Zum Beispiel war bei 30s CAP-Behandlung fast der gleiche Anteil an Caspase-3 positiven Zellen wie bei 120s nachweisbar. Es gab bei allen Behandlungszeiten 30s, 60s und 120s keine Korrelation zwischen dem Anteil an Caspase-3 positiven Zellen und der Behandlungszeit. Es gab auch keine signifikanten Unterschiede zwischen CAP-Behandlung und der Argon-Kontrolle bezüglich des Anteils an Caspase-3-positiven Zellen. Zum Beispiel führte die 120s CAP-Behandlung bei 24h zu gleichem Anteil an Caspase-3 positiven Zellen wie die 120s Argon-Behandlung.

Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass der Anteil an Caspase-3 positiven Zellen nicht unbedingt durch die CAP-Behandlung entstanden ist und somit kann man annehmen, dass eine CAP-Behandlung bis 120s auf der Epidermis nicht zur Apoptose geführt hat. Auch Hasse et al. konnten nach 1 und 3 min CAP-Behandlung auf gesunden ex vivo Hautbiopsien keinen größeren Teil an apoptotischen Zellen im Vergleich zu unbehandelten Hautproben detektieren. Erst nach 5 Minuten CAP-Behandlung konnten mehr apoptotischen Zellen nachgewiesen werden. (80) Eine Arbeit mit Keratinozyten in vivo und in vitro hat gezeigt, dass die CAP-Behandlung bis 2 Minuten nicht zu mehr apoptotischen Zellen im Vergleich zur Kontrolle führte. Ähnliche Ergebnisse hat die Arbeitsgruppe auch bei Fibroblasten gezeigt. (38, 101)

Schlussfolgerung und Ausblick:

Die CAP-Behandlung zwei verschiedener Zelllinien zeigte eine antiproliferative Wirkung in beiden Zelllinien in der Zellkultur, wobei diese stärker ausgeprägt in der B16 Zelllinie schien. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass die antiproliferative Wirkung des CAP auf die Zellkultur von der Behandlungszeit abhängig ist.

Die Untersuchungen zeigten auch, dass die CAP-Behandlung keine genotoxische Wirkung auf die Epidermis hat. Die CAP-Exposition bis 120s auf die Epidermis führte zu keinen genotoxischen oder apoptotischen Veränderungen und wurde von Epidermiszellen toleriert. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Übereinstimmung mit der überwiegenden Literatur, die eine sichere und risikoarme Anwendung von CAP auf die Haut zeigten. (79, 102-104) Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass es keine erhöhte genotoxische Wirkung nach 180s CAP-Exposition verschiedener Zellarten mit dem Plasmagerät kINPen® MED nachweisbar war. (105) In ex vivo behandelte menschlicher Haut induzierte das CAP des kINPen MED keine DSB, die auf Mutagene Ereignisse hinweisen kann. (106)

Im Rahmen dieser Arbeit kam es zum Nachweis von γ -HA2X und Caspase-3 in beiden Behandlungsgruppen, Argon und CAP. Dies hängt jedoch nicht mit der CAP-Exposition zusammen. Es könnte im Rahmen der Durchführung des Experiments zu mechanischem Stress in den Zellen gekommen sein, worauf die Zellen mit Apoptose reagiert haben. Die Caspase-3 könnte im Rahmen der stressbedingten Apoptose entstanden sein. Die Apoptose führte zur Fragmentierung des Erbgutmaterials DNA. Im Rahmen dieses Prozesses wurde das Histon H2AX zu γ -H2AX phosphoryliert und somit waren im Epidermismodell γ -H2AX-Positive Zellen nachweisbar.

Wir haben in dieser Arbeit die CAP-Behandlung mit der Argon-Behandlung bis 120s verglichen. Es wäre interessant zu untersuchen, ob Caspase 3 oder γ -HA2X bei CAP-Exposition über 120s oder bei unbehandelten Zellen des Epidermismodells epiCS® nachweisbar wären. Dies wäre von Bedeutung, denn das Argon ist in beiden Behandlungsvarianten als Trägergas im Plasmagerät kINPen MED vorhanden. (30)

In dieser Arbeit wurden die DSB zur Untersuchung von DNA-Schäden herangezogen. Man sollte allerdings auch andere Parameter in Hinsicht auf Genotoxizität nach CAP-Exposition untersuchen. Man sollte auch die Langzeitfolgen der CAP-Behandlung bezüglich DNA-Schäden untersuchen. Die Langzeit Wirkung könnte zum Beispiel

durch retrospektive Analysen behandelter Patienten untersucht werden. (103)
Hierdurch kann eine Optimierung der Therapie beziehungsweise Feststellung unerwünschter Spätfolgen erfolgen.

In dieser Arbeit wurde die CAP-Wirkung für die Behandlungszeit 30s, 60s und 120s untersucht. Es gibt jedoch Anwendungen von CAP auf der Haut, die über zwei Minuten gehen und in mehreren Sitzungen stattfinden. (14, 16)

7 Zusammenfassung

Kaltes Atmosphärendruckplasma (CAP) hat in der Therapie an Bedeutung gewonnen und wird zurzeit in verschiedenen Bereichen der Medizin eingesetzt. CAP hat antiproliferative, antimikrobielle und zellstimulierende Wirkungen. Eine therapeutisch vielversprechende Einsatzmöglichkeit vom CAP ist die Behandlung maligner Tumoren. Weiterhin wird CAP klinisch in der Behandlung chronischer Wundheilungsstörungen der Haut eingesetzt.

In dieser Arbeit wurde die antiproliferative Wirkung von CAP auf zwei Haut-assoziierte Zelllinien (HaCaT und B16) untersucht. Anhand der CAP-Exposition und der Analyse der Wachstumskinetiken konnten wir bestätigen, dass die antiproliferative Wirkung von CAP von der Behandlungszeit abhängt. Ferner bestätigten die Ergebnisse, dass die antiproliferative Wirkung in der malignen Zelllinie B16 stärker ausgeprägt ist.

Weiterhin wurde die genotoxische Wirkung von CAP in einem 3D-Epidermismodell, dem epiCS[®] untersucht. Das Epidermismodell wurde 30s, 60s und 120s mit CAP behandelt (Plasmagerät kINPen MED). Zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen und Apoptose wurden γ -H2AX und Caspase-3 herangezogen. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Epidermis zeigte keinen höheren Anteil an γ -H2AX oder Caspase-3 positiven Zellen durch die CAP-Exposition. Lediglich waren γ -H2AX und Caspase-3 in beiden Behandlungsgruppen (Argon/CAP) nachweisbar. Ein direkter Zusammenhang zur CAP-Behandlung bzw. zur Behandlungszeit wurde jedoch nicht nachgewiesen.

Insgesamt kann man feststellen, dass die CAP-Exposition nicht zur vermehrten Apoptose in gesunden Epidermiszellen führt. Außerdem kann die CAP-Exposition gesunder Epidermis Zellen bis 120s ohne genotoxische oder zellschädigende Wirkung erfolgen. Andere Arbeitsgruppen beschreiben eine sichere Anwendung von CAP auf die Haut sogar bis 300s. (79, 80) Somit wären genotoxische oder zellschädigende Nebenwirkungen auf gesunde Hautzellen im Rahmen der CAP-Behandlung chronischer Wundheilungsstörungen unwahrscheinlich. Dennoch erfordert der sichere Einsatz unterschiedlicher CAP-Quellen intensive Untersuchungen zur Optimierung der Wirkung. Auch Langzeitfolgen sind nicht auszuschließen. Retrospektive Analysen behandelter Patienten bieten eine Möglichkeit zur Untersuchung von Langzeitfolgen.

8 Literaturverzeichnis

1. Hamm H. Grundlagen der Dermatologie: Anatomie und Physiologie der Haut. In: Goebeler M, Hamm H, editors. Basiswissen Dermatologie. Berlin: Springer; 2017. p. 3-16.
2. Welch U. Haut. In: Welch U, editor. Welch Lehrbuch Histologie. 2 ed. München: Elsevier; 2006. p. 550-68.
3. Middeke M. Morphologie und Physiologie der Haut. In: Fießl H, Middeke M, editors. Duale Reihe Anamnese und Klinische Untersuchung. 6., aktualisierte Auflage ed: Georg Thieme Verlag; 2018.
4. Treede R-D. Das Somatosensorische System. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, editors. Physiologie des Menschen. 31 ed. Heidelberg: Springer; 2010. p. 273-97.
5. Hösl M, Berneburg M. [Vitamin D and the skin]. Hautarzt. 2008;59(9):737-42; quiz 43. Epub 2008/08/09. doi: 10.1007/s00105-008-1499-x. PubMed PMID: 18688585.
6. Von Woedtke T, Schmidt A, Bekeschus S, Wende K. Wissenschaftliche Grundlagen, Stand und Perspektiven der Plasmamedizin. In: Metelmann H-R, Von Woedtke T, Weltmann K-D, editors. Plasmamedizin Kaltplasma in der medizinischen Anwendung Stuttgart: Springer; 2016. p. 17-30.
7. Gelbrich N. Die Effekte von kaltem atmosphärischen Plasma auf humane Osteosarkom-Zellen.
8. Weiss M, Gümbel D, Hanschmann EM, Mandelkow R, Gelbrich N, Zimmermann U, et al. Cold Atmospheric Plasma Treatment Induces Anti-Proliferative Effects in Prostate Cancer Cells by Redox and Apoptotic Signaling Pathways. PLoS One. 2015;10(7):e0130350. Epub 2015/07/02. doi: 10.1371/journal.pone.0130350. PubMed PMID: 26132846; PubMed Central PMCID: PMC4488447.
9. Lendeckel D, Eymann C, Emicke P, Daeschlein G, Darm K, O'Neil S, et al. Proteomic Changes of Tissue-Tolerable Plasma Treated Airway Epithelial Cells and Their Relation to Wound Healing. Biomed Res Int. 2015;2015:506059. Epub 2015/11/06. doi: 10.1155/2015/506059. PubMed PMID: 26539504; PubMed Central PMCID: PMC4619824.

10. Gerling T, Weltmann K-D. Einführung in Atmosphärendruck-Plasmaquellen für Plasmamedizinische Anwendungen. In: Metelmann H-R, Weltmann K-D, Von Woedtke T, editors. *Plasmamedizin*. Heidelberg: Springer; 2016. p. 3-14.
11. Conrads H, Schmidt M. Plasma generation and plasma sources. *Plasma Sources Science and Technology*. 2000;9(4):441.
12. Yan D, Sherman JH, Keidar M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget*. 2017;8(9):15977-95. doi: 10.18632/oncotarget.13304. PubMed PMID: 27845910; PubMed Central PMCID: PMC5362540.
13. von Woedtke T, Reuter S, Masur K, Weltmann KD. Plasmas for medicine. *Physics Reports*. 2013;530(4):291-320. doi: <https://doi.org/10.1016/j.physrep.2013.05.005>.
14. Weltmann KD, Polak M, Masur K, von Woedtke T, Winter J, Reuter S. Plasma processes and plasma sources in medicine. *Contributions to Plasma Physics*. 2012;52(7):644-54.
15. Hoffmann C, Berganza C, Zhang J. Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. *Med Gas Res*. 2013;3(1):21. Epub 2013/10/03. doi: 10.1186/2045-9912-3-21. PubMed PMID: 24083477; PubMed Central PMCID: PMC4016545.
16. Bussiahn R, Lembke N, Gesche R, von Woedtke T, Weltmann K. Plasma sources for biomedical applications. *Hyg Med*. 2013;38:212-6.
17. Park GY, Park SJ, Choi MY, Koo IG, Byun JH, Hong JW, et al. Atmospheric-pressure plasma sources for biomedical applications. *Plasma Sources Science and Technology*. 2012;21(4):043001. doi: 10.1088/0963-0252/21/4/043001.
18. Privat-Maldonado A, Schmidt A, Lin A, Weltmann K-D, Wende K, Bogaerts A, et al. ROS from Physical Plasmas: Redox Chemistry for Biomedical Therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019;2019:9062098-. doi: 10.1155/2019/9062098. PubMed PMID: 31687089.
19. Weidinger A, Kozlov AV. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules*. 2015;5(2):472-84. Epub 2015/04/18. doi: 10.3390/biom5020472. PubMed PMID: 25884116; PubMed Central PMCID: PMC4496681.

20. Macásek J, Zeman M, Vecka M, Vávrová L, Kodydková J, Tvrzická E, et al. [Reactive oxygen and nitrogen species in the clinical medicine]. *Cas Lek Cesk.* 2011;150(8):423-32. Epub 2011/10/27. PubMed PMID: 22026076.
21. Cash TP, Pan Y, Simon MC. Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(9):1219-25. Epub 2007/09/26. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.07.001. PubMed PMID: 17893032; PubMed Central PMCID: PMC2696222.
22. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279(6):L1005-28. Epub 2000/11/15. doi: 10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005. PubMed PMID: 11076791.
23. Kim SJ, Chung TH. Cold atmospheric plasma jet-generated RONS and their selective effects on normal and carcinoma cells. *Sci Rep.* 2016;6:20332. Epub 2016/02/04. doi: 10.1038/srep20332. PubMed PMID: 26838306; PubMed Central PMCID: PMC4738260.
24. Metelmann H-R, Von Woedtke T, Weltmann K-D. *Plasmamedizin: Kaltplasma in der medizinischen Anwendung.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2016.
25. Keidar M. Plasma for cancer treatment. *Plasma Sources Science and Technology.* 2015;24(3):033001.
26. Keidar M, Walk R, Shashurin A, Srinivasan P, Sandler A, Dasgupta S, et al. Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *Br J Cancer.* 2011;105(9):1295-301. Epub 2011/10/08. doi: 10.1038/bjc.2011.386. PubMed PMID: 21979421; PubMed Central PMCID: PMC3241555.
27. Metelmann H-R. klinische Anwendungen. In: Metelmann H-R, Von Woedtke T, Weltmann K-D, editors. *Plasmamedizin: Kaltplasma in der medizinischen Anwendung.* Berlin Heidelberg: Springer; 2016. p. 51-149.
28. Schönebeck R, Wandke D. Plasmamedizingeräte auf dem deutschen Markt. In: Metelmann H-R, Von Woedtke T, Weltmann K-D, editors. *Plasmamedizin.* Berlin Heidelberg: Springer; 2016. p. 214-20.
29. Reuter S, von Woedtke T, Weltmann K-D. The kINPen—a review on physics and chemistry of the atmospheric pressure plasma jet and its applications. *Journal of Physics D: Applied Physics.* 2018;51(23):233001. doi: 10.1088/1361-6463/aab3ad.
30. Bekeschus S, Schmidt A, Weltmann K-D, von Woedtke T. The plasma jet kINPen – A powerful tool for wound healing. *Clinical Plasma Medicine.* 2016;4(1):19-28. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cpme.2016.01.001>.

-
31. Bernhardt T, Semmler ML, Schäfer M, Bekeschus S, Emmert S, Boeckmann L. Plasma Medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:3873928. Epub 2019/10/01. doi: 10.1155/2019/3873928. PubMed PMID: 31565150; PubMed Central PMCID: PMC6745145 of this paper.
32. Maisch T, Shimizu T, Li YF, Heinlin J, Karrer S, Morfill G, et al. Decolonisation of MRSA, *S. aureus* and *E. coli* by cold-atmospheric plasma using a porcine skin model in vitro. *PLoS One*. 2012;7(4):e34610. Epub 2012/05/05. doi: 10.1371/journal.pone.0034610. PubMed PMID: 22558091; PubMed Central PMCID: PMC3338731.
33. Daeschlein G. Antimikrobielle Wirksamkeit von Plasma. In: Metelmann H-R, Von Woedtke T, Weltmann K-D, editors. *Plasmamedizin: Kaltplasma in der medizinischen Anwendung*. Berlin Heidelberg: Springer; 2016. p. 52-61.
34. Napp M, Daeschlein G, von Podewils S, Hinz P, Emmert S, Haase H, et al. In vitro susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains of *Staphylococcus aureus* to two different cold atmospheric plasma sources. *Infection*. 2016;44(4):531-7. doi: 10.1007/s15010-016-0888-9.
35. Daeschlein G, von Woedtke T, Kindel E, Brandenburg R, Weltmann K-D, Jünger M. Antibacterial Activity of an Atmospheric Pressure Plasma Jet Against Relevant Wound Pathogens in vitro on a Simulated Wound Environment. *Plasma Processes and Polymers*. 2010;7(3-4):224-30. doi: <https://doi.org/10.1002/ppap.200900059>.
36. Isbary G, Morfill G, Schmidt HU, Georgi M, Ramrath K, Heinlin J, et al. A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. *British Journal of Dermatology*. 2010;163(1):78-82. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.09744.x>.
37. Daeschlein G, Napp M, Lutze S, Arnold A, von Podewils S, Guembel D, et al. Skin and wound decontamination of multidrug-resistant bacteria by cold atmospheric plasma coagulation. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2015;13(2):143-9. doi: <https://doi.org/10.1111/ddg.12559>.
38. Arndt S, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Heinlin J, Li YF, et al. Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression of key molecules of the wound healing machinery and improves wound healing in vitro and in vivo. *PLoS One*.
-

- 2013;8(11):e79325. Epub 2013/11/23. doi: 10.1371/journal.pone.0079325. PubMed PMID: 24265766;
39. Hartwig S, Preissner S, Voss JO, Hertel M, Doll C, Waluga R, et al. The feasibility of cold atmospheric plasma in the treatment of complicated wounds in cranio-maxillo-facial surgery. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017;45(10):1724-30. Epub 2017/08/28. doi: 10.1016/j.jcms.2017.07.008. PubMed PMID: 28843407.
40. Bauer G, Graves DB. Mechanisms of Selective Antitumor Action of Cold Atmospheric Plasma-Derived Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Plasma Processes and Polymers.* 2016;13(12):1157-78. doi: <https://doi.org/10.1002/ppap.201600089>.
41. Sen CK, Roy S. Redox signals in wound healing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 2008;1780(11):1348-61. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.01.006>.
42. Roy S, Khanna S, Nallu K, Hunt TK, Sen CK. Dermal Wound Healing Is Subject to Redox Control. *Molecular Therapy.* 2006;13(1):211-20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.07.684>.
43. Barton A, Wende K, Bundscherer L, Hasse S, Schmidt A, Bekeschus S, et al. Nonthermal Plasma Increases Expression of Wound Healing Related Genes in a Keratinocyte Cell Line. 2013;3(1-2):125-36. doi: 10.1615/PlasmaMed.2014008540.
44. Heinlin J, Morfill G, Landthaler M, Stolz W, Isbary G, Zimmermann JL, et al. Plasma medicine: possible applications in dermatology. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2010;8(12):968-76. Epub 2010/08/20. doi: 10.1111/j.1610-0387.2010.07495.x. PubMed PMID: 20718902.
45. Gan L, Zhang S, Poorun D, Liu D, Lu X, He M, et al. Medical applications of nonthermal atmospheric pressure plasma in dermatology. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft.* 2018;16(1):7-13. doi: <https://doi.org/10.1111/ddg.13373>.
46. Gay-Mimbrera J, García MC, Isla-Tejera B, Rodero-Serrano A, García-Nieto AV, Ruano J. Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer. *Adv Ther.* 2016;33(6):894-909. Epub 2016/05/05. doi: 10.1007/s12325-016-0338-1. PubMed PMID: 27142848; PubMed Central PMCID: PMC4920838.
47. Arndt S, Wacker E, Li YF, Shimizu T, Thomas HM, Morfill GE, et al. Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells. *Exp*

Dermatol. 2013;22(4):284-9. Epub 2013/03/27. doi: 10.1111/exd.12127. PubMed PMID: 23528215.

48. Ishaq M, Kumar S, Varinli H, Han ZJ, Rider AE, Evans MD, et al. Atmospheric gas plasma-induced ROS production activates TNF-ASK1 pathway for the induction of melanoma cancer cell apoptosis. *Mol Biol Cell*. 2014;25(9):1523-31. Epub 2014/02/28. doi: 10.1091/mbc.E13-10-0590. PubMed PMID: 24574456; PubMed Central PMCID: PMC4004600.

49. Sinden RR. DNA structure and function: Gulf Professional Publishing; 1994.

50. Schmidt O. Das genetische Material. In: Fritsche O, editor. *Genetik und Molekularbiologie*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2017. p. 1-10.

51. Goll MG, Bestor TH. Histone modification and replacement in chromatin activation. *Genes Dev*. 2002;16(14):1739-42. Epub 2002/07/20. doi: 10.1101/gad.1013902. PubMed PMID: 12130533.

52. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. 1998;273(10):5858-68. Epub 1998/04/16. doi: 10.1074/jbc.273.10.5858. PubMed PMID: 9488723.

53. Pinto DM, Flaus A. Structure and function of histone H2AX. *Subcell Biochem*. 2010;50:55-78. Epub 2009/12/17. doi: 10.1007/978-90-481-3471-7_4. PubMed PMID: 20012577.

54. Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem*. 2000;275(13):9390-5. Epub 2000/03/29. doi: 10.1074/jbc.275.13.9390. PubMed PMID: 10734083.

55. Mukherjee B, Kessinger C, Kobayashi J, Chen BP, Chen DJ, Chatterjee A, et al. DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)*. 2006;5(5):575-90. Epub 2006/03/29. doi: 10.1016/j.dnarep.2006.01.011. PubMed PMID: 16567133.

56. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*. 2001;276(45):42462-7. Epub 2001/09/26. doi: 10.1074/jbc.C100466200. PubMed PMID: 11571274.

57. Löbrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi AA, et al. gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths,

limitations and optimization. *Cell Cycle*. 2010;9(4):662-9. Epub 2010/02/09. doi: 10.4161/cc.9.4.10764. PubMed PMID: 20139725.

58. Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*. 2008;22(3):305-9. Epub 2008/07/10. PubMed PMID: 18610740.

59. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(3):220-8. Epub 2010/02/24. doi: 10.1038/nrm2858. PubMed PMID: 20177397.

60. Banáth JP, Olive PL. Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks. *Cancer Res*. 2003;63(15):4347-50. Epub 2003/08/09. PubMed PMID: 12907603.

61. de Feraudy S, Revet I, Bezrookove V, Feeney L, Cleaver JE. A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of gammaH2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(15):6870-5. Epub 2010/03/31. doi: 10.1073/pnas.1002175107. PubMed PMID: 20351298; PubMed Central PMCID: PMC2872460.

62. Vignard J, Mirey G, Salles B. Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: a direct and indirect lighting up. *Radiother Oncol*. 2013;108(3):362-9. Epub 2013/07/16. doi: 10.1016/j.radonc.2013.06.013. PubMed PMID: 23849169.

63. De Bont R, van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*. 2004;19(3):169-85. Epub 2004/05/05. doi: 10.1093/mutage/geh025. PubMed PMID: 15123782.

64. Arjunan KP, Sharma VK, Ptasinska S. Effects of atmospheric pressure plasmas on isolated and cellular DNA-a review. *Int J Mol Sci*. 2015;16(2):2971-3016. Epub 2015/02/03. doi: 10.3390/ijms16022971. PubMed PMID: 25642755; PubMed Central PMCID: PMC4346876.

65. Kuznetsova AA, Knorre DG, Fedorova OS. Oxidation of DNA and its components with reactive oxygen species. *Russian Chemical Reviews*. 2009;78(7):659.

66. Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie (INP). Plasmamedizin 2020 [30.12.2020]. Available from: <https://www.inp-greifswald.de/de/forschung/umwelt-und-gesundheit/plasmamedizin/>.

67. CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH. epiCS 2013 [23.12.2020]. Available from: <https://cellsystems.de/cells-and-media/c/epics>.

68. Besic I. Zelluläre und molekulare Wirkung von kaltem physikalischem Plasma auf Ovarialkarzinomzellen 2019.
69. Lamkowski A, Forcheron F, Agay D, Ahmed EA, Drouet M, Meineke V, et al. DNA damage focus analysis in blood samples of minipigs reveals acute partial body irradiation. (1932-6203 (Electronic)).
70. Ahmed EA, Agay D, Schrock G, Drouet M, Meineke V, Scherthan H. Persistent DNA damage after high dose in vivo gamma exposure of minipig skin. *PLoS One*. 2012;7(6):e39521. Epub 2012/07/05. doi: 10.1371/journal.pone.0039521. PubMed PMID: 22761813; PubMed Central PMCID: PMC3384646.
71. Weltmann K-D, Fricke K, Stieber M, Brandenburg R, von Woedtke T, Schnabel U. New nonthermal atmospheric-pressure plasma sources for decontamination of human extremities. *IEEE Transactions on Plasma Science*. 2012;40(11):2963-9.
72. Weltmann KD, Kindel E, von Woedtke T, Hähnel M, Stieber M, Brandenburg R. Atmospheric-pressure plasma sources: Prospective tools for plasma medicine. *Pure and Applied Chemistry*. 2010;82(6):1223-37.
73. Isbary G, Shimizu T, Li Y-F, Stolz W, Thomas HM, Morfill GE, et al. Cold atmospheric plasma devices for medical issues. *Expert review of medical devices*. 2013;10(3):367-77.
74. Dubuc A, Monsarrat P, Virard F, Merbahi N, Sarrette JP, Laurencin-Dalieux S, et al. Use of cold-atmospheric plasma in oncology: a concise systematic review. *Ther Adv Med Oncol*. 2018;10:1758835918786475. Epub 2018/07/27. doi: 10.1177/1758835918786475. PubMed PMID: 30046358; PubMed Central PMCID: PMC6055243.
75. Schuster M, Seebauer C, Rutkowski R, Hauschild A, Podmelle F, Metelmann C, et al. Visible tumor surface response to physical plasma and apoptotic cell kill in head and neck cancer. *J Craniomaxillofac Surg*. 2016;44(9):1445-52. Epub 2016/08/09. doi: 10.1016/j.jcms.2016.07.001. PubMed PMID: 27499516.
76. Ja Kim S, Min Joh H, Chung T. Production of intracellular reactive oxygen species and change of cell viability induced by atmospheric pressure plasma in normal and cancer cells. *Applied Physics Letters*. 2013;103(15):153705.
77. Bauer G. Signal amplification by tumor cells: Clue to the understanding of the antitumor effects of cold atmospheric plasma and plasma-activated medium. *IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences*. 2018;2(2):87-98. doi: 10.1109/TRPMS.2017.2742000.

78. Guerrero-Preston R, Ogawa T, Uemura M, Shumulinsky G, Valle BL, Pirini F, et al. Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int J Mol Med*. 2014;34(4):941-6. Epub 2014/07/23. doi: 10.3892/ijmm.2014.1849. PubMed PMID: 25050490; PubMed Central PMCID: PMC4152136.
79. Isbary G, Köritzer J, Mitra A, Li Y-F, Shimizu T, Schroeder J, et al. Ex vivo human skin experiments for the evaluation of safety of new cold atmospheric plasma devices. *Clinical Plasma Medicine*. 2013;1(1):36-44.
80. Hasse S, Duong Tran T, Hahn O, Kindler S, Metelmann HR, von Woedtke T, et al. Induction of proliferation of basal epidermal keratinocytes by cold atmospheric-pressure plasma. *Clin Exp Dermatol*. 2016;41(2):202-9. Epub 2015/07/16. doi: 10.1111/ced.12735. PubMed PMID: 26175125.
81. Yasuda H, Miura T, Kurita H, Takashima K, Mizuno A. Biological evaluation of DNA damage in bacteriophages inactivated by atmospheric pressure cold plasma. *Plasma Processes and Polymers*. 2010;7(3-4):301-8.
82. Vandamme M, Robert E, Lerondel S, Sarron V, Ries D, Dozias S, et al. ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. *International journal of cancer*. 2012;130(9):2185-94.
83. O'connell D, Cox LJ, Hyland WB, McMahon SJ, Reuter S, Graham WG, et al. Cold atmospheric pressure plasma jet interactions with plasmid DNA. *Applied Physics Letters*. 2011;98(4):043701.
84. Kalghatgi S, Kelly CM, Cerchar E, Torabi B, Alekseev O, Fridman A, et al. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PloS one*. 2011;6(1):e16270.
85. Leduc M, Guay D, Coulombe S, Leask RL. Effects of Non-thermal Plasmas on DNA and Mammalian Cells. *Plasma Processes and Polymers*. 2010;7(11):899-909. doi: <https://doi.org/10.1002/ppap.201000032>.
86. Lehnert B, Iyer R. Exposure to low-level chemicals and ionizing radiation: reactive oxygen species and cellular pathways. *Human & experimental toxicology*. 2002;21(2):65-9.
87. Alipoor A, Fardid R, Sharifzadeh S. Evaluating Gamma-H2AX Expression as a Biomarker of DNA Damage after X-ray in Angiography Patients. *J Biomed Phys Eng*. 2018;8(4):393-402. Epub 2018/12/21. PubMed PMID: 30568929; PubMed Central PMCID: PMC6280120.

88. Bin P, Zheng Y. [Association between gamma-H2AX and DNA double-strand breaks]. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2007;36(4):520-2. Epub 2007/10/24. PubMed PMID: 17953227.
89. Valdiglesias V, Giunta S, Fenech M, Neri M, Bonassi S. γ H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutat Res*. 2013;753(1):24-40. Epub 2013/02/19. doi: 10.1016/j.mrrev.2013.02.001. PubMed PMID: 23416207.
90. Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC. GammaH2AX as a molecular marker of aging and disease. *Epigenetics*. 2010;5(2):129-36. Epub 2010/02/13. doi: 10.4161/epi.5.2.11080. PubMed PMID: 20150765.
91. Takahashi A, Mori E, Somakos GI, Ohnishi K, Ohnishi T. Heat induces gammaH2AX foci formation in mammalian cells. *Mutat Res*. 2008;656(1-2):88-92. Epub 2008/09/04. doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.07.012. PubMed PMID: 18765297.
92. Bekeschus S, Schütz CS, Nießner F, Wende K, Weltmann KD, Gelbrich N, et al. Elevated H2AX Phosphorylation Observed with kINPen Plasma Treatment Is Not Caused by ROS-Mediated DNA Damage but Is the Consequence of Apoptosis. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:8535163. Epub 2019/10/24. doi: 10.1155/2019/8535163. PubMed PMID: 31641425; PubMed Central PMCID: PMC6770374 of this paper.
93. Ichijima Y, Sakasai R, Okita N, Asahina K, Mizutani S, Teraoka H. Phosphorylation of histone H2AX at M phase in human cells without DNA damage response. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;336(3):807-12. Epub 2005/09/13. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.164. PubMed PMID: 16153602.
94. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997;326 (Pt 1)(Pt 1):1-16. Epub 1997/08/15. doi: 10.1042/bj3260001. PubMed PMID: 9337844; PubMed Central PMCID: PMC1218630.
95. Degtarev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene*. 2003;22(53):8543-67. Epub 2003/11/25. doi: 10.1038/sj.onc.1207107. PubMed PMID: 14634618.
96. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*. 1999;6(11):1028-42. Epub 1999/12/01. doi: 10.1038/sj.cdd.4400598. PubMed PMID: 10578171.
97. Choudhary GS, Al-Harbi S, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods Mol Biol*. 2015;1219:1-9. Epub 2014/10/14. doi: 10.1007/978-1-4939-1661-0_1. PubMed PMID: 25308257.

98. Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA, Jr., Booth CJ, Mehal WZ, et al. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*. 2006;311(5762):847-51. Epub 2006/02/14. doi: 10.1126/science.1115035. PubMed PMID: 16469926; PubMed Central PMCID: PMC3738210.
99. Zheng TS, Schlosser SF, Dao T, Hingorani R, Crispe IN, Boyer JL, et al. Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(23):13618-23. Epub 1998/11/13. doi: 10.1073/pnas.95.23.13618. PubMed PMID: 9811849; PubMed Central PMCID: PMC24868.
100. Haralambiev L, Wien L, Gelbrich N, Lange J, Bakir S, Kramer A, et al. Cold atmospheric plasma inhibits the growth of osteosarcoma cells by inducing apoptosis, independent of the device used. *Oncol Lett*. 2020;19(1):283-90. Epub 2020/01/04. doi: 10.3892/ol.2019.11115. PubMed PMID: 31897140; PubMed Central PMCID: PMC6924118.
101. Arndt S, Landthaler M, Zimmermann JL, Unger P, Wacker E, Shimizu T, et al. Effects of cold atmospheric plasma (CAP) on β -defensins, inflammatory cytokines, and apoptosis-related molecules in keratinocytes in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120041. Epub 2015/03/15. doi: 10.1371/journal.pone.0120041. PubMed PMID: 25768736
102. Schmidt A, Woedtke TV, Stenzel J, Lindner T, Polei S, Vollmar B, et al. One Year Follow-Up Risk Assessment in SKH-1 Mice and Wounds Treated with an Argon Plasma Jet. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4). Epub 2017/04/20. doi: 10.3390/ijms18040868. PubMed PMID: 28422070; PubMed Central PMCID: PMC5412449.
103. Rutkowski R, Daeschlein G, von Woedtke T, Smeets R, Gosau M, Metelmann HR. Long-term Risk Assessment for Medical Application of Cold Atmospheric Pressure Plasma. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(4). Epub 2020/04/16. doi: 10.3390/diagnostics10040210. PubMed PMID: 32290487; PubMed Central PMCID: PMC7235715.
104. Lademann J, Richter H, Alborova A, Humme D, Patzelt A, Kramer A, et al. Risk assessment of the application of a plasma jet in dermatology. *J Biomed Opt*. 2009;14(5):054025. Epub 2009/11/10. doi: 10.1117/1.3247156. PubMed PMID: 19895127.
105. Wende K, Bekeschus S, Schmidt A, Jatsch L, Hasse S, Weltmann KD, et al. Risk assessment of a cold argon plasma jet in respect to its mutagenicity. *Mutat Res*

Genet Toxicol Environ Mutagen. 2016;798-799:48-54. Epub 2016/03/21. doi: 10.1016/j.mrgentox.2016.02.003. PubMed PMID: 26994493.

106. Hasse S, Hahn O, Kindler S, von Woedtke T, Metelmann H-R, Masur K. Atmospheric pressure plasma jet application on human oral mucosa modulates tissue regeneration. Plasma Medicine. 2014;4(1-4).

Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren mithilfe der Anfertigung der vorliegenden Dissertation nicht zustande gekommen wäre.

Zunächst bedanke ich mich ganz herzlich beim Direktor der Klinik und Poliklinik der Urologie der Universitätsmedizin Greifswald, Herrn Univ.- Prof. Dr. med. Martin Burchardt, der mir die Durchführung der vorliegenden Arbeit im molekular-urologischen Forschungslabor ermöglicht hat.

Weiterhin gilt mein besonderes Dankeschön meinem Doktorvater und wissenschaftlichen Betreuer, Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope für den Vorschlag dieses interessanten Themas und die exzellente Betreuung. Vielen lieben Dank! Das konstruktive Feedback, und das Mitdenken haben mich stets motiviert mein Wissen und meine wissenschaftliche Denkwiese zu erweitern.

Auch nimmt meine Familie eine herausragende Stellung in jeglicher Hinsicht ein. Ohne die liebevolle Fürsorge wäre dieser Arbeit nicht zu dem Werk geworden, welches sie heute ist. Darunter gilt mein besonderer Dank meiner Mutter, die mich während meiner gesamten Ausbildung unterstütz hat.

Tief verbunden sowie dankbar bin ich auch meiner Ehefrau Maroa für ihre unglaubliche Unterstützung und Ihr Verständnis bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit. Ich danke dir Maroa für die Motivation und die Geduld. Du warst immer da, als ich dich gebraucht habe.

Weiterer Dank gilt auch meinem Bruder Taha, meiner Schwester Bushra, meiner ganzen Familie und meinen Freuden. Euer Beistand und eure Unterstützung haben mir Kraft und Mut zur Anfertigung und Vollendung meiner Dissertation gegeben. Vielen Dank dafür.