

Aus dem Lehrstuhl für Dermatologie

Prof. Dr. Mark Berneburg

der Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

**Einfluss von Kaltplasma-behandeltem Zellkulturmedium auf die
Granulozytenfunktionalität**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Simon Lenzer

2024

Aus dem Lehrstuhl für Dermatologie

Prof. Dr. Mark Berneburg

der Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

**Einfluss von Kaltplasma-behandeltem Zellkulturmedium auf die
Granulozytenfunktionalität**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Simon Lenzer

2024

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Sigrid Karrer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Martin Kieninger

Tag der mündlichen Prüfung:

28.11.2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Neutrophile Granulozyten	3
1.1.1	Abwehrmechanismen neutrophiler Granulozyten	4
1.1.2	Die Rolle der PMN bei der Wundheilung	5
1.1.3	Typischer experimenteller Verlauf der Parameter der Granulozytenfunktionalität	5
1.2	Plasma- der vierte Aggregatzustand	7
1.2.1	Kaltes atmosphärisches Plasma (KAP)	8
1.2.2	Verwendete Plasmaquellen im Rahmen dieser Arbeit	9
1.3	Plasmamedizin in Dermatologie und Immunologie	12
1.4	Ziel der Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.2	Methoden	16
2.2.1	Versuchsablauf chronologisch	16
2.2.2	Probandenvorbereitung und venöse Blutentnahme	17
2.2.3	Dichtegradienten zur Granulozytenisolation	17
2.2.4	Herstellung der Gelmatrix zur Einbettung der Granulozyten	18
2.2.5	μ -Slide Chemotaxis	19
2.2.6	KAP-Behandlung des Zellkulturmediums	20
2.2.7	Life-Cell-Imaging	20
2.2.8	Quantifizierung der Parameter	21
2.2.9	Statistik	24
2.2.10	Beschreibung der verwendeten Versuchsbedingungen	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Ergebnisse aus Versuchsaufbau 1	26
3.1.1	Ergebnisse der Migration	26
3.1.2	Ergebnisse der ROS-Produktion	32
3.1.3	Ergebnisse der MPO-Freisetzung	34
3.1.4	Ergebnisse der NETose	35
3.2	Ergebnisse aus Versuchsaufbau 2	37
3.2.1	Ergebnisse der Migration	37
3.2.2	Ergebnisse der ROS-Produktion	40
3.2.3	Ergebnisse der MPO-Freisetzung	42
3.2.4	Ergebnisse der NETose	44

3.3	Ergebnisse aus Versuchsaufbau 3	46
3.3.1	Ergebnisse der Migration	46
3.3.2	Ergebnisse der ROS-Produktion, der MPO-Freisetzung und der NETose	49
4	Diskussion.....	49
4.1.1	Interpretation und Vergleich der Ergebnisse aus den Versuchsaufbauten 1 und 2	50
4.1.2	Interpretation der Ergebnisse aus Versuchsaufbau 3	53
4.2	Limitationen des Studiendesigns	53
4.3	Einfluss der KAP-Behandlung auf PMN und deren Auswirkungen auf die Wundheilung	54
5	Zusammenfassung.....	55
6	Literatur	57
7	Abbildungsverzeichnis.....	62
8	Tabellenverzeichnis.....	64
9	Abkürzungsverzeichnis.....	65
10	Danksagung	
11	Lebenslauf	
12	Erklärung zum Promotionsverfahren	

1 Einleitung

1.1 Neutrophile Granulozyten

Der Körper ist ständig einer Vielzahl an möglichen Krankheitserregern, die exogen auf ihn einwirken, wie Bakterien, Viren, Pilze sowie Parasiten ausgesetzt. Auch endogene Veränderungen mit Ursprung im Inneren des eigenen Körpers können den Menschen durch bösartige Erkrankungen bedrohen. Um die Integrität eines mehrzelligen Lebewesens zu erhalten hat sich mit dem Immunsystem ein körpereigenes Abwehrsystem entwickelt. Dieses lässt sich grundlegend einteilen in eine angeborene und eine adaptive Immunabwehr, die eng miteinander verknüpft sind und gezielt zusammenarbeiten, um die komplexe Immunantwort des Körpers zu bewerkstelligen (1). Einen wichtigen Beitrag in diesem Zusammenspiel leisten die Granulozyten, die vor den Lymphozyten und den Monozyten den größten Anteil unter den Leukozyten darstellen. Den Granulozyten gemeinsam ist das Vorhandensein von namensgebenden Granula in ihrem Zytoplasma, die je nach Färbung mit der Pappenheim-Methode eine Einteilung in neutrophile, basophile oder eosinophile Granulozyten ermöglicht (2).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktionalität der neutrophilen Granulozyten, auch polymorphkernige Neutrophile (PMN) genannt, untersucht. Diese circa 12-15 μm großen Zellen mit ihrem charakteristischen in drei oder vier Segmente aufgeteilten Zellkern und dem nur schwach anzufärbenden Zytoplasma stellen die größte Gruppe der Leukozyten dar und finden sich in einer Konzentration von circa 4000-7000 Zellen/ μL im Blut. Neutrophile Granulozyten bilden die erste Verteidigungslinie der angeborenen Immunantwort und haben damit eine wichtige Funktion in der unspezifischen Abwehr exogener Krankheitserreger. Diese Verteidigung geschieht unter anderem durch Phagozytose im Gewebe, welche voraussetzt, dass neutrophile Granulozyten durch postkapilläre Venolen hindurchwandern und sich im Gewebe einen Weg zum Krankheitserreger bahnen (3). Dabei benutzen PMNs eine amöboide Fortbewegungsart für eine schnelle und gleitende Migration (4). Für eine zielgerichtete Migration sind PMN in der Lage bestimmte Konzentrationsgradienten zu erkennen und sich zum Ort der höheren Konzentration zu bewegen. Dieser Vorgang wird als Chemotaxis bezeichnet. Dabei spielen sogenannte *chemoattractants* eine entscheidende Rolle. Diese sind eine chemisch heterogene Gruppe von Molekülen wie zum Beispiel Lipide, N-formylierte Peptide, Komplementfaktoren oder Anaphylatoxine. *Chemoattractants* werden in sogenannte *end stage* und *intermediary chemoattractants* eingeteilt. Erstere dominieren hinsichtlich ihrer

chemotaktischen Wirkung stark über den zweiten. Das bedeutet, dass bei Vorhandensein mehrerer *chemoattractants* diese eher in Richtung der *end stage chemoattractants* migrieren als zu den *intermediary chemoattractants*, selbst wenn die *intermediary chemoattractants* in einer vielfach höheren Konzentration vorliegen (5). Im Labormodell findet der *end stage* Lockstoff fMLP (N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine) häufig Verwendung. Beispiele für *intermediary chemoattractants* sind Interleukin-8 und Leukotrien B4 (5, 6).

1.1.1 Abwehrmechanismen neutrophiler Granulozyten

Am Ort der Infektion oder Entzündung angelangt sind die PMNs in der Lage dort mithilfe von verschiedenen Mechanismen Erreger abzutöten (6, 7). Ein wichtiger Mechanismus ist der sogenannte *respiratory burst*, bei der PMNs einen starken Anstieg ihres Sauerstoffverbrauchs zeigen (7, 8). In diesem Stoffwechselfvorgang werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikale ($OH\bullet$), und hypochlorige Säure (HOCl) gebildet, die wiederum dazu beitragen, Erreger zu zerstören (9).

Der *respiratory burst* wird unterstützt durch die Degranulation der histologisch sichtbaren Granula mit Freisetzung der darin enthaltenen lytischen Enzyme und bakteriziden Peptide (7). Ein wesentliches Enzym, das in den Granula gespeichert wird, ist die Myeloperoxidase (MPO) (10). MPO katalysiert die Bildung von hypochloriger Säure, die wiederum Zellmembranen und Zellwände angreift (11).

Ein weiterer Abwehrmechanismus von neutrophilen Granulozyten ist die NETose. Neutrophil extracellular traps (NETs) sind Bestandteile von neutrophilen Granulozyten, die genau wie es die Abkürzung vermuten lässt netzartig ausgebreitet werden. Dies geschieht durch Auflösung der Kernstruktur bei zuerst intakter Zellmembran und Vermischung des dekondensierten Chromatins mit Inhalten der Granula. Nach dem Bruch der Zellmembran werden die NETs, die aus Teilen der DNA der Granulozyten, Histonen und daran gebundenen Proteinen aus den azurophilen Granula bestehen, in den Extrazellularraum freigesetzt. In diesem Raum werden Bakterien, Viren und Pilze an den NETs angelagert, was zu ihrer Immobilisierung führt und die Phagozytose durch Makrophagen erleichtert. Zusätzlich können antimikrobielle Substanzen ihre Wirkung besser entfalten, wenn sich Pathogene in höherer Konzentration an einem Ort befinden (12). Durch die NETs werden die im Rahmen der Immunreaktion freigesetzten zytotoxischen Substanzen an der Diffusion ins umliegende Gewebe gehindert, wodurch Kollateralschäden vermindert werden (13).

1.1.2 Die Rolle der PMN bei der Wundheilung

Die Wundheilung ist einer der komplexesten biologischen Prozesse, die während eines menschlichen Lebens auftreten. Nach einer Verletzung werden verschiedenste Signalwege aktiviert und aufeinander abgestimmt. Daraus entstehen vier nacheinander ablaufende, sich überlappende Wundheilungsphasen: Blutungsphase, Entzündungsphase, Proliferationsphase und Remodellierungsphase. Im Verlauf der Wundheilung spielen neben den beteiligten Zellen der Haut, wie Keratinozyten und Fibroblasten, auch Zellen des Immunsystems eine Rolle (14). PMN sind unter den ersten Zellen, die aus dem Blutkreislauf heraus an der Wundstelle wirken. Neutrophile häufen sich typischerweise in großer Anzahl innerhalb von Minuten bis zu einigen Stunden an. Der Zeitpunkt, bei dem die Anzahl der lebensfähigen Neutrophilen im Gewebe am höchsten ist, wird oft als Höhepunkt einer selbstlimitierenden Entzündungsepisode angesehen (15). Letztlich vollziehen sie im Gewebe ihre klassischen Funktionen wie Phagozytose, Degranulation, ROS-Produktion und die Bildung von NETs. Diese Prozesse zielen darauf ab, mikrobielle Infektionen an der Verletzung zu verhindern (16, 17). Zusätzlich zu den direkten heilungsfördernden Wirkungen können PMN durch die Modulation des Verhaltens anderer Zellen indirekt zur Wiederherstellung von Gewebe beitragen. Beispielsweise werden Makrophagen in Wunden durch PMN dazu animiert, apoptotische Neutrophile zu phagozytieren (Efferozytose). Dadurch leisten PMN einen Beitrag die Entzündung zu minimieren und das Fortschreiten der Wundheilung in die Proliferationsphase zu ermöglichen (15). Hingegen sezernieren PMN auch proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-1 β und Interleukin-6 und amplifizieren dadurch die Entzündungsreaktion (18). Eine starke Immunantwort gegen Pathogene durch die PMN ist in der frühen Phase der Wundheilung erwünscht und senkt das Risiko einer Wundinfektion. Allerdings sind die Auswirkungen der ausgeschütteten Enzyme und Proteasen nicht spezifisch gegen Pathogene wirkend, sondern können für Kollateralschäden am Gewebe sorgen. Dadurch kann der Einstieg in einen *circulus vitiosus* aus Neutrophilenaktivierung und Gewebsschäden gefunden werden (19).

1.1.3 Typischer experimenteller Verlauf der Parameter der Granulozytenfunktionalität

In dieser Arbeit wurde der Verlauf der Migration der Zellen, das Auftreten des *respiratory burst*, der NETose sowie die Freisetzung von MPO gemessen. Nach einem im Labor der Klinik für Anästhesie am Universitätsklinikum Regensburg etablierten Verfahren zeigen diese Parameter üblicherweise einen charakteristischen Verlauf und treten in bestimmter Abfolge auf: ROS-Produktion, MPO-Freisetzung und am Schluss NETose (20, 21). Die einzelnen

Parameter sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden: Die Migration zeigt sich typischerweise zu Beginn der Beobachtungsphase stärker ausgeprägt und nimmt in den darauffolgenden Zeitabschnitten ab. Zellen, die in NETose getreten sind migrieren nicht mehr (22). Kurz nach Beobachtungsbeginn waren gewöhnlich nur sehr wenige Zellen zu sehen, die ROS produzieren und die Summe ihrer Flächeninhalte (Detailbeschreibung siehe 2.2.8) dementsprechend gering. Abbildung 1 zeigt beispielhaft den typischen parabelförmigen Verlauf der ROS-Produktion.

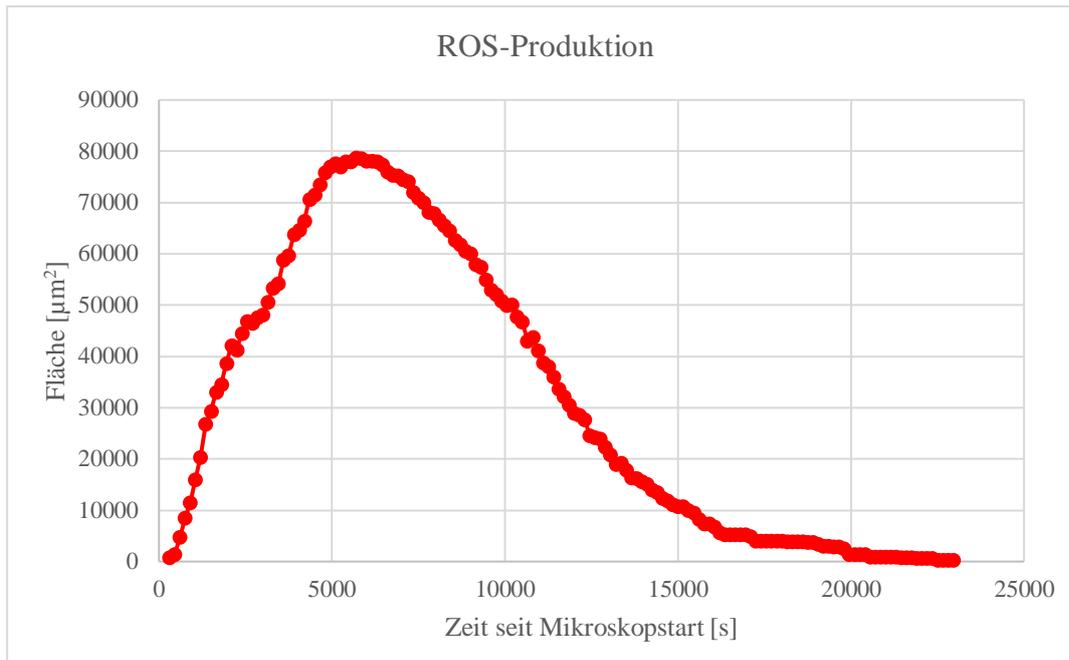


Abbildung 1: Exemplarischer Verlauf der ROS-Produktion

Mit der Zeit nimmt die Anzahl der Zellen, die *respiratory burst* betreiben zu und auch die Fläche einer einzelnen Zelle vergrößert sich. Folglich steigt die Summe der Flächeninhalte bis zu einem gewissen Maß an. Der *respiratory burst* wird durch das Anschwellen der Zellen beendet. Anschließend platzt die Zellmembran (NETose) und das Cytoplasma entleert sich in die Umgebung. Dadurch wird der oxidierte Farbstoff Rhodamine-123 verdünnt und die Anzahl der farbtragenden Zellen reduziert.

Der Verlauf der NETose, bei Beobachtung vieler Zellen, verhält sich typischerweise nach einem sigmoidalen Muster, wie in Abbildung 2 dargestellt. Zu Beginn der Beobachtungszeit sind wenige Zellen zu sehen, die diesen Abwehrmechanismus betreiben. Allmählich vergrößert

sich diese Zahl und auch die Fläche der NETs jeder einzelnen Zelle bei gerade stattfindender NETose vergrößert sich.

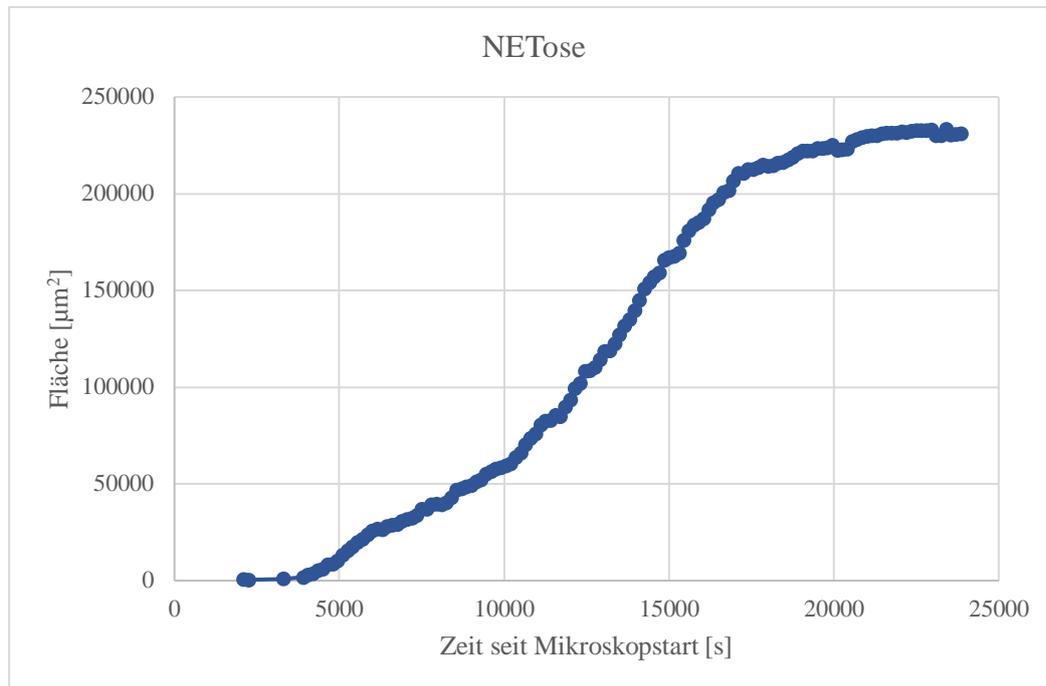


Abbildung 2: Exemplarischer Verlauf der NETose

Ein Verbleichen des Farbstoffs findet nicht statt. Das lässt sich durch den verwendeten Farbstoff erklären: Die NETose wurde durch Zugabe des Farbstoffes 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) gezeigt. Dieser interkaliert in AT-reiche Regionen der bei der NETose in den Extrazellarraum ausgeworfenen DNA der PMN (23). Folglich ist keine Verminderung in der aufsummierten Flächensumme zu sehen und es wird ein Plateau erreicht. Ganz ähnlich dazu zeigt sich der Verlauf der Freisetzung der Myeloperoxidase im Labormodell als ebenfalls sigmoidal, was über die Bindung eines Anti-MPO Antikörpers, der an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, sichtbar gemacht wird.

1.2 Plasma- der vierte Aggregatzustand

Die Plasmamedizin ist ein Forschungsfeld an der Schnittstelle von Medizin und Physik. Die Analogie des Begriffs Plasma in der Physik, zu der medizinischen Bezeichnung für den zellfreien Bestandteil des Blutes, erklärt sich folgendermaßen: Für den namensgebenden Chemiker und Physiker Irving Langmuir, bestand eine Ähnlichkeit zwischen den im Blutplasma treibenden zellulären Bestandteilen und der Lösung geladener Teilchen im physikalischen Plasma (24). Dieses Plasma entsteht, wenn gasförmiger Materie weiter Energie zugeführt wird, weshalb es auch als vierter Aggregatzustand bezeichnet wird. Die drei

klassischen Aggregatzustände einer Materie sind, mit zunehmendem Energiegehalt, fest, flüssig oder gasförmig. Der Phasenübergang zwischen Aggregatzuständen zeigt sich dabei in einer größeren Beweglichkeit der Moleküle zueinander, wobei im gasförmigen Zustand die einzelnen Moleküle nicht mehr miteinander in Kontakt stehen (25). Bei weiterhin zunehmender Energie findet eine teilweise Ionisierung statt. Die Energie kann dabei auf unterschiedliche Weise zugeführt werden, unter anderem durch thermische- oder Strahlungsanregung. Das Plasma liegt dann als Mischung aus Ionen, freien Elektronen und nicht dissoziierten Molekülen eines Stoffes vor (26). In Abbildung 3 ist eine schematische Übersicht über die vier Aggregatzustände in Abhängigkeit der enthaltenen Energie, dargestellt.

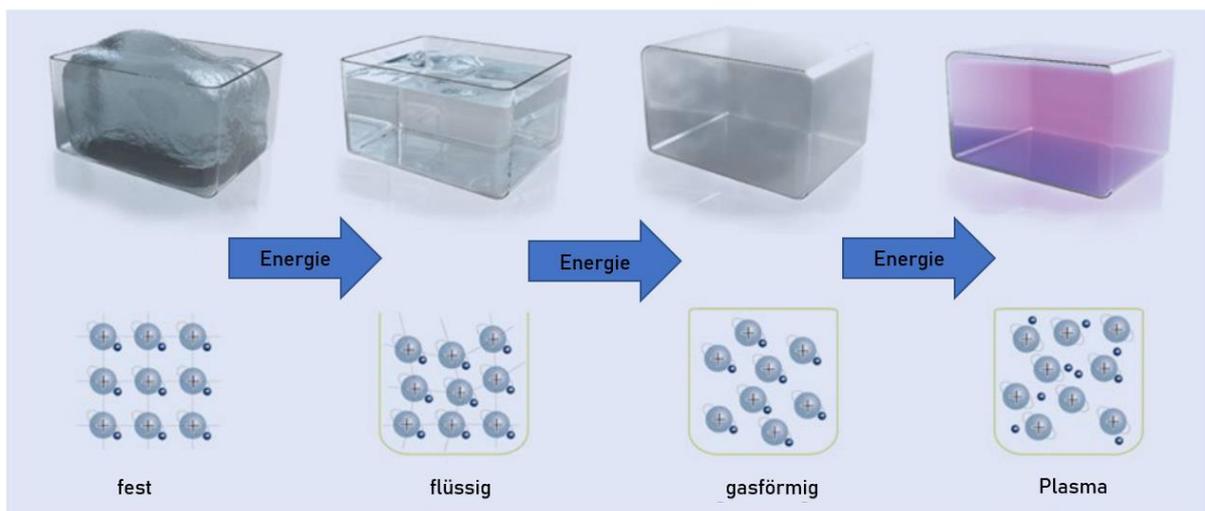


Abbildung 3: Plasma als vierter Aggregatzustand, Abbildung modifiziert nach (24)

Mit dem Phasenübergang von Gas zu Plasma geht auch eine erhöhte Reaktivität des Stoffes einher, wobei Plasma UV- und IR- Strahlen und sichtbares Licht emittiert, sowie eine elektrische Leitfähigkeit besitzt (26).

1.2.1 Kaltes atmosphärisches Plasma (KAP)

Es gibt viele verschiedene Arten von Plasma, die in Abhängigkeit ihrer Dichte, des Drucks und des thermischen Gleichgewichts, klassifiziert werden können. Für eine Anwendung in der Medizin ist dabei die Erzeugung von Plasma bei Atmosphärendruck eine Voraussetzung. Hier wird sogenanntes kaltes atmosphärisches Plasma (KAP) verwendet, welches zu den Plasmen zählt, die sich nicht im thermischen Gleichgewicht befinden. Dies bedeutet, dass die enthaltenen Teilchen unterschiedliche Temperaturen aufweisen. Im KAP gibt es einige wenige Elektronen die Temperaturen von bis zu 10^4 °C erreichen, jedoch weist der wesentliche Anteil der Teilchen eine Temperatur um Raumtemperatur auf. *Kalt* bezieht sich somit auf eine

Temperatur, die unter 40 °C liegt, weshalb KAP für die Nutzung an beziehungsweise in menschlichen Geweben geeignet ist. Im Gegensatz dazu befinden sich heiße Plasmen im thermischen Gleichgewicht und kommen bei einer Temperatur um 10⁴ °C unter anderem beim Schweißen von Metallen oder zur Oberflächenbeschichtung zum Einsatz. Die wirksamen Bestandteile von KAP sind mit Ionen und Elektronen, UV- und IR- Strahlung, sichtbarem Licht, elektromagnetischen Feldern, Wärmestrahlung und reaktiven Spezies sehr vielfältig. Im medizinischen Kontext sind neben der UV-Strahlung und dem elektrischen Feld vor allem die im KAP enthaltenen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiven Stickstoffspezies (RNS), von Bedeutung. Abbildung 4 liefert einen Überblick über die wirksamen Bestandteile des Plasmas. Das Besondere an der Anwendung von Plasma liegt an einem „Cocktail“ vielschichtiger Wirkkomponenten und der Möglichkeit diese teils instabilen Spezies am Ort der Behandlung entstehen zu lassen (24).

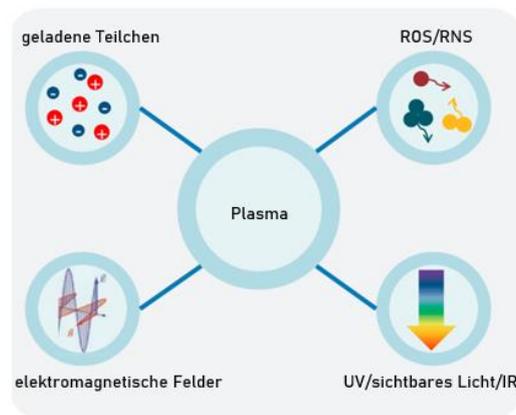


Abbildung 4: Wirksame Bestandteile von Plasma. Abbildung modifiziert nach (27)

1.2.2 Verwendete Plasmaquellen im Rahmen dieser Arbeit

KAP entsteht durch die Zuführung von Energie zu einem gasförmigen Medium. Die einfachste Anordnung dafür wäre es an zwei Elektroden an den Seiten eines gasgefüllten Hohlraums eine hohe elektrische Spannung anzulegen. KAP wird allerdings heute mit technisch vielseitigen Methoden erzeugt (28). Eine Möglichkeit davon sind sogenannte *Plasma-Jets* oder *Plasma-torches*. Bei diesen wird ein elektrisches Feld um eine feine Kapillare herum generiert, welches dann als Dielektrikum dient. Eine *Plasma-torch* wird aus einem Verbund von mehreren *Plasma-Jets* gebildet. Optional wird das Plasma mit der Strömung eines Gases (z.B. ein Edelgas wie Argon) an den Wirkort gebracht. Die Plasmaquelle MicroPlaSter[®] nutzt diese Technik (27). In Abbildung 5 sind hell glimmend die 6 Elektroden zu erkennen, an denen das KAP gebildet wird. Im Hintergrund des Bildes findet sich die circa kühschrankgroße Steuer- und

Technikeinheit des MicroPlaSter[®], welche die Nachteile eines schwereren Handlings und eingeschränkter Transportmöglichkeiten mit sich bringt.



Abbildung 5: MicroPlaSter[®], Bild mit freundlicher Genehmigung aus (29)

Eine weitere Möglichkeit ist die *dielectric barrier discharge* (im folgenden DBDs genannt). Dabei schirmt ein elektrisch nicht oder nur schwach leitendes Medium zwei Elektroden, an denen eine Spannung anliegt, voneinander ab. Dieses abschirmende Dielektrikum schwächt den Stromfluss ab und lässt das Plasma entstehen. Beim sogenannten *volume-DBD* fungiert die behandelte Fläche als eine Elektrode. Beim Prinzip des *surface-DBD* entsteht die Entladung an der Oberfläche des Dielektrikums und wird ohne den Fluss eines Edelgases direkt an die umgebende Raumluft abgegeben. Daraus ergibt sich, dass die Komponenten, die gebildet werden von Bedingungen der Umgebungsluft wie Luftfeuchtigkeit und Temperatur abhängig sind. Die zweite verwendete Plasmaquelle (plasma care[®]) ist eine *surface micro-discharge* Plasmaquelle. Dieses Gerät wurde uns von der Firma terraplasma[®] für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt. Bei diesem Prototyp lassen sich die Plasmakomponenten über die Änderung der Frequenz in ihrer Zusammensetzung variieren. So wird im 4 kHz-Modus mehr ROS produziert, im 8 kHz Modus hingegen mehr RNS (30). In der für die Wundheilung optimierten und als Medizinprodukt zugelassenen Version ist lediglich der 4 kHz Modus verfügbar (28). Das handliche Gerät mit den Ausmaßen eines Telefonhörers ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt.

Jede Methode der Plasmaerzeugung sorgt für eine andere Zusammensetzung des Cocktails an wirksamen Substanzen. Auch kann mit Veränderungen an Parametern wie Spannung oder des Gasflusses die Komposition des erzeugten Plasmas innerhalb eines einzigen Gerätes modifiziert werden (28).

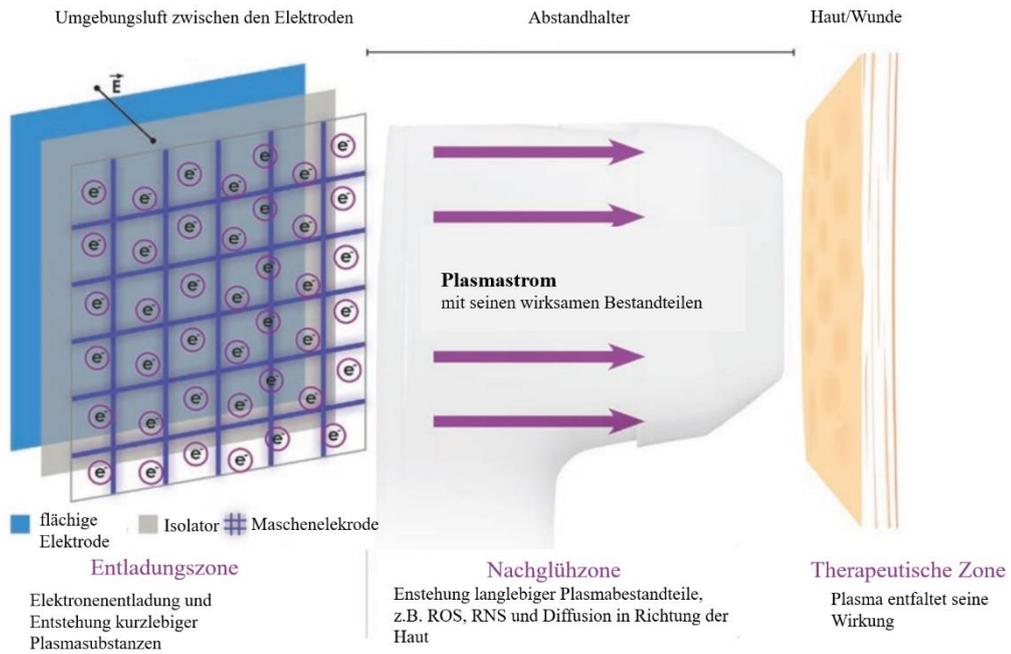


Abbildung 6: Schema der Funktionsweise des plasma care[®], Abbildung modifiziert nach (28)

Die folgende Abbildung 7 zeigt den grundlegenden Aufbau der verwendeten Plasmaquellen im Vergleich.

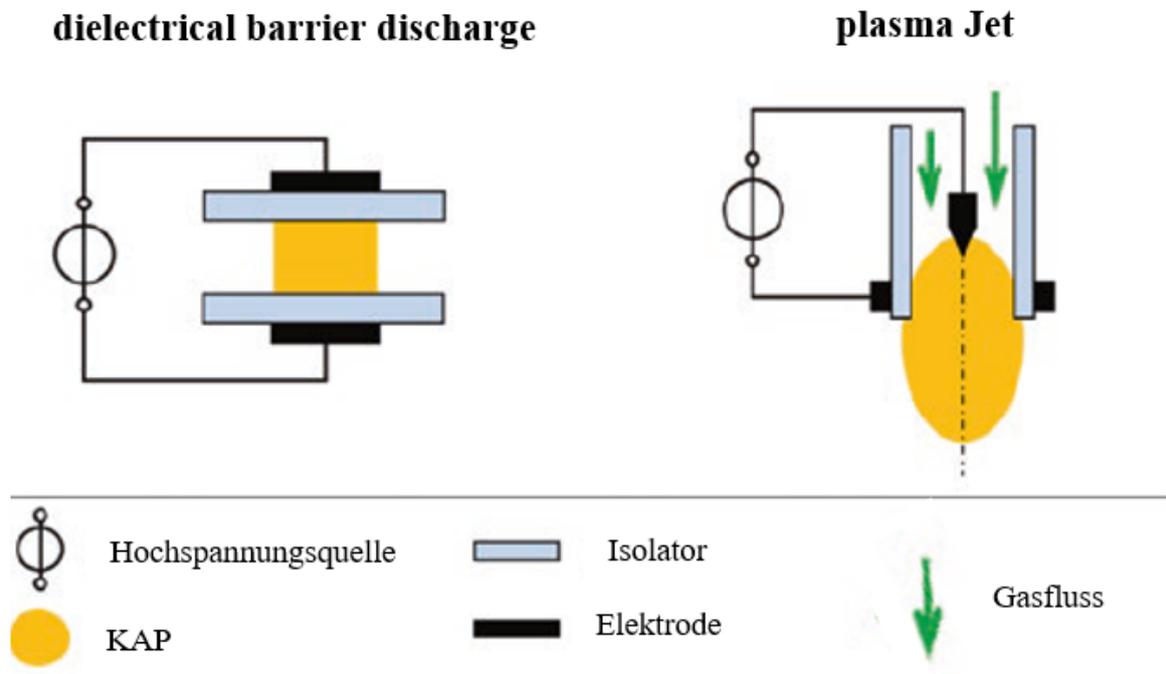


Abbildung 7: Grundlegende technische Funktionsweise der verwendeten Plasmaquellen, Abbildung modifiziert nach (26)

1.3 Plasmamedizin in Dermatologie und Immunologie

Für die Plasmamedizin wurden in der letzten Dekade diverse Anwendungsmöglichkeiten, unter anderem in der Dermatologie entwickelt. Bei einer neuen Technologie spielte anfangs die Frage nach vorhandenen Risiken eine Rolle (31). Später wurde die Plasmamedizin auf dem Gebiet der Wundbehandlung klinisch erforscht (24). Eine randomisierte, placebokontrollierte Studie zeigte eine signifikant bessere Wundheilung an der Entnahmestelle eines Hauttransplantats schon ab dem zweiten Behandlungstag (32). Eine weitere placebokontrollierte Studie an diabetischen Fußulzera ergab eine signifikante Reduktion der Wundfläche und der Zeit bis zum Wundverschluss (33).

Eine bakterielle Kontamination einer Wunde aus der umgebenden Haut führt zu einer Störung der Wundheilung durch Verlängerung der inflammatorischen Phase (34). Eine Unterstützung der Wundheilung könnte demnach durch die desinfizierende Wirkung von KAP gegeben sein. Die toxische Wirkung auf Mikroorganismen wie *MRSA*, *S. aureus* und *E. coli* wurde anhand einer Versuchsreihe mit ex vivo Schweinehaut demonstriert (35). Neuere Publikationen zeigen jedoch Hinweise, dass neben den direkten bakteriziden Eigenschaften von KAP molekulare

Mechanismen aktiviert werden, die sich positiv auf die Wundheilung auswirken. Ein Effekt von KAP auf Gewebe zeigt sich durch eine gesteigerte Expression von Zytokinen wie Vascular Endothelial Growth Factor und Transforming Growth Factor β , welches Endothelzellen zur Angiogenese anregt (36). Auch antibakteriell wirksame beta-Defensine werden nach KAP-Behandlung von den Keratinozyten vermehrt ausgeschüttet (37). Daneben werden Fibroblasten aktiviert und deren Kollagensynthese durch KAP gesteigert (38). KAP Grundlagenforschung wird weiterhin in Bereichen wie Hygiene, Desinfektion oder der Behandlung maligner Tumoren der Haut betrieben (39, 40).

Zu Beginn dieses Forschungsprojekts lagen bereits Studien vor, die sich mit dem Einfluss von Plasma auf PMN beschäftigen: So zeigte eine Studie, dass eine Plasmabehandlung intrazelluläre fluoreszierende redox- Proben zu oxidieren vermag, die metabolische Aktivität herabsetzte und dabei nicht für eine frühere Apoptose sorgte. Der *oxidative burst* wurde nur gering beeinflusst. Die NETose wurde allerdings durch die Plasmabehandlung induziert (41). Für die Wundheilung ist die Migration von Zellen wie Fibroblasten, Keratinozyten, Epithel- und Endothelzellen von großem Belang. Bei Studien mit KAP wurden Effekte auf das Migrationsverhalten von nicht humanen PMN beschrieben: Mäusen wurde eine definierte Hautwunde zugefügt und die Wunden wurden mit dem MicroPlaSter[®] über 10 Tage täglich für 2 Minuten behandelt. Mit einer zweiten Gruppe von Mäusen wurde genauso verfahren, lediglich wurde der MicroPlaSter[®] bei ihnen in einem Placebomodus verwendet. An Tag 5 nach Zufügung der Wunden wurden in den Hautbiopsaten der Verum-Gruppe 30 % mehr PMN als in den Biopsaten der Placebo-Gruppe gefunden (38).

1.4 Ziel der Arbeit

Wie oben beschrieben hat eine Behandlung von Hautwunden mit KAP einen positiven Effekt auf die Wundheilung. Dieser lässt sich zum Teil durch eine antibakterielle Wirkung des KAP erklären. Da die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies sowohl ein wichtiger Abwehrmechanismus von PMN ist und diese auch einen wirksamen Bestandteil von KAP darstellen, erscheint es folgerichtig der Frage nachzugehen, ob plasmabehandeltes Zellkulturmedium Einfluss auf die Granulozytenfunktion hat. Es soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit plasmabehandeltes Zellkulturmedium die Migration, die ROS-Produktion und die NETose beeinflusst. Hierbei soll mittels Life-Cell-Imaging das Verhalten der Granulozyten nach engem räumlichem Kontakt zu plasmabehandeltem Zellkulturmedium (im folgenden PTS genannt) untersucht werden. Zur Objektivierung der Zellaktivität wird die Migration, die ROS-Produktion, die MPO-Freisetzung und die NETose quantifiziert. Variablen

ergeben sich aus der Dauer der Plasmabehandlung der PTS (unbehandelt, zwei oder fünf Minuten), der dafür verwendeten Plasmaquelle und der Stärke der Einwirkung der PTS auf die Zellen (durch verschiedene Varianten der Befüllung des Objektträgers). Der verwendete Objektträger mit drei Beobachtungseinheiten erlaubt pro Versuchsdurchführung eine Kontrolle ganz ohne Verwendung von Plasmabehandlung sowie zwei Beobachtungseinheiten für die unterschiedlich lange Behandlung der PTS mit KAP. Es ist vorgesehen, unter jedem Versuchsaufbau mit jeder der beiden Plasmaquellen (MicroPlaSter® und plasma care®) jeweils acht Versuche durchzuführen. Schematisch zu sehen ist der Studienaufbau in Abbildung 8.

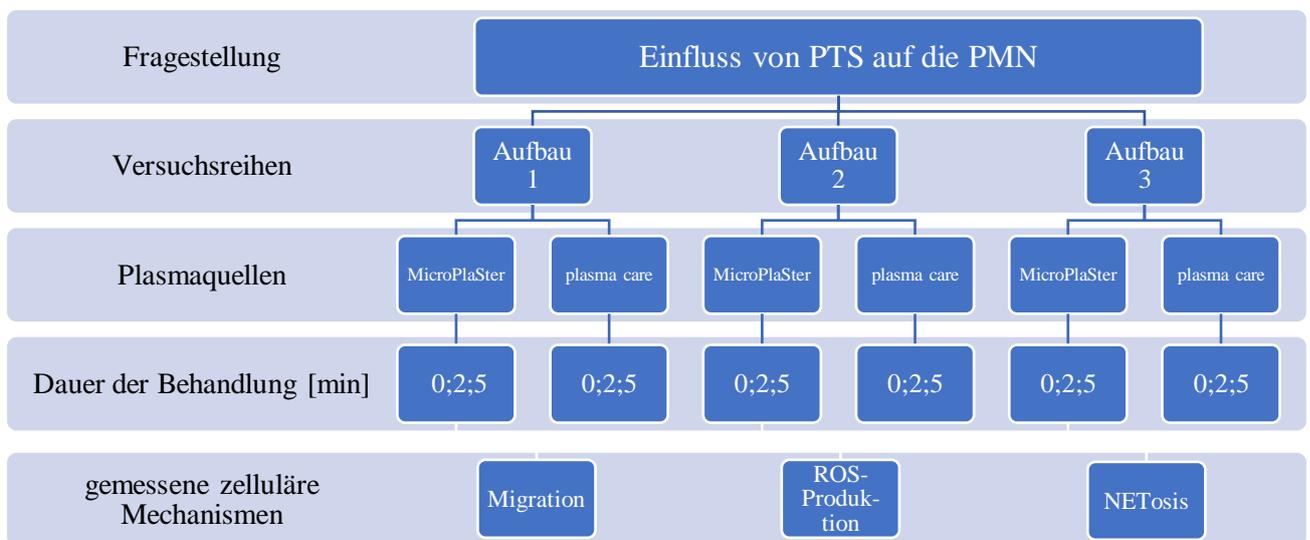


Abbildung 8: Studienaufbau

2 Material und Methoden

2.1 Material

In den folgenden Tabellen sind Verbrauchsmaterial, Geräte und verwendete Chemikalien für die Durchführung der Versuche aufgeführt.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
μ -Slide Chemotaxis	Ibidi GmbH, Gräfeling
15 mL CELLSTAR® Polypropylen Röhren	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Softasept® N (Hautdesinfektionsmittel)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Safety-Multifly®-Kanüle mit 0,8 x 19 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
S-Monovette® 7.5 mL LH	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Zellkulturschale, Ø 3,5 cm	Corning Inc., New York, USA
Neubauer-Zählkammer:	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen

Tabelle 1: Verwendetes Verbrauchsmaterial

Gerät	Hersteller
CoolLED pE4000 (Belichtungssystem)	CoolLED Ltd., Andover, UK
Plasma care [®] (Plasmaquelle)	Terraplasma GmbH, Garching
Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Leica DFC9000 GT (Kamera)	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar
MR 2002 (Magnetrührer)	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Leica-Mikroskop DMi8	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar
Megafuge 1.0 R (Zentrifuge)	Heraeus Sepatech, Hanau
MicroPlaSter [®] (Plasmaquelle)	Adtech Plasma Technology, Fukuyama, Japan
Micro Star 17 R (Zentrifuge)	VWR GmbH, Darmstadt
Inkubator Objektisch	Ibidi GmbH, Gräfeling
Spender für deionisiertes Wasser	EnviroFALK GmbH, Westerburg
DAPI/FI	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar
LED QUAD	Chroma Technology Corp., Vermont, USA
Leica Application Suite X Version 3.4.18368.2	(Leica Mikroskopie)
Imaris [®] : Version 9.0.2	Bitplane AG, Zürich, Schweiz
Kalkulationsprogramm Excel [®] 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Phoenix [®] 8.0.0	Certara L.P., Princeton, USA
Datenauswertungs-/Analyseprogramm IBM SPSS [®] Statistics 25	IBM, Armonk, USA)

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Computerprogramme

Substanz	Hersteller
MEM 10x (Minimum Essential Medium)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NaHCO ₃	Emsure [®] ACS, Merck KGaA, Darmstadt
PureCol [®] (bovines Kollagen-I)	Advanced BioMatrix, Inc., San Diego, USA
RPMI 1640 (Nährmedium)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Leuko Spin Medium	pluriSelect Life Science, Leipzig
Lympho Spin Medium	pluriSelect Life Science, Leipzig
Anti-MPO-APC (fluoreszierender Farbstoff)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
4',6-Diamidin-2-phenylindol, (DAPI) (fluoreszierender Farbstoff)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin, (fMLP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumbikarbonat-Lösung 7,5 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dihydrorhodamin-123-Färbelösung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

Tabelle 3: Verwendete Substanzen und Chemikalien

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsablauf chronologisch

Ein positives Votum der Ethikkommission der Universitätsklinik Regensburg liegt unter dem Aktenzeichen 19-1569-101, vereinbart in der Sitzung vom 13.11.2019 vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Granulozytenfunktion in Abhängigkeit von zuvor KAP behandelten Zellkulturmedien beobachtet und analysiert. Die Gewinnung der zu beobachtenden Zellen, ihr Milieu während der Beobachtungszeit, die Behandlung des Zellkulturmediums, sowie die Beobachtung mittels *Life-Cell-Imaging*, werden im Folgenden kurz beschrieben. Im Anschluss daran werden die Arbeitsschritte nochmals detailliert erläutert.

Nach Einverständnis zur venösen Blutentnahme wurden Granulozyten aus der Vollblutprobe gesunder Proband*innen isoliert. Diese Granulozyten wurden in eine Gelmatrix eingebettet und auf speziellen Objektträger (*μ-Slide Chemotaxis*) 30 min. inkubiert. Die Zeit während dieser Inkubation wurde dazu genutzt, Zellkulturmedium mit KAP zu behandeln, welches anschließend durch die spezielle Konfiguration des Objektträgers in räumliche Nähe zu den Granulozyten gebracht wurde. Hieran schließt sich das *Life-Cell-Imaging* an, eine ca. 7-stündige Beobachtungszeit unter dem Leica-Mikroskop DMi8, welches alle 30 Sekunden eine

Aufnahme der Zellen anfertigt. Diese Aufnahmen wurden im Anschluss mit dem Programm IMARIS[®] objektiviert. Die so generierten Daten wurden mit Hilfe der Betriebsprogramme Microsoft Excel[®] und Phoenix[®] verarbeitet. Im Anschluss erfolgte die statistische Auswertung mit SPSS[®].

2.2.2 Probandenvorbereitung und venöse Blutentnahme

Zur Gewinnung von Granulozyten erfolgte eine venöse Blutentnahme. Hierzu wurde nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung über den Inhalt der Studie, sowie mögliche Nebenwirkungen der Blutentnahme die schriftliche Einwilligung jedes Teilnehmers eingeholt. Die Venenpunktion zur Gewinnung der Vollblutprobe erfolgte mittels einer Safety-Multifly[®]-Kanüle nach vorheriger Hautdesinfektion aus einer peripheren Vene an Ellenbogen oder Handrücken. Das Blut wurde in eine S-Monovette[®] 7,5 mL mit Lithium-Heparin abgenommen.

2.2.3 Dichtegradienten zur Granulozytenisolation

Zur Isolation vitaler Granulozyten aus der Vollblutspende wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mit Trennmedien durchgeführt. Dabei wurden in zwei 15 mL-Zentrifugenröhrchen jeweils 3 mL Leuko Spin Medium und 3 mL Lympho Spin Medium zur Zelltrennung übereinandergeschichtet. Auf diese Medien wurde jeweils 3 mL der Vollblutspende geschichtet und die beiden Röhrchen zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, 20 min, 756 g, Raumtemperatur). Die Anordnung der Zellfraktionen und Trennmedien entsprechend ihrer Dichte vor und nach erfolgter Zentrifugation ist in Abbildung 9 A und B schematisch dargestellt. An der Zentrifuge wurden eine langsame Beschleunigung sowie eine behutsame Verringerung der Drehzahl ausgewählt.

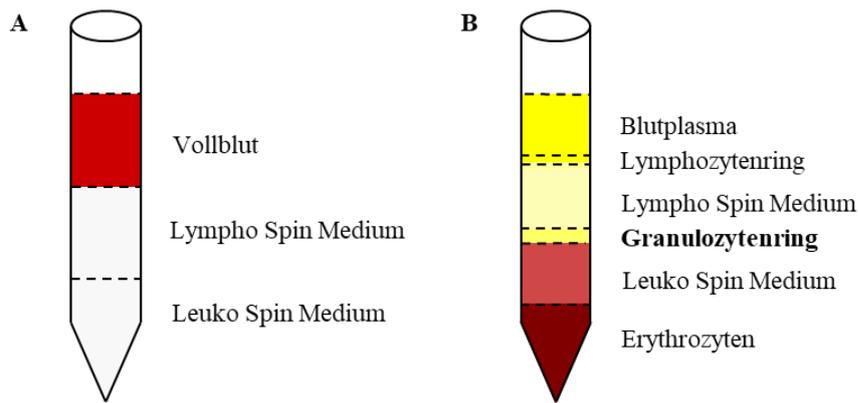


Abbildung 9: Fraktionen vor und nach Dichtegradientenzentrifugation zur Granulozytenisolation

(A) Schematische Darstellung der Fraktionen im Röhrcchen vor Zentrifugation. (B) Schematische Darstellung der Zellfraktionen, sowie der Trennmedien Lympho Spin und Leuko Spin nach Zentrifugation. Die Anordnung erfolgt nach der Dichte. Fett hervorgehoben im Bild ist die in natura dünne, leicht trübe Schicht mit den zu isolierenden Granulozyten (Granulozytenring).

Anschließend wurden das Blutplasma, der Lymphozytenring und der Großteil des Lympho Spins mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Aus jedem der beiden Zentrifugenröhrchen wurden 150 μL des Granulozytenrings abpipettiert und zu 700 μL RPMI + 10% FKS in ein Reaktionsgefäß (Σ 1000 μL) gegeben. Aus diesem wurde ein 10 μL Aliquot zur Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer unter dem Leica Mikroskop Typ 090-132.102, genommen. Die verbliebene Zellsuspension wurde währenddessen zentrifugiert (Micro Star 17 R, 5 min., 139 g, Raumtemperatur). Im Anschluss erfolgte die Einstellung der Granulozytenkonzentration auf 18×10^6 Zellen/mL.

2.2.4 Herstellung der Gelmatrix zur Einbettung der Granulozyten

Zur Beobachtung der Granulozyten in der μ -Slide Chemotaxis sind diese in eine Gelmatrix eingebettet, bestehend aus 150 μL bovinem Kollagen-I und 100 μL Zellkulturmedium. Es wurden zwei verschiedene Varianten einer Gelmatrix hergestellt, die sich hinsichtlich der darin enthaltenen Zellkulturmedien (A oder B) unterscheiden und für unterschiedliche Versuchsaufbauten genutzt wurden. Bei dem lediglich für Versuchsaufbau 3 verwendeten Zellkulturmedium B wurde der Bestandteil RPMI einer KAP-Behandlung (siehe 2.2.6) unterzogen und anschließend NaHCO_3 sowie FKS hinzugefügt. Zellkulturmedium A blieb unbehandelt. Die Kollagenkonzentration betrug jeweils 1,5 mg/mL. Die Zusammensetzung der Zellkulturmedien ist in Tabelle 4 aufgezeigt. Zusätzlich zum Kollagen und dem Zellkulturmedium wurde die Gelmatrix mit den Farbstoffen versetzt, die zur späteren Detektion bestimmter Stoffwechselwege im *Life-Cell-Imaging* nötig waren. Dies waren pro Ansatz der Gelmatrix: 5 μL DHR 123, 10 μL APC-AntiMPO und 3 μL DAPI. Schließlich wurden jedem

Ansatz 50 μL der Granulozytensuspension (siehe: 2.2.3) hinzugefügt und mit der Matrix vermischt.

Zellkulturmedium	Zusammensetzung	Gesamtvolumen	Versuchsaufbau
A	20 μL MEM 10x 10 μL NaHCO_3 50 μL RPMI ohne FKS 20 μL destilliertes Wasser	Σ 100 μL	1 und 2
B	10 μL NaHCO_3 90 μL RPMI + 10% FKS	Σ 100 μL	3

Tabelle 4: Zellkulturmedien für die Gelmatrix

Der Kanal zwischen den Reservoirs einer $\mu\text{-Slide}$ (siehe 2.2.5) wurde jeweils mit 6 μL dieser Zell-Matrix Suspension befüllt. Im Anschluss wurde das $\mu\text{-Slide}$ für 30 min. in den Inkubator gestellt (37 °C, 5 % CO_2). Im folgenden Schritt wurden die Reservoirs jeweils rechts und links des Kanals mit den Testsubstanzen befüllt.

2.2.5 $\mu\text{-Slide}$ Chemotaxis

Zum *Life-Cell-Imaging* erfolgte die Auftragung der Zellen auf ein $\mu\text{-Slide}$, wobei das $\mu\text{-Slide}$ *Chemotaxis* Verfahren der Firma ibidi® laut Herstellerangaben genutzt wurde. Die $\mu\text{-Slides}$ ermöglichen die zeitgleiche Beobachtung von drei verschiedenen Versuchsbedingungen, jeweils in voneinander abgetrennten Beobachtungseinheiten. Jede Einheit besteht aus einem zentralen Kanal, der mit seitlich davon gelegenen Reservoirs in direktem Kontakt steht (siehe folgende Abbildung 10).

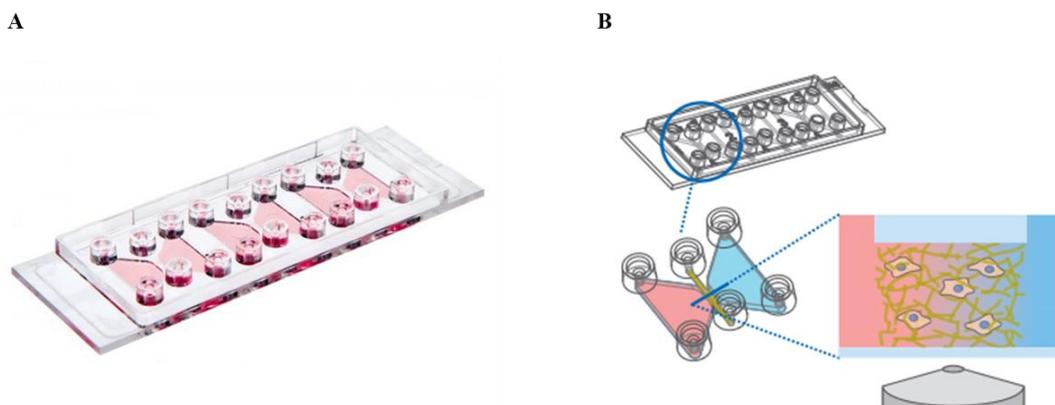


Abbildung 10: Darstellung der $\mu\text{-Slide}$ Chemotaxis, ibidi®

(A) Darstellung der $\mu\text{-Slide}$; Foto modifiziert nach Internetauftritt der Herstellerfirma
(B) Vergrößerte Darstellung einer Beobachtungseinheit; Abbildung modifiziert nach (42)

Das Fluoreszenzmikroskop wird jeweils auf den zentralen Kanal, der mit den Granulozyten in der Gelmatrix befüllt ist (s. Abschnitt 2.2.4) scharf gestellt. Die Reservoirs wurden mit dem zu testenden Zellkulturmedium gefüllt. Wie in Abbildung 10 B durch die in Richtung der Mitte diffundierenden Farben angedeutet, ermöglicht das μ -Slide Chemotaxis[®] eine Diffusion des Mediums aus den Reservoirs in den Kanal. Auf dem μ -Slide Chemotaxis[®] wurde die erste Einheit (links) als Negativkontrolle genutzt, wobei hier nur unbehandeltes Zellkulturmedium zum Einsatz kam. In der zweiten (mitte) und dritten (rechts) Einheit wurde jeweils der Effekt einer unterschiedlich langen (2 min. oder 5 min.) KAP-Behandlung des Zellkulturmediums untersucht. Eine Übersicht hierzu ist in Abbildung 11 dargestellt.

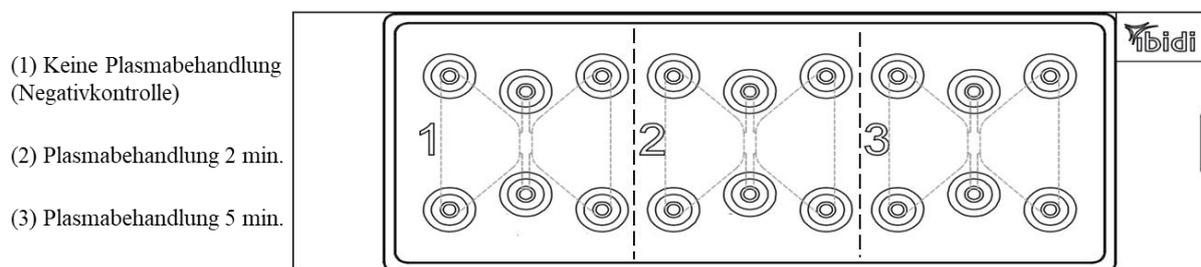


Abbildung 11: Aufbau der Beobachtungseinheiten der μ -Slide Chemotaxis, modifiziert nach (42)

Im Anschluss an die Befüllung des Kanals und der Reservoirs erfolgte das *Life-Cell-Imaging*.

2.2.6 KAP-Behandlung des Zellkulturmediums

Zur KAP-Behandlung wurden 2 mL Zellkulturmedium (RPMI + 10% FKS) steril in eine Zellkulturschale (\varnothing 3,5 cm) überführt. Je nach Versuchsbedingung wurde dieses Medium der Plasmaquelle für 2 min. oder 5 min. ausgesetzt. Während der Behandlungsdauer wurde das Medium durch einen Magnetrührer bei 100 rpm in Bewegung gehalten. Der Abstand zwischen Plasmaquelle und Mediumoberfläche war durch die Verwendung eines Abstandhalters stets 2 cm. Im Folgenden wird Zellkulturmedium, welches zuvor auf diese Weise behandelt wurde, allgemein als PTS bezeichnet. PTS2' meint eine Behandlungsdauer von 2 Minuten - PTS5' dementsprechend 5 Minuten. PTS0' steht für unbehandeltes Zellkulturmedium. Die Plasmaquelle plasma care[®] erlaubt zwei verschiedene Modi betreffend die Frequenz. Bei den Experimenten zu dieser Arbeit wurde stets der 4 kHz- Modus verwendet.

2.2.7 Life-Cell-Imaging

Es wurden Granulozyten über einen Zeitraum von circa 7 Stunden unter einem Leica-Mikroskop DMi8 mit Verwendung der dazugehörigen Softwareplattform Leica Application Suite X unter 100-facher Vergrößerung beobachtet. Die Bilder wurden mit einer Leica DFC9000 GT Kamera und der Lichtquelle CoolLED pE4000 angefertigt. Zur Dokumentation

der Granulozytenaktivität wurden über einen Zeitraum von 6 Stunden und 40 Minuten mit einer Frequenz von jeweils 4 Aufnahmen je Kanal und je 30 Sekunden gemacht. Eine Aufnahme davon erfolgte im Phasenkontrastmodus und drei weitere als Fluoreszenzbilder. Zur Fluoreszenzanregung und zur Beschränkung der Emission wurden zwei verschiedene Filterwürfel mit Eingangs- und Ausgangsfiltern benutzt: (1) DAPI/FI für die Farbstoffe DAPI und Rhodamine 123 und (2) LED QUAD für den Farbstoff APC. Eine Übersicht zu den Eigenschaften der Lichtquelle zur Exzitation, der Filterwürfel und der Fluoreszenzfarbstoffe, sind in Tabelle 5 dargestellt.

	DAPI	Rhodamine 123	APC
ermittelter Effekt	NETose	ROS-Produktion	MPO-Freisetzung
λ der Cool LED4000 [nm]	385	490	635
Eingangsbereich [nm]	380-410	472-498	615-635
(optimale Anregungswellenlänge)	(359)	(510)	(650)
Optimum der Emission [nm]	461	532	660
Ausgangsfilter [nm]	424-460	505-545	> 650

Tabelle 5: Überblick über die Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe und Parameter zur Fluoreszenzmessung

Bei Zunahme der Fluoreszenz über einen definierten Schwellenwert, der manuell bei jedem Versuch eingestellt werden muss, wird von dem Programm IMARIS® ein *Event* (z.B. eine Zelle) als fluoreszierende Fläche registriert und deren Fläche bestimmt. Die berechneten Flächen erkannter Zellen wurden in Microsoft Excel® exportiert und zu einer Gesamtfläche an fluoreszierenden Zellen aufsummiert. Die statistische Auswertung erfolgt mit IBM SPSS®. Während der Beobachtungszeit lagert das μ -Slide auf dem Objektisch im Inkubator (37 °C, 5% CO₂-Gehalt, relative Luftfeuchtigkeit 50 %). Die Auswertung der Bildaufnahmen wird im folgenden Abschnitt erklärt.

2.2.8 Quantifizierung der Parameter

Um den *respiratory burst* zu beschreiben wurde der Zeitpunkt der maximalen Ausprägung der ROS-Produktion ($T_{\max\text{ROS}}$) herangezogen. Dieser wurde berechnet, indem durch Microsoft Excel® eine Trendlinie als Polynom dritter Ordnung (in der folgenden Abbildung blau gepunktet) durch die höchsten Flächensummen (rot gepunktet) gelegt wurde und die Formel des Polynoms angezeigt wurde. Ein Zoom auf den relevanten Zeitraum um den Zeitpunkt mit der höchsten Flächensumme herum und die von Excel® eingefügte Polynomfunktion dritter Ordnung ist in Abbildung 12 gezeigt.

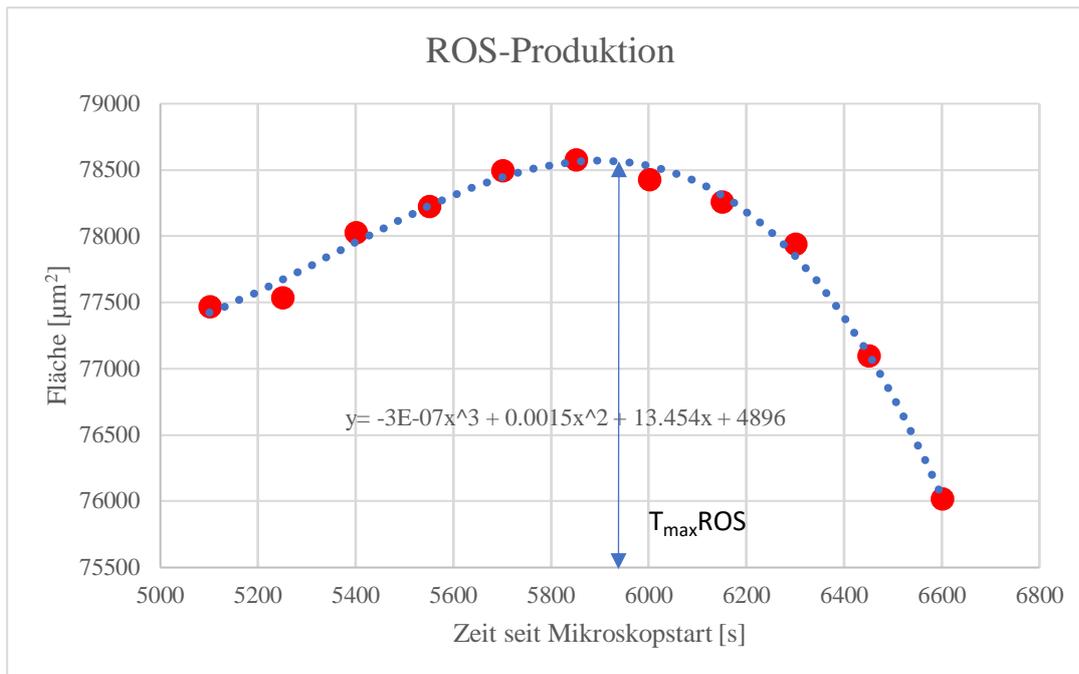


Abbildung 12: Beispiel einer Polynomfunktion dritter Ordnung zur Ermittlung von $T_{\max ROS}$

Die erste Ableitung dieser Polynomfunktion 3. Ordnung wurde berechnet und daraufhin die Nullstelle der ersten Ableitung. Bei diesem Wert steigt die Trendlinie nicht weiter an und gibt den Höhepunkt ($T_{\max ROS}$ an diesem Beispiel bei 5876s) an. Zur Darstellung der Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit wird zur Angabe des $T_{\max ROS}$ noch die Zeit addiert, die vom ersten Kontakt der PMN mit der Kollagenmatrix bis zum Beginn der Beobachtungszeit unter dem Mikroskop vergangen ist.

Um das Auftreten der NETose zu quantifizieren, wurde jeweils der Zeitpunkt errechnet, an dem die Hälfte der maximalen DAPI- Färbung erreicht wurde ($ET_{50 NETose}$). In Abbildung 13 für einen Versuch exemplarisch dargestellt bei 13398 Sekunden nach Beginn des Beobachtungszeitraums. Diese Berechnung erfolgte durch das Computerprogramm *Phoenix* unter Verwendung der folgenden Formel:

$$E = E_0 \cdot \frac{E_{max} \cdot T^\gamma}{ET_{50}^\gamma + T^\gamma}$$

[E: ermittelter Wert des Effekts; E_0 : initiale Effekthöhe; E_{max} : maximale Effekthöhe; T: Zeit; γ = Steilheit der Effektänderung (Hill Faktor); ET_{50} = Zeitpunkt des halbmaximalen Effekts]

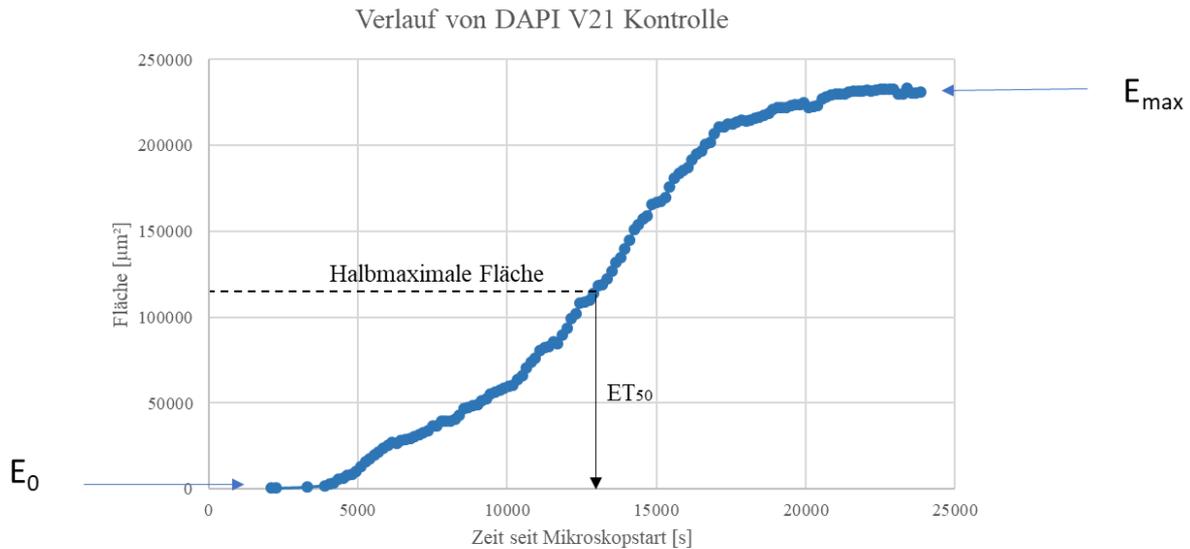


Abbildung 13: Exemplarischer Verlauf der NETose

Ganz ähnlich dazu verläuft typischerweise die Freisetzung von MPO ebenfalls sigmoidal, weshalb dieser Parameter als $ET_{50}MPO$ angegeben wird.

Bei der Darstellung der Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit wird bei allen Zeitangaben noch die Zeit addiert, die vom ersten Kontakt der PMN mit der Kollagenmatrix bis zum Beginn der Beobachtungszeit unter dem Mikroskop vergangen ist. Zur Quantifizierung des Migrationsverhaltens der PMN wurden diese im Phasenkontrast aufgenommen und in IMARIS[®] dargestellt. Wird eine Zelle vom Programm erkannt, wird sie mit einem *spot* markiert und die Migration des *spots* wird von IMARIS[®] aufgezeichnet. Es werden nur PMN verfolgt, die länger als 900 Sekunden beobachtet werden können und eine track length von über 25 μm aufweisen. Dies geschieht, um Artefakte durch nur zufällig kurz in die Bildebene gerückte Zellen auszuschließen. Bei der statistischen Auswertung in SPSS[®] wurden die 50 Zellen einer Beobachtungseinheit ausgewertet, die während des Beobachtungszeitraums am weitesten gewandert sind. Messwerte der Migration sind: *track length* (tatsächlich zurückgelegte Wegstrecke zwischen Start- und Endpunkt), *track displacement length* (kürzeste Verbindung zwischen Start- und Endpunkt) *track displacement x* (Strecke in x- Richtung), *track*

displacement y (Strecke in y- Richtung) und *track straightness*. Dabei ist die x-Richtung jeweils nach links des Kanals liegend festgelegt. Die *track straightness* als Maß für die Zielstrebigkeit der Zelle in eine gewisse Richtung zu migrieren, definiert sich aus dem Verhältnis der *track displacement length* zur *track length*. Eine graphische Erläuterung dieser Kriterien ist in Abbildung 14 dargestellt.

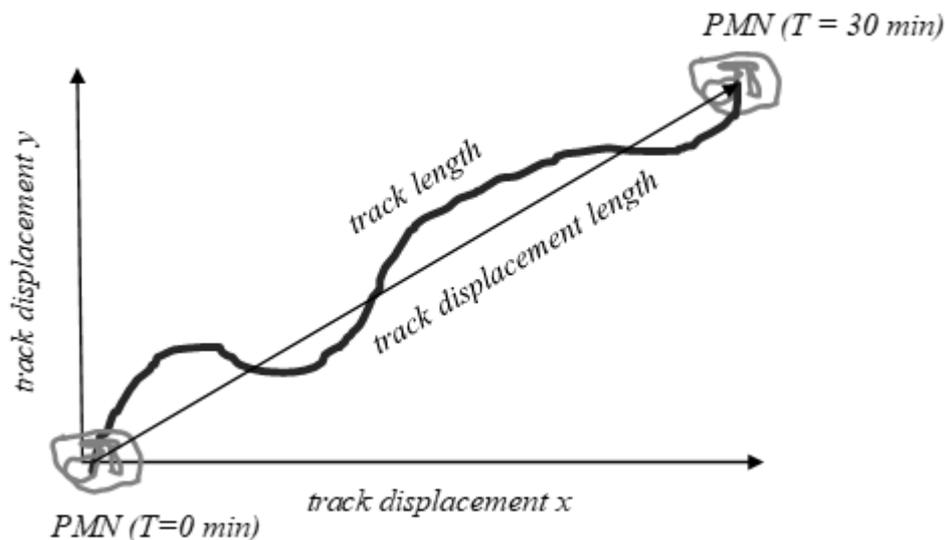


Abbildung 14: Parameter der Migration

Die Migrationsdaten wurden in eine Excel[®]-Datei überführt und in SPSS[®] statistisch und graphisch aufbereitet. Die Migrationsdaten wurden dazu in verschiedene Zeitrahmen von jeweils einer halben Stunde Dauer unterteilt. Typischerweise ergibt sich in der Kontrollgruppe eine Migration der PMN zum Lockstoff fMLP hin.

2.2.9 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit der Analysesoftware IBM SPSS[®] durchgeführt. Als erster Schritt wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf eine Normalverteilung der Werte geprüft. Bei Normalverteilung wurden die zu vergleichenden Gruppen mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse getestet, wenn es mehr als 2 Gruppen waren. Als post-hoc Test wurde bei Varianzhomogenität nach Bonferroni vorgegangen ansonsten mit dem Dunnett-T3 Test. In den Abbildungen wurden bei normalverteilten Werten die Mittelwerte als Balkendiagramm angegeben. Die Fehlerbalken bezeichnen das 95 %- Konfidenzintervall (CI). Werte, die nicht normalverteilt sind, werden als Boxplots dargestellt. Innerhalb der Box liegen 50 % der Messwerte. Der Median ist mit einem schwarzen horizontalen Strich markiert. Die *whisker* definieren das erste beziehungsweise dritte Quartil. Die darüber und darunter liegenden

Kreise und Sternchen markieren Ausreißer bzw. Extremwerte. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gilt als statistisch signifikant.

2.2.10 Beschreibung der verwendeten Versuchsbedingungen

Die μ -Slides wurden in drei verschiedenen Versuchsaufbauten auf verschiedene Weise befüllt. Die links gelegene *Beobachtungseinheit* (siehe 2.2.5) diente jeweils als Negativkontrolle ohne KAP-Behandlung. Für eine Aktivierung der Granulozyten in der Kontrolle sorgte der Lockstoff fMLP mit einer Konzentration von 10 nM im Zellkulturmedium. Im ersten Versuchsaufbau (Tabelle 6) wurden jeweils nur die links des Beobachtungskanals gelegenen Reservoirs der mittleren und rechten Beobachtungseinheit mit zuvor plasmabehandeltem Zellkulturmedium befüllt. Mit Versuchsaufbau 2 (Tabelle 7) wurde in beide Reservoirs eines Kanals KAP-behandeltes Zellkulturmedium gegeben. Die Reservoirs links des Kanals enthalten alle zusätzlich 10 nM fMLP. Bei Versuchsaufbau 3 unterscheidet sich die Befüllung der Reservoirs nicht von Versuchsaufbau 2. Der Unterschied besteht darin, dass die Granulozyten schon während der Inkubation mit KAP-behandeltem Zellkulturmedium in Kontakt gebracht werden. Dies geschieht, indem das Zellkulturmedium als Bestandteil der Kollagenmatrix (siehe Abschnitt 2.2.4) einer Plasmabehandlung unterzogen wurde. fMLP kam dabei erst nach der KAP-Behandlung in die Reservoirs. fMLP war keiner KAP-Behandlung ausgesetzt. Folgend ist in Tabelle 6 und Tabelle 7 schematisch die Befüllungen der μ -Slide *Chemotaxis* in den verschiedenen Versuchsaufbauten gezeigt.

Befüllung Reservoirs	Kontrolle		Mitte		Rechts	
10 nM fMLP	+	-	-	-	-	-
65 μ L RPMI + 10 % FKS	+	+	+	+	+	+
Plasmabehandlung	-	-	PTS2'	-	PTS5'	-

Tabelle 6: Versuchsaufbau 1

Befüllung Reservoirs	Kontrolle		Mitte		Rechts	
10 nM fMLP	+	-	+	-	+	-
65 μ L RPMI + 10 % FKS	+	+	+	+	+	+
Plasmabehandlung	-	-	PTS2'	PTS2'	PTS5'	PTS5'

Tabelle 7: Versuchsaufbau 2

In der Kontrolle ist im Reservoir links des Beobachtungskanals der Lockstoff fMLP zugesetzt. Dieser wird in den beiden anderen Beobachtungseinheiten durch unterschiedlich lang mit KAP behandeltem Zellkulturmedium ersetzt.

3 Ergebnisse

Insgesamt standen 33 gesunde Versuchspersonen im Alter von 22 bis 55 Jahren (Median: 26 Jahre) für die venöse Blutentnahme zur Granulozytenisolation zur Verfügung. Die folgenden Unterkapitel geben einen Überblick über die Resultate der Versuche hinsichtlich der Migration, der ROS-Produktion und der NETose.

3.1 Ergebnisse aus Versuchsaufbau 1

Die Resultate aus den verschiedenen Experimenten mit Versuchsaufbau 1 (n=16) werden hier dargestellt.

3.1.1 Ergebnisse der Migration

Die Fähigkeit zur Migration ist typischerweise während der ersten halben Stunde am stärksten ausgeprägt und nimmt in den darauffolgenden Zeiträumen sukzessive ab. In Abbildung 15 ist

die *track length* der PMN unter Versuchsaufbau 1 mit MicroPlaSter® als Plasmaquelle aufgetragen.

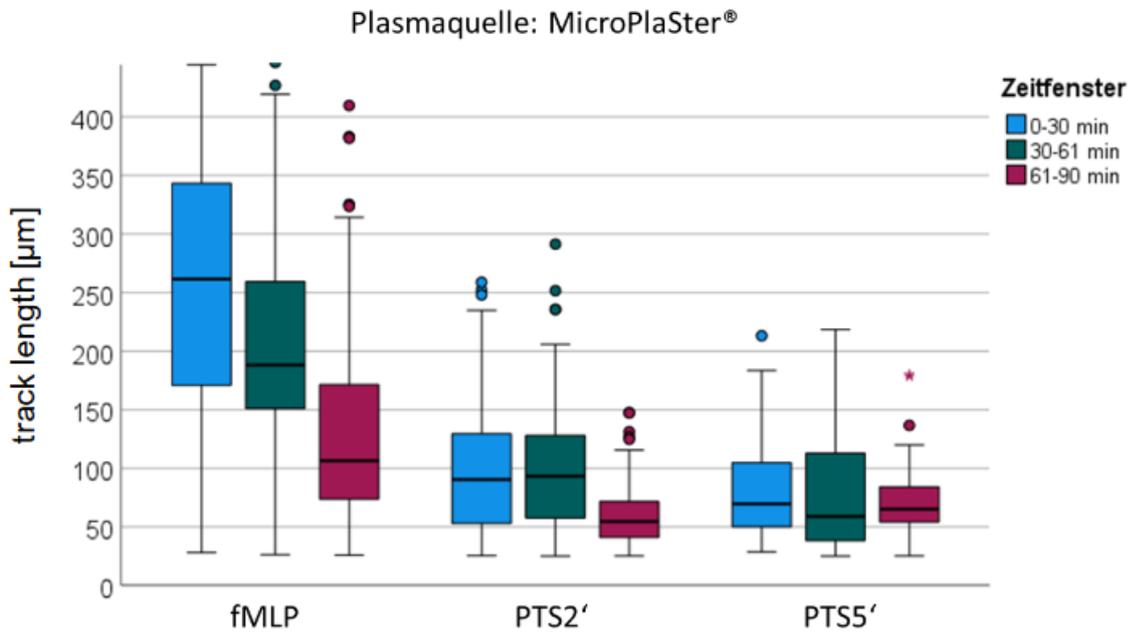


Abbildung 15: Track length bei Versuchsaufbau 1, Plasmaquelle: MicroPlaSter®. „fMLP“ $\hat{=}$ Kontrollgruppe

In der folgenden Tabelle 8 sind die gerundeten Medianwerte und Standardabweichungen (jeweils in μm) aus Abbildung 15 angegeben. Die letzte Zeile in dieser Tabelle (insgesamt $[\mu\text{m}]$) beschreibt die mediane zurückgelegte Strecke pro 30 Minuten bei gemeinsamer Betrachtung der ersten drei halben Stunden der Beobachtungszeit.

Zeitfenster	fMLP	PTS 2'	PTS 5'
erste halbe Stunde [μm]	262 \pm 127	90 \pm 52	70 \pm 37
zweite halbe Stunde [μm]	188 \pm 97	93 \pm 48	58 \pm 49
dritte halbe Stunde [μm]	106 \pm 80	55 \pm 25	65 \pm 29
insgesamt [μm]	186 \pm 115	75 \pm 50	67 \pm 41

Tabelle 8: Track length bei Versuchsaufbau 1, Plasmaquelle: MicroPlaSter®

In folgender Abbildung 16 sind die entsprechenden Ergebnisse mit dem plasma care® als Plasmaquelle dargestellt.

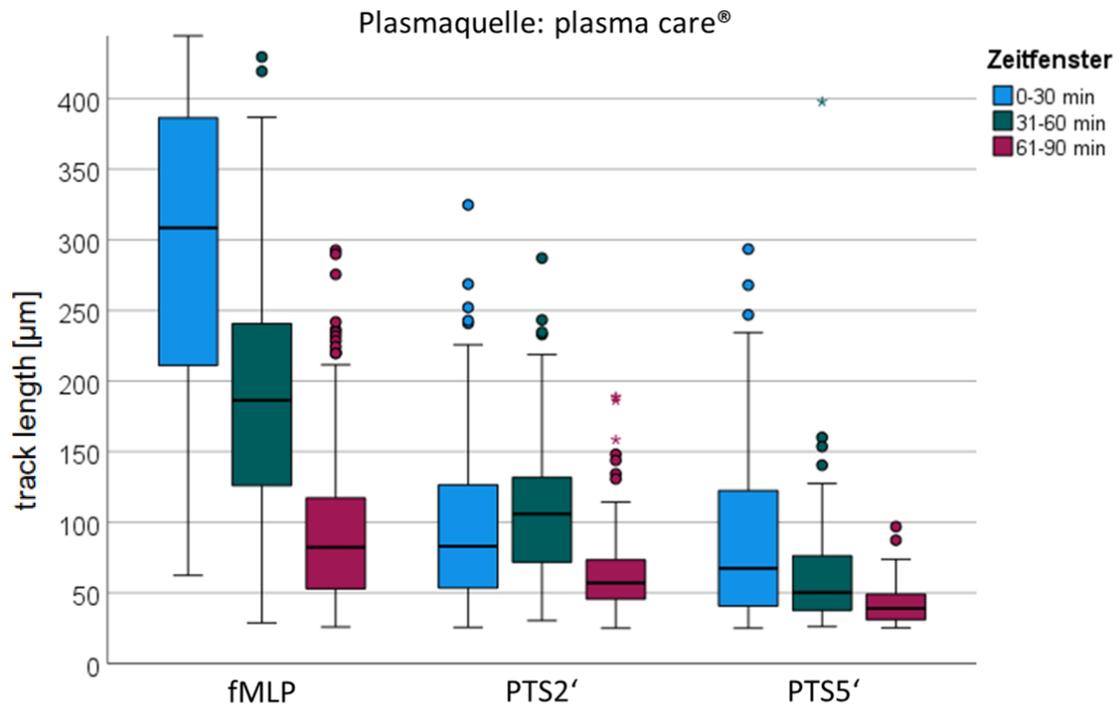


Abbildung 16: Track length bei Versuchsaufbau 1, Plasmaquelle: plasma care®, „fMLP“ $\hat{=}$ Kontrollgruppe

Die Ergebnisse aus Abbildung 16 mit Medianen und der dazugehörigen Standardabweichung sind in folgender Tabelle 9 zusammengefasst.

Zeitfenster	fMLP	PTS2'	PTS5'
erste halbe Stunde [μm]	309 \pm 127	83 \pm 51	67 \pm 54
zweite halbe Stunde [μm]	186 \pm 86	106 \pm 44	50 \pm 50
dritte halbe Stunde [μm]	82 \pm 55	57 \pm 28	39 \pm 14
Insgesamt [μm]	177 \pm 127	78 \pm 46	52 \pm 51

Tabelle 9: Track length bei Versuchsaufbau 1, Plasmaquelle: plasma care®

Man erkennt, dass die PMN unter dem Einfluss von PTS bei beiden Plasmaquellen eine geringere Wegstrecke zurücklegen, als sie es unter dem Einfluss von fMLP vermögen.

Die Messung der Strecken, die die Zellen in Richtung des fMLP-Gradienten zurücklegten, ergab bei den Versuchen mit MicroPlaSter® folgendes, in Abbildung 17 gezeigtes Resultat:

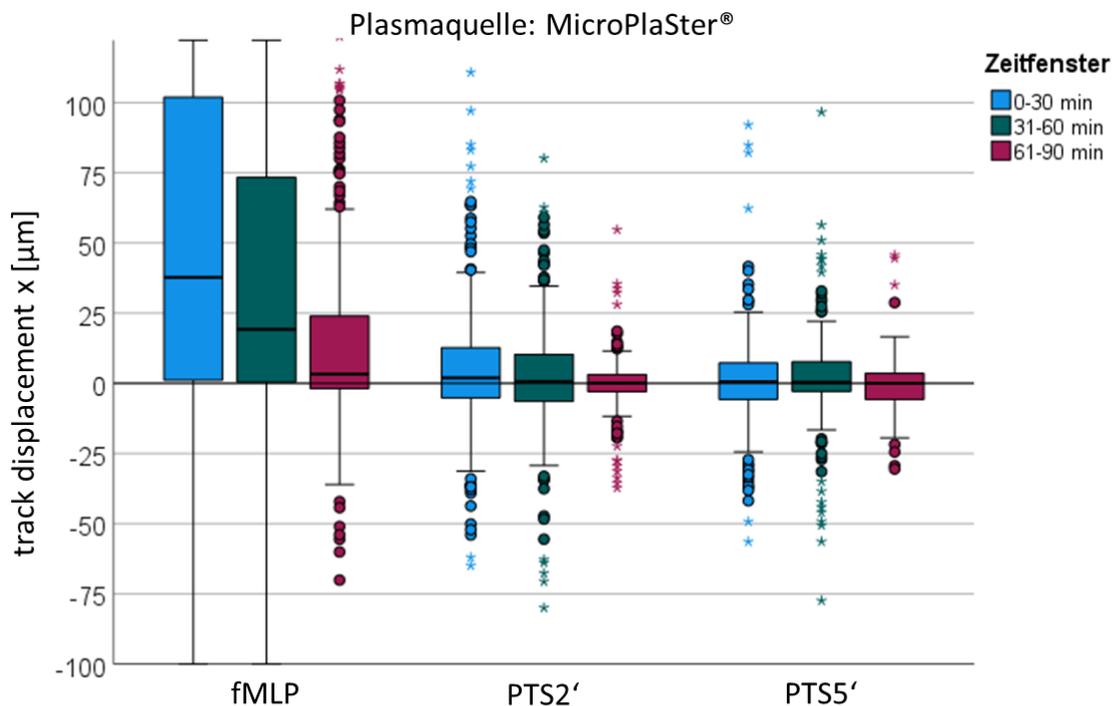


Abbildung 17: Track displacement x bei Versuchsaufbau 1, Plasmaquelle: MicroPlaSter®, „fMLP“ \triangleq Kontrollgruppe

In der ersten halben Stunde wird eine Strecke von im Median 38 μm (SD: 82 μm) in Richtung fMLP zurückgelegt. In Richtung der PTS2' wandern die PMN in der ersten halben Stunde im Median 2 μm (SD: 25 μm), in Richtung der PTS5' im Median 1 μm (SD: 19 μm). Bei plasma care[®] ergibt sich folgende, in Abbildung 18 gezeigte Migration in x-Richtung:

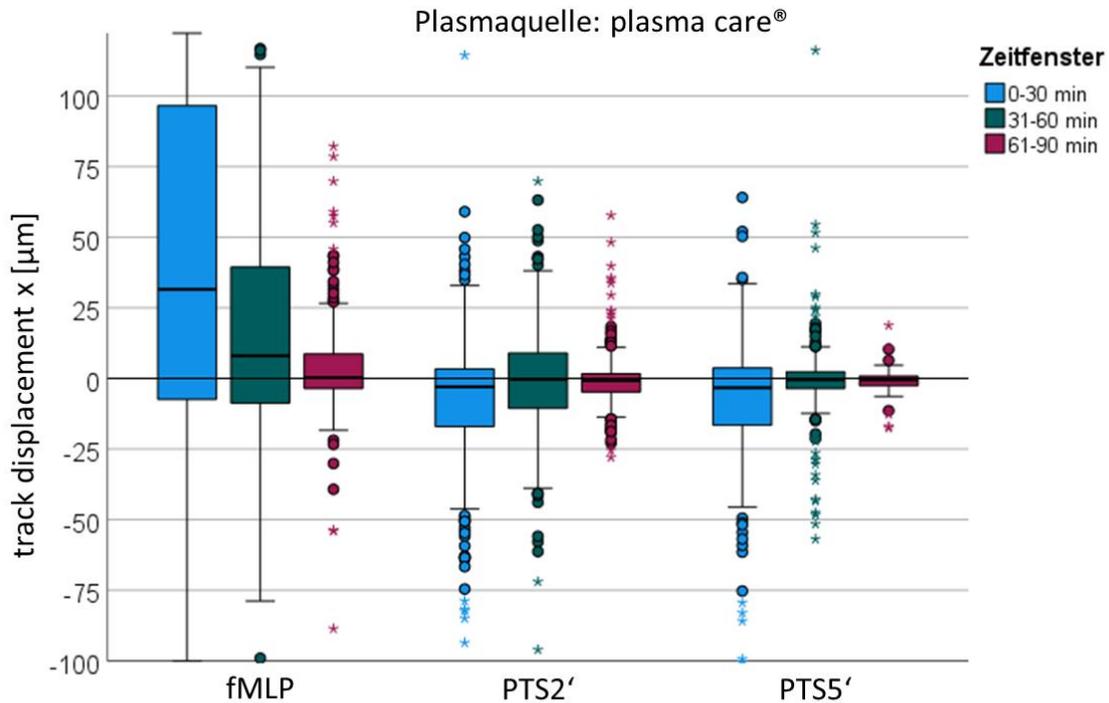


Abbildung 18: Track displacement x bei Versuchsaufbau 1, Plasmaquelle: plasma care[®], „fMLP“ $\hat{=}$ Kontrollgruppe

Es zeigt sich, dass die eingeschlossenen PMN in der ersten halben Stunde eine Strecke von im Median 32 μm (SD: 117 μm) in x-Richtung zurücklegen. In der folgenden halben Stunde verringert sich die Migration stark auf 8 μm (SD: 53 μm) bevor sie zum Stillstand kommt. Unter dem Einfluss von PTS stehend fehlt die Migration in x-Richtung. Es kommt zu einer statistisch nicht relevanten Bewegung der PMN in Richtung $-x$ von weniger als 3 μm (SD: 30 μm).

In der ersten halben Stunde zeigt sich eine *track straightness* von 0,32 und 0,34 in den beiden unbehandelten Kontrollgruppen mit fMLP links des Beobachtungskanals. Unter Einfluss von PTS, welches mit dem MicroPlaSter[®] behandelt wurde ist die Zielgerichtetheit in den ersten 30 min nach Beobachtungsbeginn mit 0,17 (PTS2') und 0,19 (PTS5') geringer. Unter plasma care[®] ergibt sich eine *track straightness* von 0,22 (PTS2') beziehungsweise 0,25 (PTS5'). Die Zielgerichtetheit ist in folgenden Abbildung 19 und Abbildung 20 dargestellt.

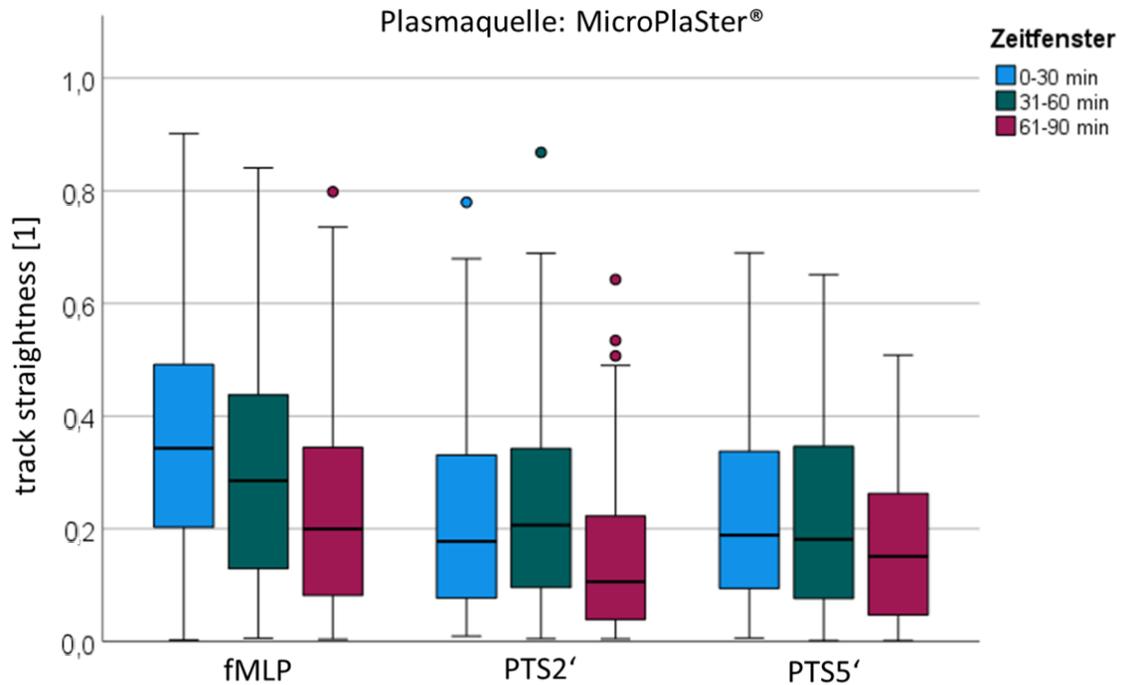


Abbildung 19: Track straightness bei Versuchsaufbau 1, Plasmaquelle: MicroPlaSter®, „fMLP“ $\hat{=}$ Kontrollgruppe

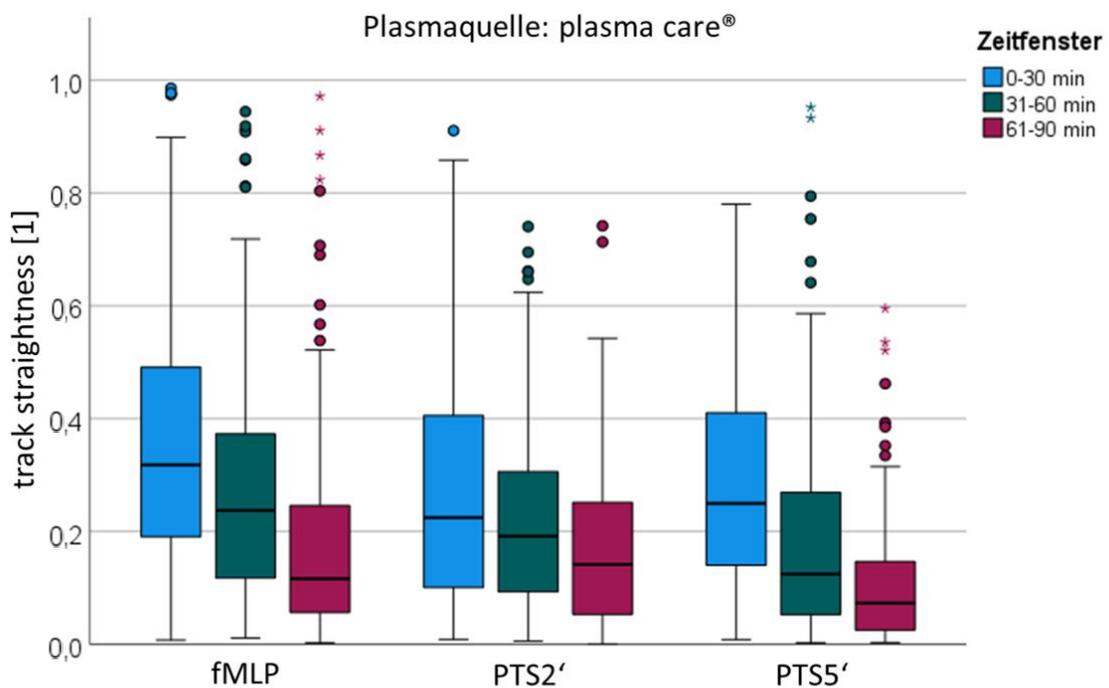


Abbildung 20: Track straightness bei Versuchsaufbau 1, Plasmaquelle: plasma care®, „fMLP“ $\hat{=}$ Kontrollgruppe

Außerdem wurde die Migration in y-Richtung analysiert. Dabei zeigt sich im Median nie eine Migration von mehr als 2,5 μm innerhalb einer halben Stunde.

3.1.2 Ergebnisse der ROS-Produktion

Bei der Auswertung des Zeitpunkts der maximalen ROS-Produktion wurde stets der Zeitpunkt des ersten Kontakts der PMN mit ihrer umgebenden Gelmatrix als Nullpunkt der Zeitachse herangezogen (siehe 2.2.4). Die Zeitpunkte der maximalen ROS-Produktion bei beiden verwendeten Plasmaquellen unter Versuchsaufbau 1 stellen sich wie in Abbildung 21 gezeigt dar:

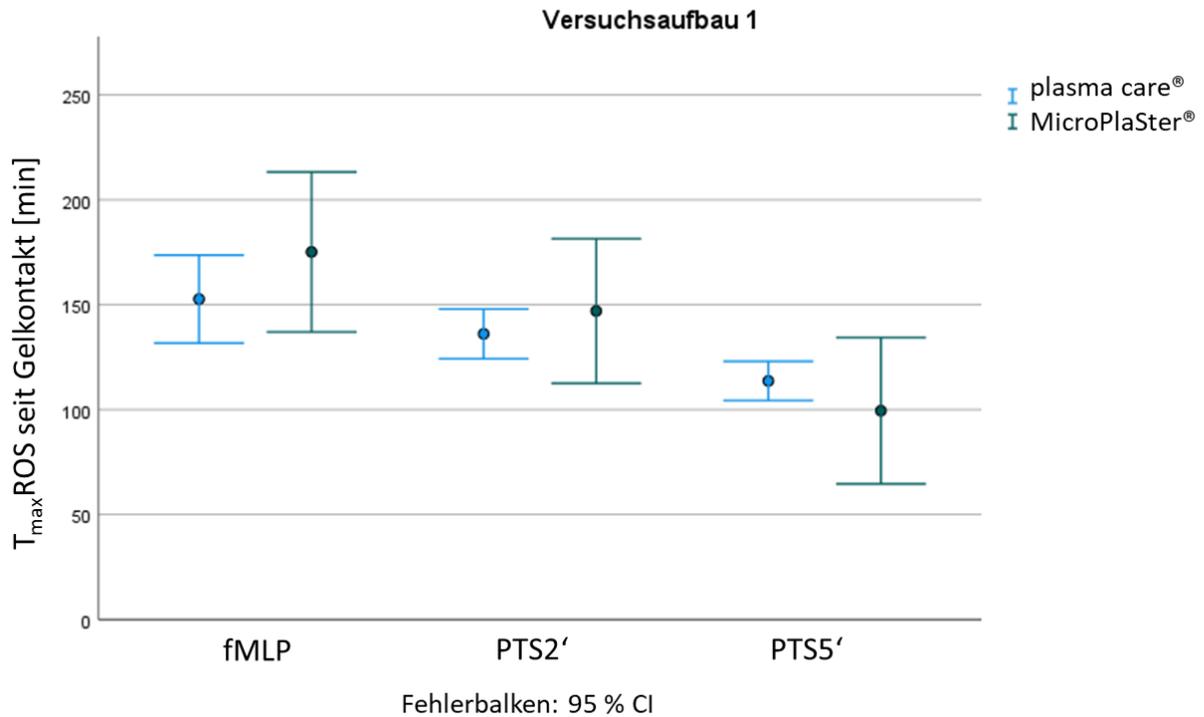


Abbildung 21: $T_{\max}ROS$ bei Versuchsaufbau 1, beide Plasmaquellen, „fMLP“ \triangleq Kontrollgruppe

Die mittleren $T_{\max}ROS$ Werte aus Abbildung 21 sind inklusive der Standardabweichung als Zahlenwerte in Tabelle 10 dargestellt.

Bedingungen	Kontrolle mit fMLP	PTS2'	PTS5'
Plasmaquelle			
plasma care® $T_{\max}ROS$ [min]	153 ± 25	136 ± 13	113 ± 11
MicroPlaSter® $T_{\max}ROS$ [min]	175 ± 45	147 ± 37	99 ± 37

Tabelle 10: Mittelwerte von $T_{\max}ROS$ [min] bei Versuchsaufbau 1, beide Plasmaquellen

Es fällt auf, dass sich die Zeitpunkte der maximalen ROS-Produktion zwischen den beiden unbehandelten Kontrollgruppen, mit denen identisch verfahren wurde tendenziell unterscheiden. Um interindividuelle Unterschiede zwischen den Versuchstagen und Donoren zu eliminieren, erfolgt eine Normierung des $T_{\max}ROS$ der behandelten Beobachtungseinheiten

in Bezug auf ihre jeweilige Kontrolle in der linken Beobachtungseinheit. Dadurch ergeben sich die in Abbildung 22 gezeigte Ergebnisse:

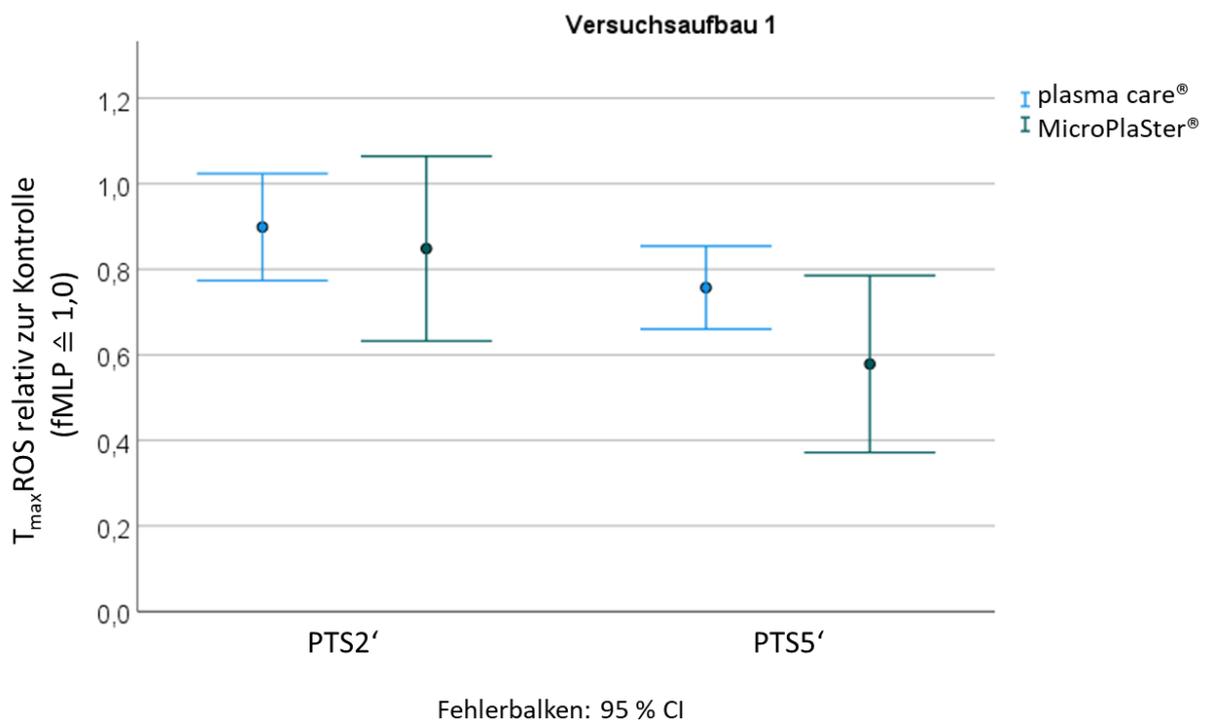


Abbildung 22: T_{max}ROS relativ zur Kontrolle, Versuchsaufbau 1, beide Plasmaquellen

Mit dem Post-Hoc Test Bonferroni ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und 5 min KAP-Behandlung (bei beiden Plasmaquellen: $p < 0,001$). Ebenso zwischen 2 min und 5 min Behandlungsdauer (MicroPlaSter[®] 0,036; plasma care[®] $p = 0,041$). Nicht signifikant zeigen sich die Unterschiede zwischen der Kontrolle und PTS 2' (MicroPlaSter[®] $p = 0,372$; plasma care[®] $p = 0,202$). Tabellarisch die Mittelwerte mit Standardabweichung relativ zur Kontrolle:

Bedingungen	Kontrolle mit fMLP	PTS2'	PTS5'
plasma care [®] rel. T _{max} ROS [%]	100	90 ± 14	76 ± 12
MicroPlaSter [®] rel. T _{max} ROS [%]	100	85 ± 23	58 ± 22

Tabelle 11: Relation der T_{max}ROS unter Versuchsaufbau 1, beide Plasmaquellen

3.1.3 Ergebnisse der MPO-Freisetzung

In folgendem Diagramm sind die ET_{50MPO} [min] in Abhängigkeit von PTS, beziehungsweise mit fMLP als Kontrolle gezeigt.

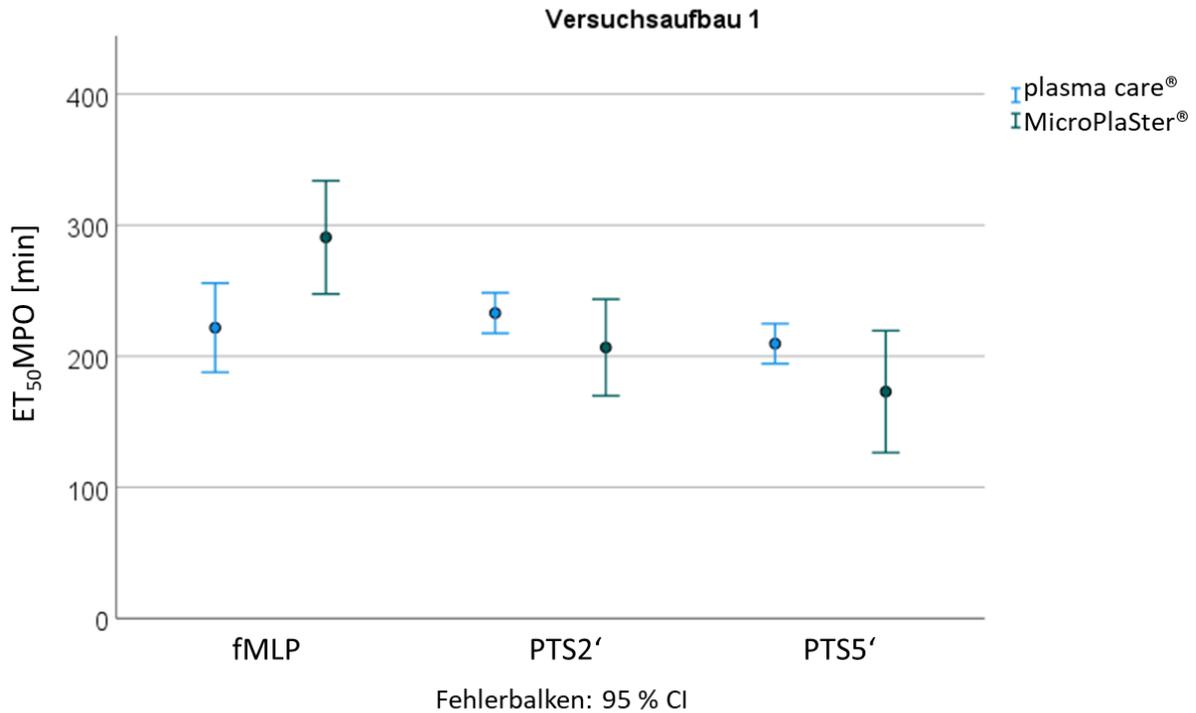


Abbildung 23: ET_{50MPO} bei Versuchsaufbau 1

Die Mittelwerte mit einer Standardabweichung aus Abbildung 23 sind auf ganze Minuten gerundet in folgender Tabelle 12 angegeben.

Bedingungen	Kontrolle mit fMLP	PTS2'	PTS5'
Plasmaquelle			
plasma care® ET_{50MPO} [min]	222 ± 41	233 ± 17	210 ± 18
MicroPlaSter® ET_{50MPO} [min]	291 ± 47	207 ± 40	173 ± 50

Tabelle 12: Mittelwerte von ET_{50MPO} bei Versuchsaufbau 1

Diese Zeitangaben sind in folgender Abbildung 24 in Relation zu ihrer Kontrollgruppe dargestellt:

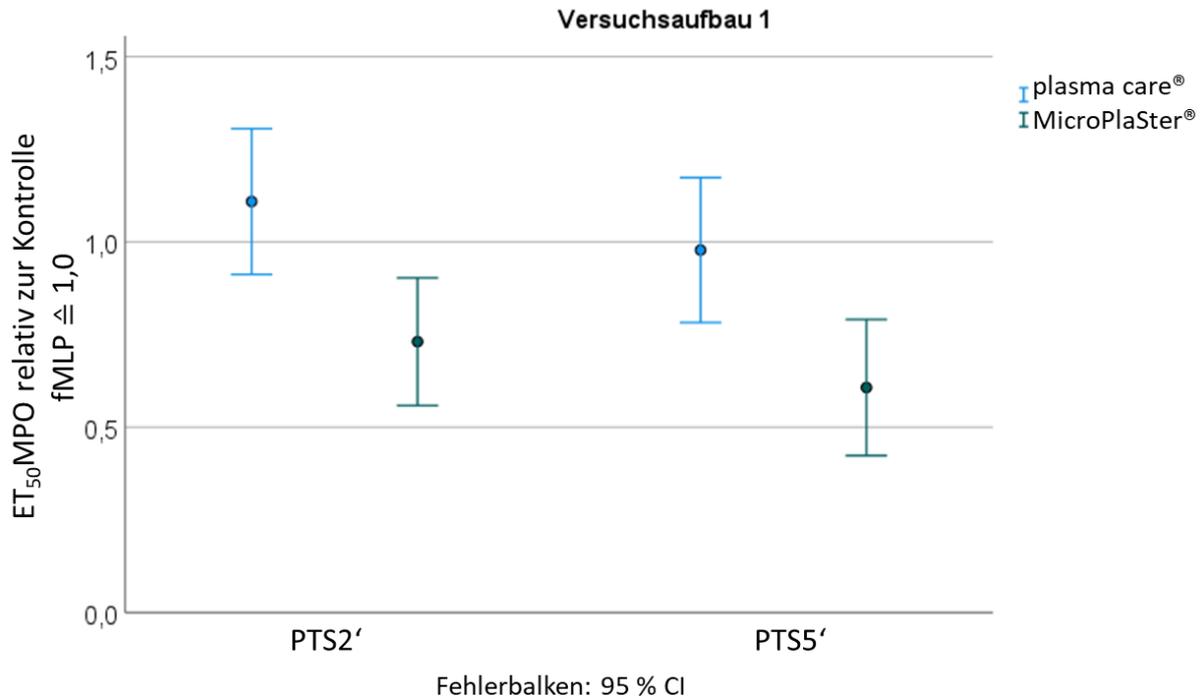


Abbildung 24: ET₅₀MPO relativ zur Kontrolle unter Versuchsaufbau 1

In folgender Tabelle 13 sind diese Ergebnisse in Relation zur Kontrolle mit fMLP aufgeführt:

Plasmaquelle	Bedingungen	Kontrolle	PTS2'	PTS5'
		mit fMLP		
plasma care® rel. ET ₅₀ MPO [%]		100	111 ± 21	98 ± 23
MicroPlaSter® rel. ET ₅₀ MPO [%]		100	73 ± 19	61 ± 20

Tabelle 13: ET₅₀MPO relativ zur Kontrolle, Versuchsaufbau 1

Der Zeitpunkt der ET₅₀MPO unterscheidet sich bei den Versuchen mit plasma care® nicht voneinander. Bei Behandlung der PTS mit MicroPlaSter® allerdings zeigt sich ein Effekt der PTS. ET₅₀MPO unterscheidet sich signifikant zwischen der Kontrolle mit fMLP und PTS5' (p<0,001), sowohl bei der Zeitangabe in min als auch nach Normierung auf die Kontrollgruppe. Der Unterschied zwischen der Kontrolle und PTS2' erreicht ein Signifikanzniveau von p=0,009. Nicht voneinander zu unterscheiden sind die Ergebnisse zwischen PTS2' und PTS5' (p=0,556).

3.1.4 Ergebnisse der NETose

In nachstehender Abbildung 25 sind die Ergebnisse zum Auftreten von ET₅₀NETose gezeigt.

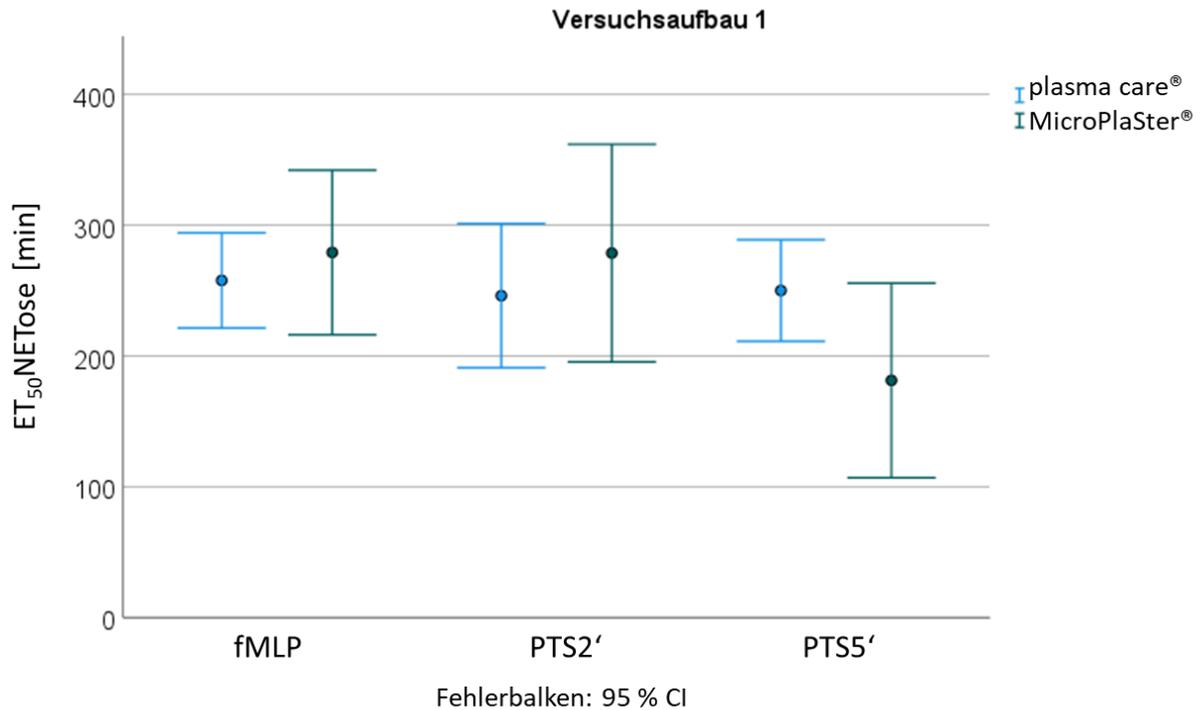


Abbildung 25: ET₅₀NETose bei Versuchsaufbau 1, beide Plasmaquellen, „fMLP“ ≙ Kontrollgruppe

Bedingungen	Kontrolle mit fMLP	PTS2'	PTS5'
plasma care® ET ₅₀ NETose [min]	258 ± 43	246 ± 60	250 ± 46
MicroPlaSter® ET ₅₀ NETose [min]	279 ± 60	279 ± 90	177 ± 75

Tabelle 14: ET₅₀NETose [min], Mittelwerte mit Standardabweichung, Versuchsaufbau 1, beide Plasmaquellen

Bei plasma care® unterscheidet sich das Auftreten der NETose in den einzelnen Gruppen nicht voneinander. Bei MicroPlaSter® unterscheiden sich die Werte nur tendenziell. Allerdings stellte sich dieser Unterschied als nicht signifikant heraus (Signifikanzniveau zwischen Kontrolle und PTS5': 0,074, zwischen PTS2' und PTS5': 0,061). Ein größerer Unterschied lässt sich wiederum darstellen, wenn die normierten Werte in Relation zum jeweils unbehandelten Kontrollwert eines Versuchs gesetzt werden (Abbildung 26).

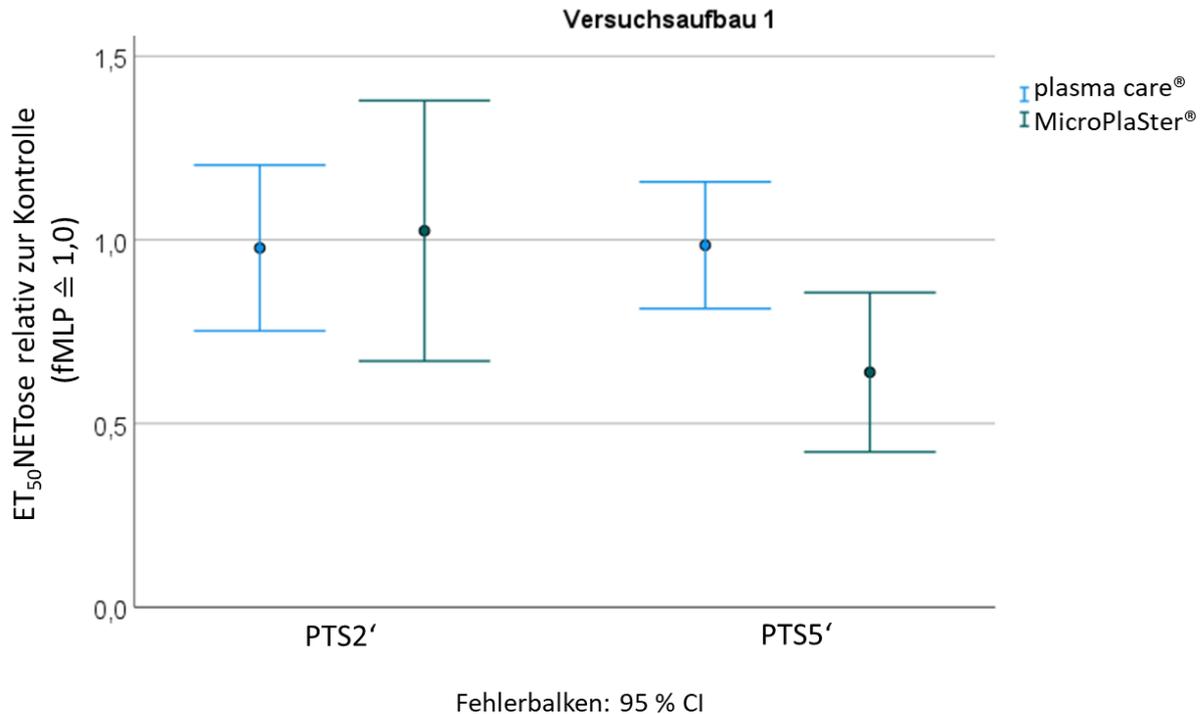


Abbildung 26: ET₅₀NETose relativ zur Kontrolle mit fMLP, Versuchsaufbau 1, beide Plasmaquellen

Bedingungen	Kontrolle mit fMLP	PTS2'	PTS5'
Plasmaquelle			
plasma care® rel. ET ₅₀ NETose [%]	100	98 ± 24	99 ± 21
MicroPlaSter® rel. ET ₅₀ NETose [%]	100	102 ± 38	64 ± 23

Tabelle 15: ET₅₀NETose, relativ zur Kontrolle mit fMLP, Versuchsaufbau 1, beide Plasmaquellen

Der Unterschied bei MicroPlaSter® zeigt sich nun zwischen der Kontrolle mit fMLP und PTS5' (p=0,038) und PTS2' und PTS5' (p=0,021) statistisch signifikant.

3.2 Ergebnisse aus Versuchsaufbau 2

Resultate aus den Experimenten mit Versuchsaufbau 2 (n=16) werden im Folgenden beschrieben.

3.2.1 Ergebnisse der Migration

In Versuchsaufbau 2 wurden die Reservoirs beidseits des Kanals mit PTS befüllt. In den Reservoirs links des Kanals befinden sich zusätzlich jeweils 10 nM fMLP. Die Befüllung der Beobachtungseinheit zur Kontrolle unterscheidet sich nicht von Versuchsaufbau 1. PTS0' steht im Folgenden für unbehandeltes Zellkulturmedium. In Abbildung 27 ist die *track length* in den Versuchen mit MicroPlaSter® aufgetragen.

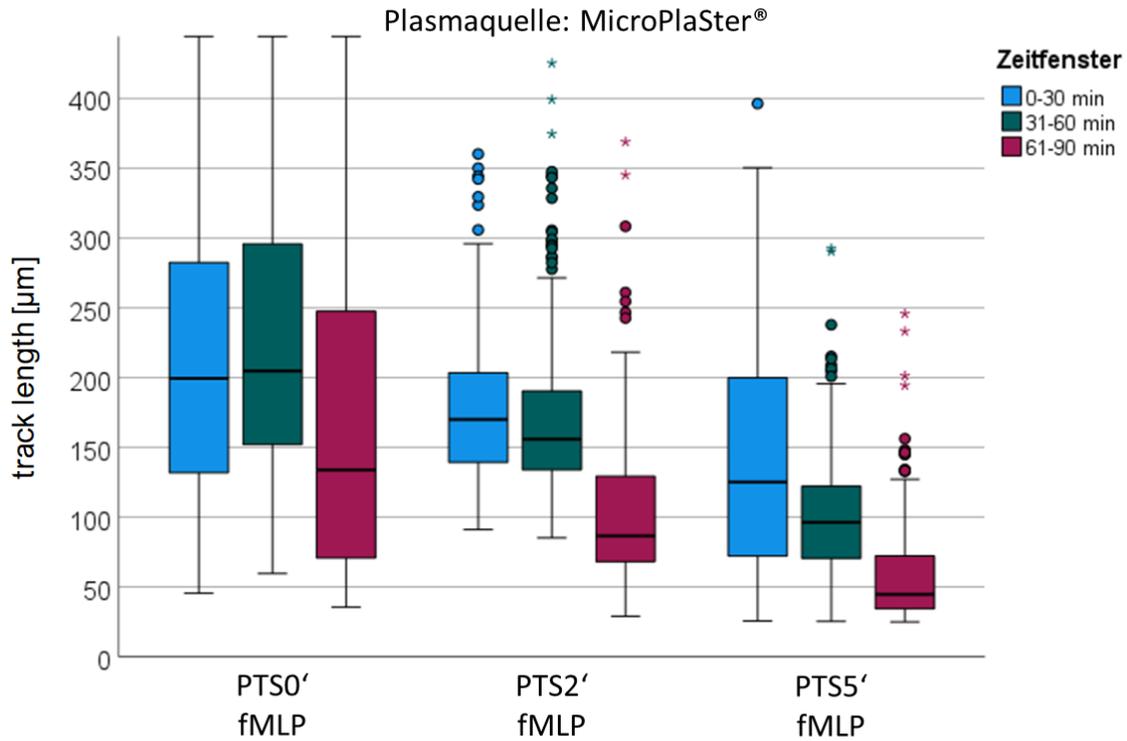


Abbildung 27: Track length bei Versuchsaufbau 2, Plasmaquelle MicroPlaSter®

In der unbehandelten Kontrollgruppe legen die PMN über die ersten drei halben Stunden im Median jeweils $186 \pm 112 \mu\text{m}$ zurück. In den mit PTS behandelten Beobachtungseinheiten beträgt diese Strecke $139 \mu\text{m} \pm 68 \mu\text{m}$ bei 2 min Behandlungsdauer und $88 \mu\text{m} \pm 75 \mu\text{m}$ bei 5 min Behandlung. In der folgenden Abbildung 28 ist die *track length* bei Verwendung von plasma care® dargestellt:

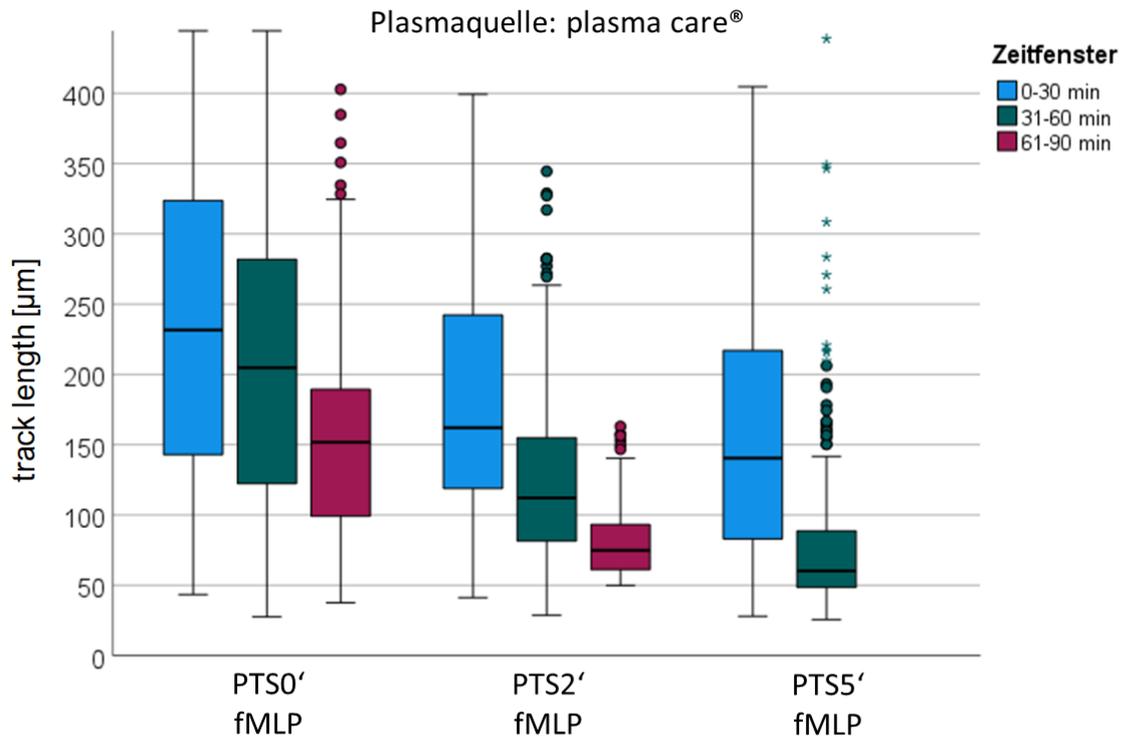


Abbildung 28: Track length bei Versuchsaufbau 2, Plasmaquelle plasma care®

Bei der Plasmaquelle plasma care® findet sich in der unbehandelten Kontrollgruppe eine *track length* über 181 µm (SD: 111µm) in jeder der ersten drei halben Stunden. In den mit PTS2' gefüllten Beobachtungseinheiten liegt dieser Wert mit 126 µm (SD: 75 µm) beziehungsweise 90 µm bei PTS5' darunter. Die Mediane der Migration in x-Richtung innerhalb der ersten halben Stunde sind in der folgenden Tabelle 16 mit dazugehörigen Standardabweichungen auf ganze µm gerundet angegeben. Die Migration nimmt in den folgenden Zeitabschnitten ab, bis die PMN schließlich zum Stillstand kommen.

Bedingungen	Kontrolle mit PTS0' und fMLP	PTS2' und fMLP	PTS5' und fMLP
Plasmaquelle plasma care®	57 ± 79	15 ± 63	0 ± 52
MicroPlaSter®	6 ± 60	2 ± 32	1 ± 46

Tabelle 16: TDx [µm], Versuchsaufbau 2, beide Plasmaquellen

Hinsichtlich der Tendenz in x-Richtung findet in der unbehandelten Kontrollgruppe eine Migration in Richtung des fMLP statt. Bei der Versuchsreihe unter dem plasma care® kommt diese deutlicher zum Ausdruck als bei den Versuchen, bei denen mit MicroPlaSter® gearbeitet wurde. Unter Einfluss von PTS fällt diese Migration geringer aus beziehungsweise fehlt. Bei

der *track straightness* ergeben sich ähnliche Werte wie unter Versuchsaufbau 1. Ebenfalls um 0 μm stellt sich die Migration in y-Richtung dar. (Werte nicht abgebildet)

3.2.2 Ergebnisse der ROS-Produktion

Unter Versuchsaufbau 2 ergeben sich die folgenden Mittelwerte für den Zeitpunkt der maximalen ROS-Produktion. Die Messwerte unterliegen einer Normalverteilung.

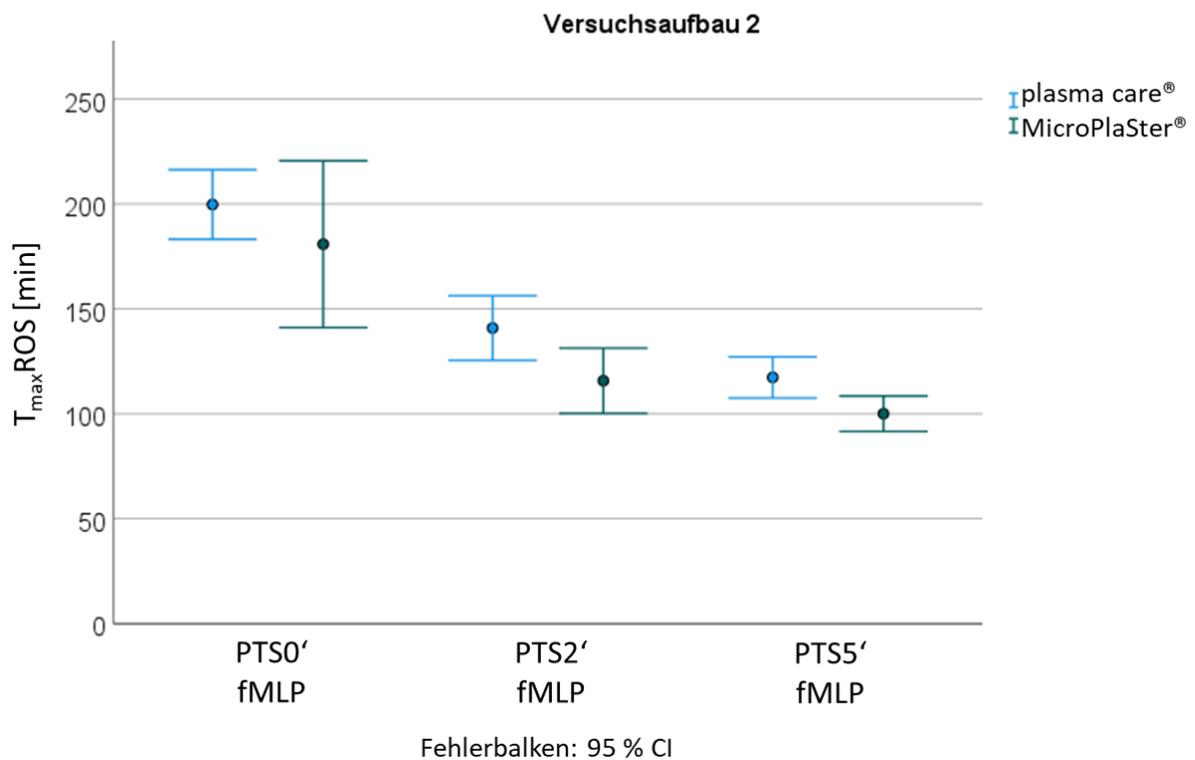


Abbildung 29: $T_{\max} \text{ROS}$ unter Versuchsaufbau 2, beide Plasmaquellen

Da sich die $T_{\max} \text{ROS}$ in den unbehandelten Kontrollgruppen voneinander unterscheiden, wurden die Messwerte jeweils in Relation zu ihrer eigenen Kontrolle gesetzt.

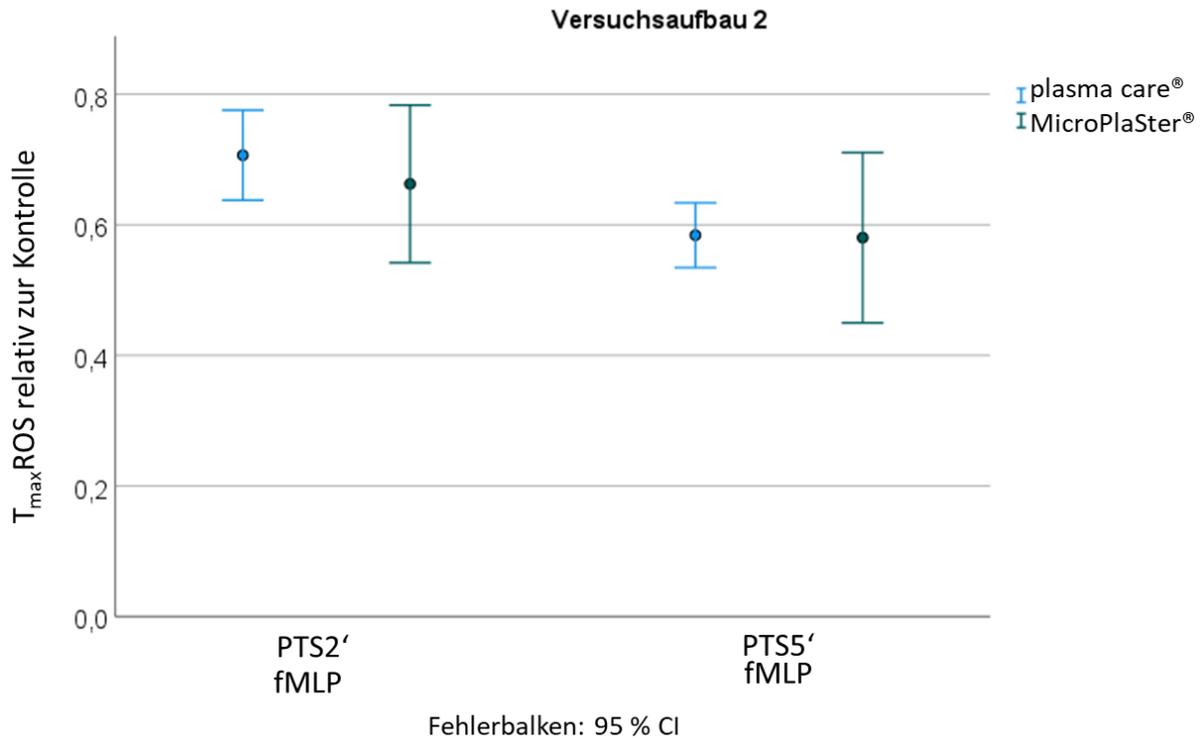


Abbildung 30: $T_{max}ROS$ relativ zur Kontrolle, Versuchsaufbau 2, beide Plasmaquellen

Bedingungen Plasmaquelle	Kontrolle mit PTS0' und fMLP	PTS2' und fMLP	PTS5' und fMLP
plasma care®	100 %	71 % ± 7 %	58 % ± 4 %
MicroPlaSter®	100 %	66 % ± 13 %	58 % ± 14 %

Tabelle 17: $T_{max}ROS$ relativ zur Kontrolle, Versuchsaufbau 2, beide Plasmaquellen

Beim Test nach Bonferroni unterscheiden sich die Werte bei plasma care® in jeder Gruppe signifikant voneinander ($p < 0,001$). Zwischen der Gruppe PTS2' und PTS5' unterscheidet es sich mit $p = 0,002$. Unter den Versuchen mit MicroPlaSter® unterscheiden sich ebenfalls fast alle Gruppen statistisch signifikant voneinander, lediglich die PTS2' und PTS5' verfehlt die Signifikanz mit $p = 0,546$.

3.2.3 Ergebnisse der MPO-Freisetzung

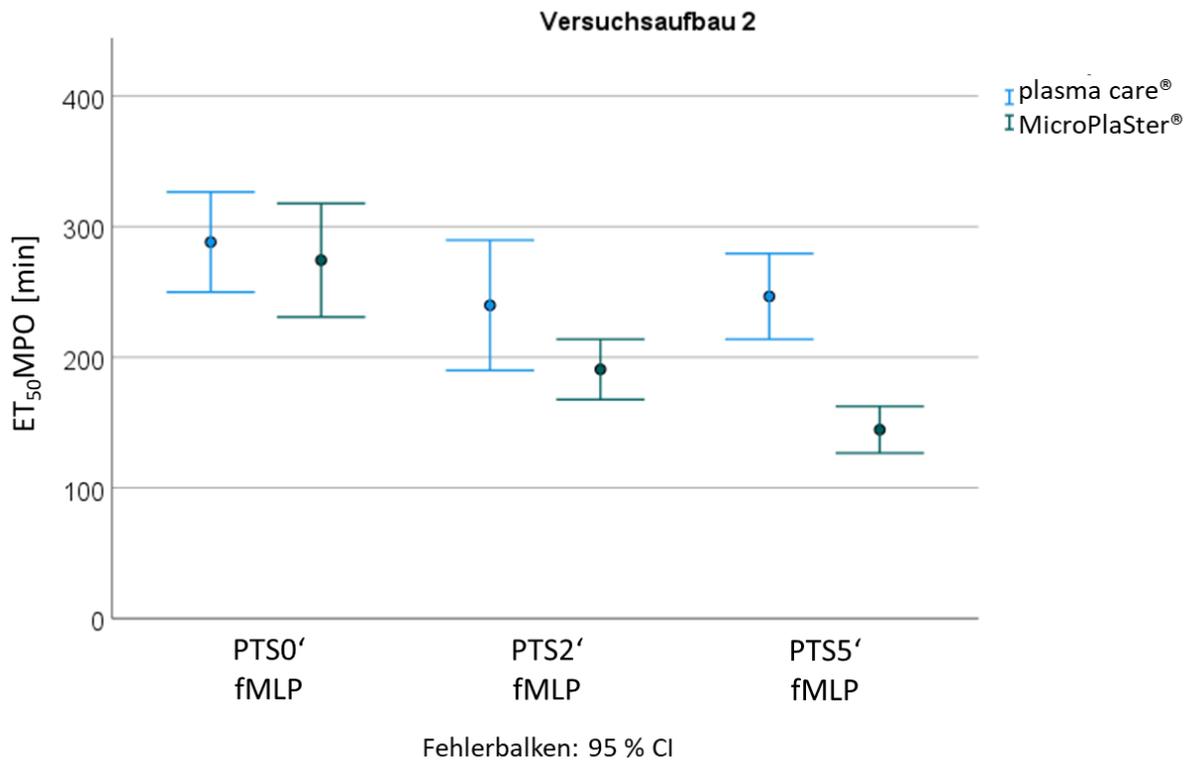


Abbildung 31: $ET_{50}MPO$, Versuchsaufbau 2, beide Plasmaquellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung

Bedingungen Plasmaquelle	Kontrolle mit PTS0' und fMLP	PTS2' und fMLP	PTS5' und fMLP
plasma care®	288 ± 41	240 ± 60	247 ± 35
MicroPlaSter®	274 ± 52	191 ± 28	145 ± 21

Tabelle 18: $ET_{50}MPO$ [min], Versuchsaufbau 2

Bei unterschiedlichem $ET_{50}MPO$ in den unbehandelten Kontrollgruppen erfolgt wieder die Normierung der Kontrollgruppe auf 100 %.

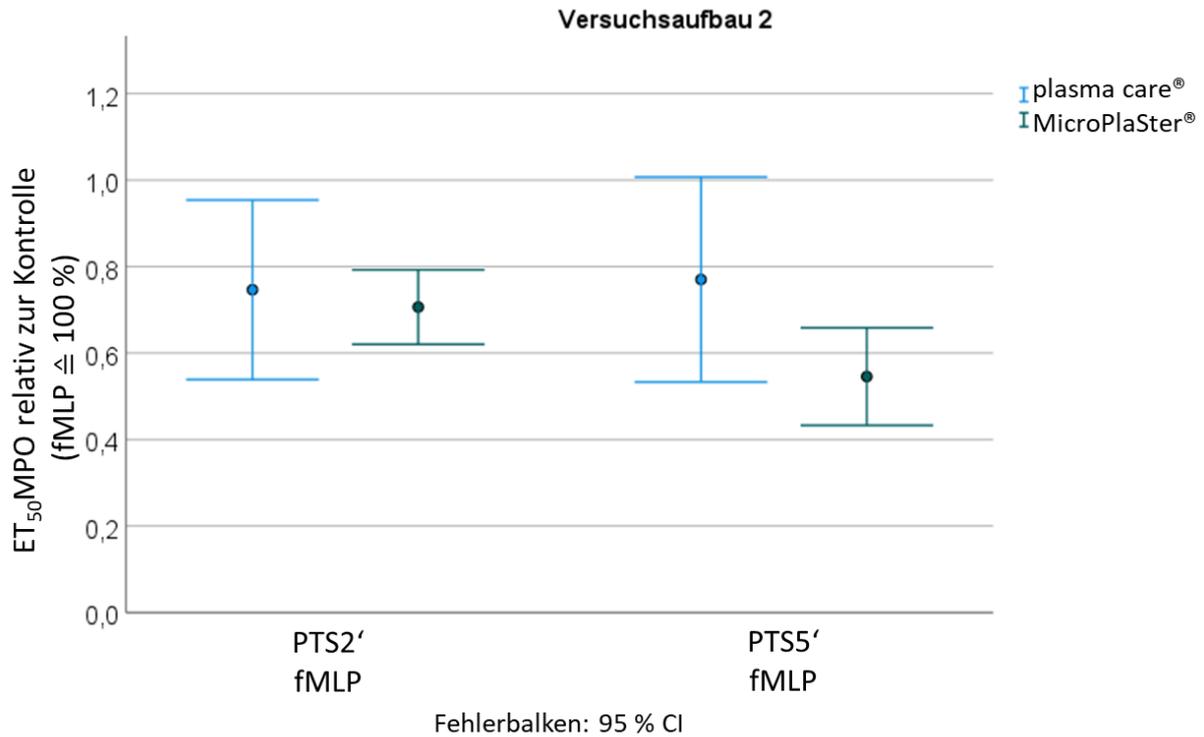


Abbildung 32: $ET_{50}MPO$, Versuchsaufbau 2, beide Plasmaquellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung

Bedingungen Plasmaquelle	Kontrolle mit PTS0' und fMLP	PTS2' und fMLP	PTS5' und fMLP
plasma care®	100 %	75 % ± 25 %	77 % ± 26 %
MicroPlaSter®	100 %	71 % ± 10 %	55 % ± 13 %

Tabelle 19: $ET_{50}MPO$ relativ zur Kontrolle, Versuchsaufbau 2

Betreffend $ET_{50}MPO$ finden sich bei plasma care® keine statistisch signifikanten Unterschiede. Bei MicroPlaSter® allerdings unterscheiden sich sowohl PTS2' und PTS5' mit $p < 0,001$ von der Kontrolle. Lediglich der Unterschied von PTS2' und PTS5' verpasst die Signifikanz mit $p=0,056$.

3.2.4 Ergebnisse der NETose

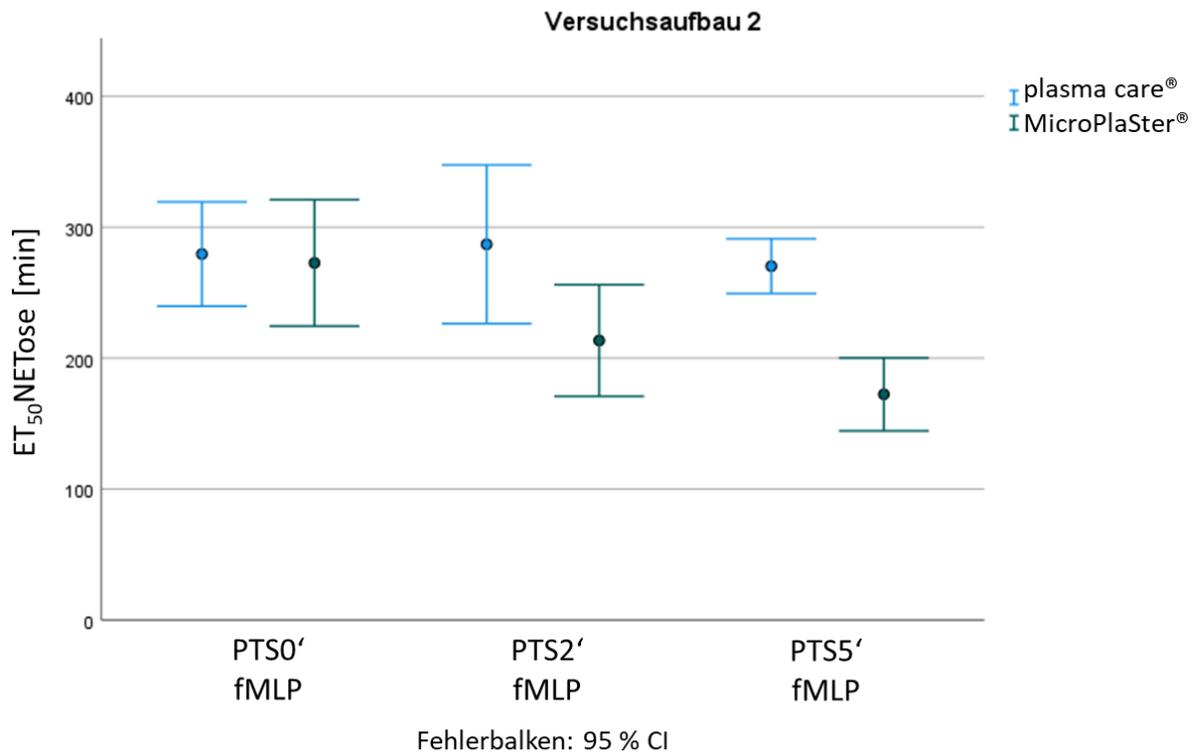


Abbildung 33: ET₅₀NETose bei Versuchsaufbau 2, beide Plasmaquellen

Auch unter Versuchsaufbau 2 unterscheidet sich das Auftreten der NETose bei den Versuchen mit plasma care® nicht voneinander. Bei Verwendung von MicroPlaSter® allerdings unterscheiden sich die Werte für ET₅₀NETose zwischen den Gruppen PTS0' und PTS5' min signifikant voneinander (p=0,001). Das gleiche Ergebnis erhält man auch bei Betrachtung der Werte relativ zur Kontrollgruppe.

Bedingungen Plasmaquelle	Kontrolle mit PTS0' und fMLP	PTS2' und fMLP	PTS5' und fMLP
plasma care®	280 ± 43	287 ± 49	270 ± 25
MicroPlaSter®	273 ± 58	214 ± 51	172 ± 33

Tabelle 20: ET₅₀NETose [min], Versuchsaufbau 2, beide Plasmaquellen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung

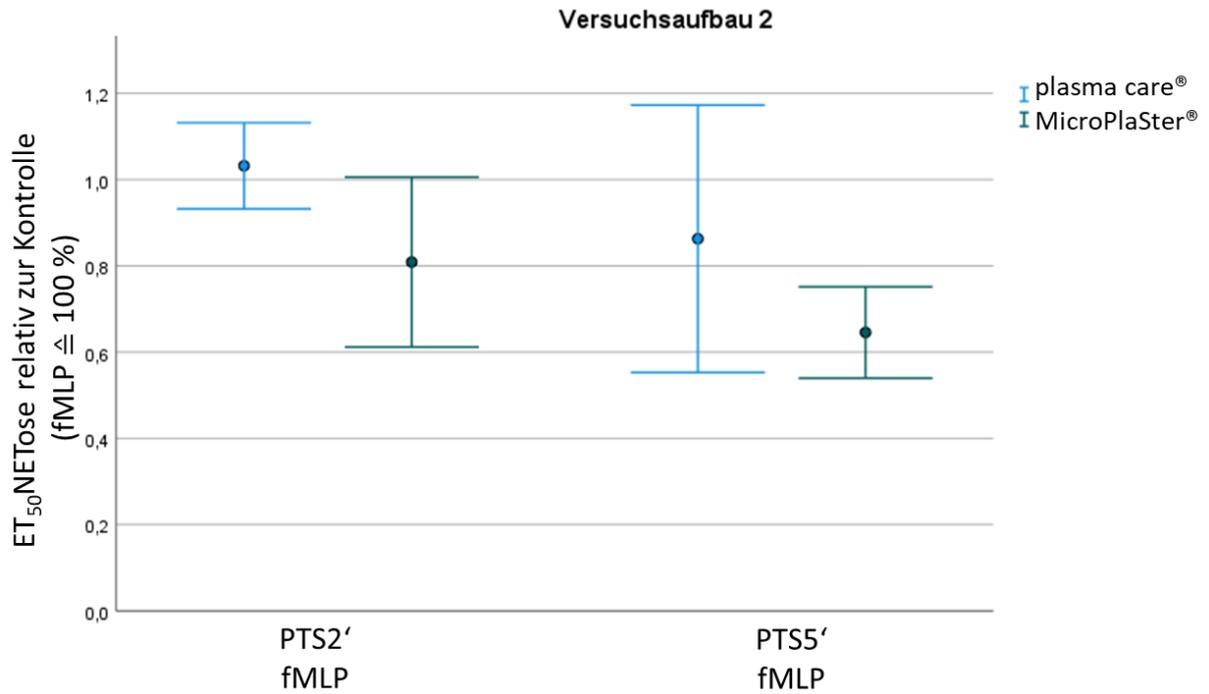


Abbildung 34: ET₅₀NETose, relativ zur Kontrolle, Versuchsaufbau 2, beide Plasmaquellen

Bedingungen Plasmaquelle	Kontrolle mit PTS0' und fMLP	PTS2' und fMLP	PTS5' und fMLP
plasma care®	100 %	103 % ± 8 %	86 % ± 37 %
MicroPlaSter®	100 %	81 % ± 24 %	65 % ± 13 %

Tabelle 21: ET₅₀NETose, relativ zur Kontrolle, Versuchsaufbau 2, beide Plasmaquellen

3.3 Ergebnisse aus Versuchsaufbau 3

Die Resultate aus den Experimenten mit Versuchsaufbau 3 (n=16) werden hier beschrieben.

3.3.1 Ergebnisse der Migration

Bei Versuchsaufbau 3 ergeben sich folgende *track lengths* bei der Plasmaquelle MicroPlaSter®:

Zeitfenster	PTS0' median ± SD	PTS2' median ± SD	PTS5' median ± SD
erste halbe Stunde [µm]	87 ± 58 SD: 58	139 SD: 68	106 SD: 59
zweite halbe Stunde [µm]	75 SD: 63	135 SD: 64	76 SD: 45
dritte halbe Stunde [µm]	90 SD: 54	129 SD: 41	94 SD:36
Insgesamt [µm]	86 SD: 58	135 SD: 62	91 SD: 54

Tabelle 22: Track length bei Versuchsaufbau 3, Plasmaquelle: MicroPlaSter

Entsprechende Werte bei der Versuchsreihe mit plasma care®:

Zeitfenster	0 min KAP	2 min KAP	5 min KAP
erste halbe Stunde [µm]	102 SD: 54	96 SD: 53	77 SD: 45
zweite halbe Stunde [µm]	91 SD: 45	80 SD: 45	56 SD: 23
dritte halbe Stunde [µm]	91 SD: 43	83 SD: 46	*
Insgesamt [µm]	97 SD:50	85 SD: 49	67 SD: 42

Tabelle 23: Track length bei Versuchsaufbau 3, Plasmaquelle: plasma care®, * Werte fehlen bei optisch beurteilt fehlender Migration im IMARIS®

Bei der Migration in x-Richtung ergeben sich folgende Werte für MicroPlaSter®:

Zeitfenster	0 min KAP	2 min KAP	5 min KAP
erste halbe Stunde [µm]	5 SD:30	3 SD: 42	1 SD: 33
zweite halbe Stunde [µm]	0 SD:15	0 SD: 32	1 SD: 25
dritte halbe Stunde [µm]	0 SD:25	2 SD: 24	2 SD: 16
Insgesamt [µm]	0 SD:26	2 SD: 35	1 SD: 28

Tabelle 24: Track displacement x, Versuchsaufbau 3, Plasmaquelle: MicroPlaSter®

Bei plasma care ergeben die Mediane und Standardabweichungen der Migration in x-Richtung:

Zeitfenster	0 min KAP	2 min KAP	5 min KAP
erste halbe Stunde [µm]	5 SD:33	5 SD: 44	3 SD: 25
zweite halbe Stunde [µm]	3 SD:33	0 SD: 30	0 SD: 20
dritte halbe Stunde [µm]	1 SD:27	2 SD: 21	fehlt
Insgesamt [µm]	3 SD: 32	2 SD: 34	1 ± 23

Tabelle 25: Track displacement length x, Versuchsaufbau 3, Plasmaquelle: plasma care®

Die *track displacement length* in y-Richtung bewegt sich im kleinen Bereich von maximal 4 µm in der ersten halben Stunde. In den darauffolgenden Zeitabschnitten um 0 µm. Die *track straightness* stellt sich in Versuchsaufbau 3 folgendermaßen dar:

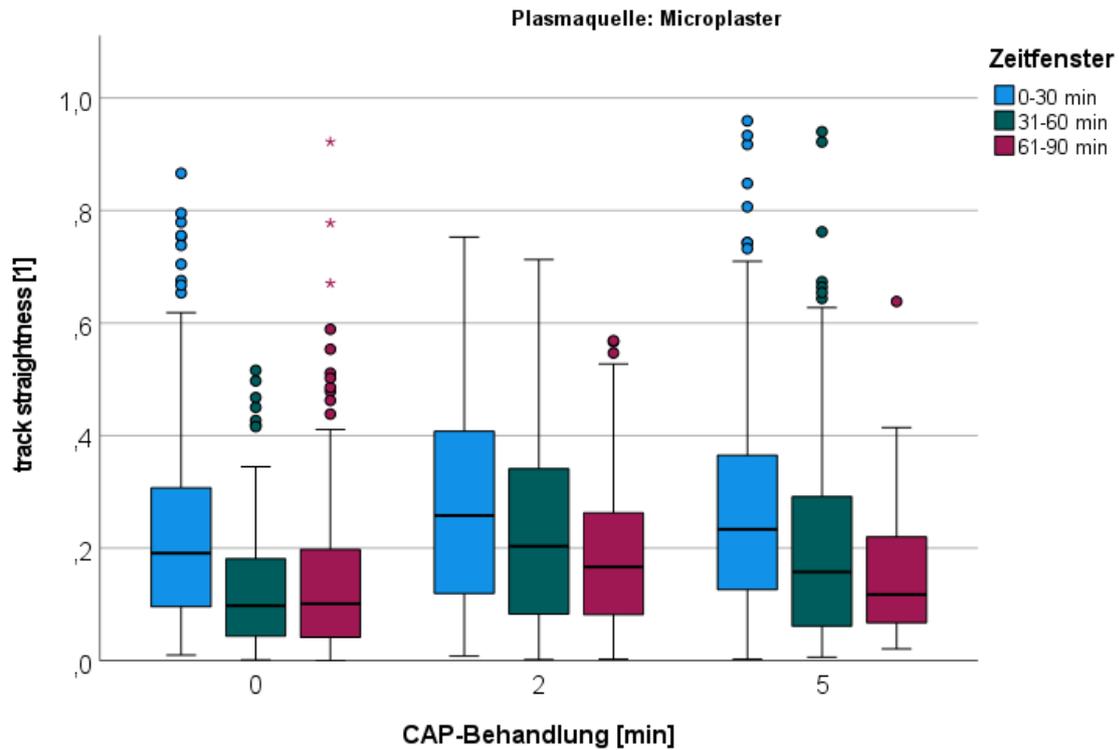


Abbildung 35: Track straightness, Versuchsaufbau 3, Plasmaquelle: MicroPlaSter®

In folgender Abbildung 36 ist ein exemplarischer Ausschnitt aus der Bildverarbeitungssoftware IMARIS® dargestellt, wie er typisch ist für die Versuche unter Versuchsaufbau 3.

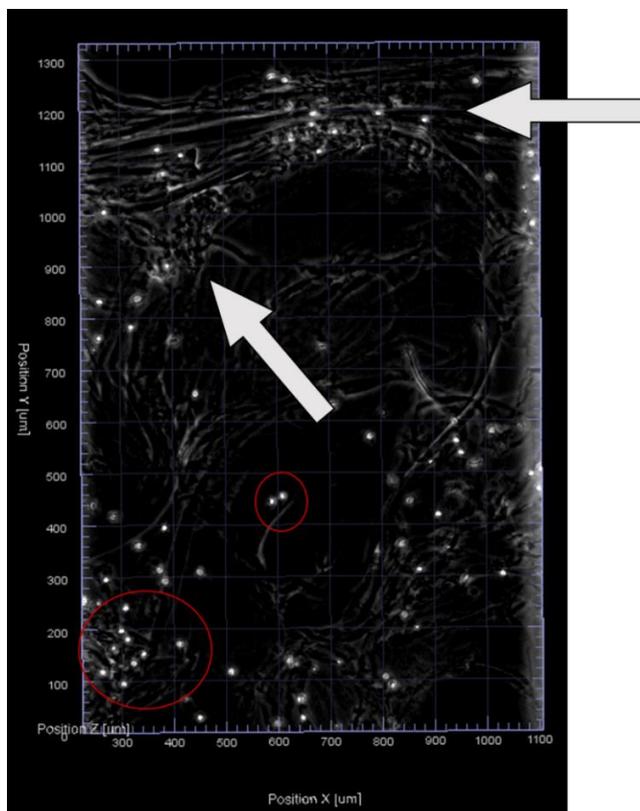


Abbildung 36: Typisches Bild im Phasenkontrast unter Versuchsaufbau 3. Rot eingekreist sind beispielhaft PMN. Die Pfeile deuten auf Gänge, die in der Gelmatrix entstanden sind.

3.3.2 Ergebnisse der ROS-Produktion, der MPO-Freisetzung und der NETose

Folgend zwei Verläufe der ROS-Produktion unter Versuchsaufbau 3:

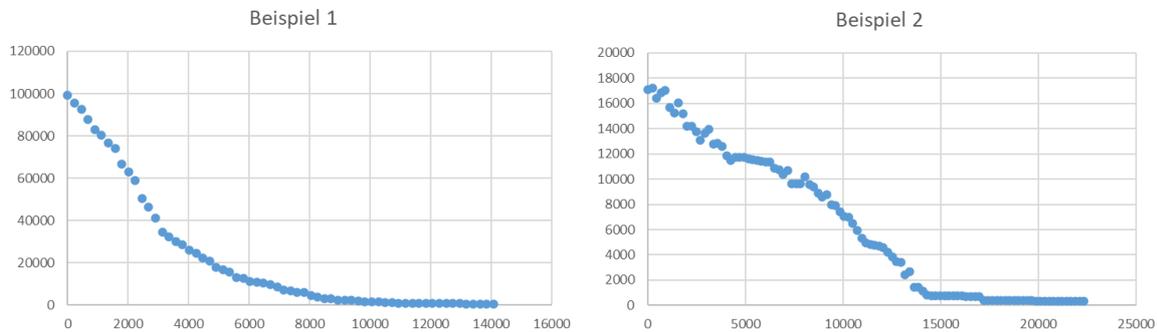


Abbildung 37: Typischer Verlauf der ROS-Produktion unter Versuchsaufbau 3

Diese beiden Kurven sind typisch für den Ablauf der ROS-Produktion unter Versuchsaufbau 3. Es zeigt sich in allen Versuchen ein absteigender Verlauf der Flächensumme. Ganz ähnlich dazu zeigten sich die Verläufe der MPO-Freisetzung und der NETose ebenfalls nicht auswertbar.

4 Diskussion

Im folgenden Abschnitt werden die erzielten Ergebnisse interpretiert und Vergleiche mit der bestehenden Literatur und dem Stand der Forschung angestellt.

Diese Studie sollte einen Beitrag zum besseren Verständnis der Auswirkungen von KAP auf eine bestimmte Population von Zellen des Immunsystems leisten. Aus dieser präklinischen experimentellen Arbeit können keine direkten Rückschlüsse auf praktische Konsequenzen in den vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der Plasmamedizin gezogen werden und die gefundenen Effekte können für therapeutischen Zwecke sowohl vorteilhaft als auch nachteilig sein. Dennoch ist es wichtig zu betonen, dass durch die Durchführung von Studien wie dieser das Verständnis für die Wirkmechanismen der Plasmamedizin erweitert und die Entwicklung von zukünftigen Therapien verbessert werden kann. Ziel der Studie war es, zu analysieren, ob sich KAP-Behandlung auf die Funktionen von PMN auswirken kann.

Dazu wurden drei verschiedene Versuchsaufbauten konstruiert, die jeweils unterschiedlich starke Einflüsse der PTS auf die PMN simulierten. Dies wurde durch verschiedene Methoden zur Befüllung der μ -slide Chemotaxis® erreicht (siehe Kapitel 2.2.5). Im ersten Versuchsaufbau konnte die PTS nur von einer Seite auf die PMN einwirken. Im zweiten Versuchsaufbau konnte die PTS nur von einer Seite auf die PMN einwirken. Im zweiten Versuchsaufbau wurden die beiden Reservoirs links und rechts des zentralen Beobachtungskanal mit PTS gefüllt, um eine mögliche Auswirkung der PTS stärker

hervorzuheben. Im dritten Versuchsaufbau wurden die Reservoirs äquivalent zum Versuchsaufbau 2 gefüllt. Der Einfluss von PTS auf die PMN sollte jedoch noch weiter verstärkt werden, indem PTS als Bestandteil der Gelmatrix verwendet wurde, in der sich die PMN befanden. Dadurch wurde erstens die Zeit, in der die PMN unter dem Einfluss von PTS standen, erheblich verlängert. Zweitens führte dies zu einem intensiveren Kontakt der Substanzen miteinander, da sie nun von Anfang an in derselben Umgebung waren und der Kontakt nicht erst durch Diffusion zustande kommen musste. In der folgenden Abbildung 38 sind die Ergebnisse dieser Studie komprimiert dargestellt.

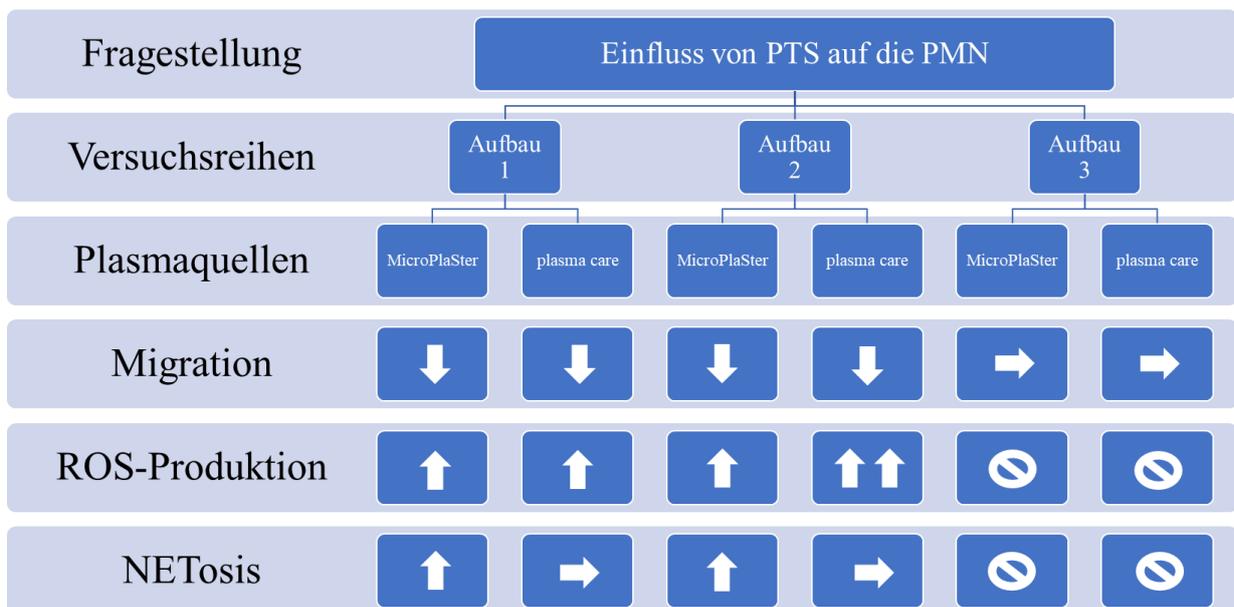


Abbildung 38: Ergebnisse der Versuchsreihen komprimiert dargestellt. Pfeil nach oben: Induktion; waagrecht Pfeil: keine Beeinflussung, Pfeil nach unten: Inhibition; Verbotsscheine: Ergebnisse nicht zu verwenden

4.1.1 Interpretation und Vergleich der Ergebnisse aus den Versuchsaufbauten 1 und 2

In Versuchsaufbau 1 wurde der bewährte Lockstoff fMLP in den beiden Beobachtungseinheiten in der Mitte und rechts durch PTS ersetzt (vergleiche Tabelle 6). Dadurch sollte sich beurteilen lassen, ob PTS als *chemoattractant* wirken kann. In den Kontrollgruppen mit fMLP waren *track length* und *track displacement x* in einem für die Versuchsbedingungen zu erwarteten Rahmen (siehe Abbildung 15, Abbildung 16, Abbildung 17, und Abbildung 18). Der Rückgang der Migrationsstrecke während der Beobachtungszeit ist in vergleichbaren Forschungsarbeiten ebenfalls beschrieben (20, 22). Die fehlende Migration in y-Richtung resultiert daher, dass in dieser Ebene kein Gradient von Substanzen, die aus der Diffusion von den anliegenden Reservoirs her entstehen existiert und wurde daher so erwartet. Unter dem Einfluss von PTS und des Fehlens von fMLP hingegen waren sowohl die *track length* als auch

track displacement x stark herabgesetzt. Wegen der verringerten Migration in x-Richtung war folglich auch die *track straightness* kleiner. In Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt sich feststellen, dass eine direkte chemoattraktive Wirkung durch die PTS nicht gegeben ist. Damit zeigen die PMN in vitro ein anderes Verhalten als beispielsweise Keratinozyten, die nach KAP-Behandlung ein verändertes Migrationsverhalten zeigen. In einer Studie von Balzer et al. zeigt sich eine gesteigerte Migration bei moderat langer Behandlungsdauer, oder eine Hemmung der Migration durch längere Behandlungszeiten (43). Im Versuchsaufbau 2 wurde die Befüllung des μ -Slide Chemotaxis[®] in der linken Kontroll-Beobachtungseinheit äquivalent zu Versuchsaufbau 1 gewählt (siehe Tabelle 7). Erwartungsgemäß zeigten sich in beiden Versuchsaufbauten ähnliche Ergebnisse für den Parameter *track length* in den Kontrollgruppen. Bei der Versuchsreihe 2 unter Verwendung von MicroPlaSter[®] fällt auf, dass *track displacement x* mit im Median 6 μ m unerwartet gering ausfällt (siehe Tabelle 16). Die erfasste, vergleichsweise kurze Migrationsstrecke der PMN von circa einem halben Zelldurchmesser kann dadurch erklärt werden, dass experimentelle Beobachtungen der Migration mit erheblichen zwischenindividuellen, innerindividuellen und tagesabhängigen Variationen einhergehen (44).

Für die Plasmaquelle plasma care[®] zeigte sich für den Parameter *track length* sowohl in Versuchsaufbau 1 (siehe Abbildung 16) als auch in Versuchsaufbau 2 (siehe Abbildung 28) eine adäquate Migration innerhalb der ersten beiden halben Stunden. Im Versuchsaufbau 2 konnten speziell für die Versuchsbedingungen plasma care[®], PTS5' und Zeitfenster 61-90 min keine Messwerte generiert werden (siehe Abbildung 28). Dies erklärt sich dadurch, dass bei der Auswertung im IMARIS[®] bei diesen Bedingungen keine migrierenden, lebenden Zellen mehr sichtbar waren und somit keine Migration objektiviert werden konnte.

Entgegen der Erwartung, war in Versuchsaufbau 2 unter dem Einfluss von PTS wenig Migration in Richtung des fMLP ($\hat{=}$ *track displacement x*) festzustellen (siehe Tabelle 16). Diese minimale Migration kann in Zusammenschau mit den weiteren Ergebnissen der ROS-Produktion und der NETose interpretiert werden. Sowohl in Versuchsaufbau 1 als auch in Versuchsaufbau 2 ergeben sich Signifikanzen, die darauf hindeuten, dass PTS in der Lage ist, die ROS-Produktion der PMN anzustoßen. Dies führt folglich zu einer früheren NETose, bei der die PMN immobilisiert werden und folglich nicht mehr auf fMLP zuwandern können.

Der Zeitpunkt der maximalen ROS-Produktion kann bereits im Versuchsaufbau 1 durch PTS beeinflusst werden. In der Auswertung der ROS-Produktion zeigt sich in Versuchsaufbau 1 bei PTS5' bei beiden Plasmaquellen eine signifikante Verkürzung der $T_{\max ROS}$ (siehe Tabelle 11). Nach vorgenommener Normierung an das Auftreten von $T_{\max ROS}$ in der unbehandelten

Gruppe erweist sich diese Verkürzung der Zeit teilweise als statistisch signifikant (siehe Abbildung 22). Dieses Ergebnis lässt sich in Versuchsaufbau 2 neben PTS5' auch für PTS2' ausweisen (siehe Tabelle 17). Bei PTS2' lässt sich eine Verkürzung der Zeit bis zum T_{\max} ROS um circa 30 % berichten. Bei PTS5' fällt dieser Effekt mit einer Verkürzung der Zeit bis zum T_{\max} ROS um circa 40 % noch stärker aus (siehe Tabelle 17). Ein Grund für das schnellere Einsetzen des *respiratory burst* könnte folgender sein: Durch die Plasmabehandlung des wässrigen Zellkulturmediums entsteht in der PTS Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (45). Dieses kann als unpolares und relativ kleines Molekül durch die Zellmembran diffundieren und über die Aktivierung der NADPH-Oxidase für die Produktion von ROS sorgen (46).

Die berichtete fördernde Wirkung von PTS auf den *respiratory burst* steht im Gegensatz zu einer anderen Studie, bei der eine moderate Reduktion der Ausschüttung von Superoxiden als Reaktion auf KAP gezeigt wurde (41). Als Gründe dafür, dass diese Ergebnisse voneinander abweichen, können die verwendete Plasmaquelle oder die verkürzte Beobachtungszeit in der Studie von Bekeschus et al. angeführt werden.

In der hier vorliegenden Studie ergeben sich interessante Ergebnisse in Bezug auf die Freisetzung der Myeloperoxidase (MPO). Unter Verwendung von plasma care® blieb der Zeitpunkt der ET_{50} MPO unverändert. Im Gegensatz dazu fand unter dem Einfluss von PTS, welches durch MicroPlaSter® generiert wurde, eine signifikant frühere ET_{50} MPO statt- unter PTS5' bis zu 40 beziehungsweise 45 % verkürzt (siehe Tabelle 13, Tabelle 19). Es ist auch erwähnenswert, dass zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch keine Untersuchung zur Freisetzung von MPO durch PMN unter Einfluss einer KAP-Behandlung publiziert worden war. Ähnlich zur ET_{50} MPO zeigen sich die Ergebnisse der ET_{50} NETose: plasma care® vermag es nicht die ET_{50} NETose zu beeinflussen. Bei der Verwendung des MicroPlaSter® unterscheidet sich die ET_{50} NETose signifikant von der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 15 und Tabelle 21). Dies stimmt mit den Ergebnissen älterer Studien überein, bei denen das Herbeiführen der NETose durch KAP-Behandlung mit einem *plasma jet* gezeigt werden konnte (41). In dieser Studie konnte die NETose mit einer *plasma-torch*, also einem Gerät mit ähnlichem Aufbau herbeigeführt werden. In einer anderen, im Forschungslabor der Anästhesie am Uniklinikum Regensburg unter Verwendung von plasma care® durchgeführten Studie wurde ET_{50} NETose ebenfalls nicht beeinflusst (30). Die Ergebnisse der NETose fügen sich also in die bestehende Forschungslage ein und betonen die unterschiedliche Wirksamkeit der verschiedenen Geräte mit ihren unterschiedlichen Eigenschaften, die zur Erzeugung von KAP benutzt werden können.

4.1.2 Interpretation der Ergebnisse aus Versuchsaufbau 3

Unter den Bedingungen von Versuchsaufbau 3 ergeben sich bei der Migration Werte, die sich nicht ins Bild der vorherigen Versuchsaufbauten einfügen. Es fehlt der typische Rückgang der Migrationsstrecke über den Zeitverlauf, eine adäquate Migration in x-Richtung findet nicht statt und die *track straightness* ist geringer. Gründe dafür sind wahrscheinlich in der anderen Zusammensetzung der Kollagenmatrix bei Versuchsaufbau 3 zu suchen. Diese hat möglicherweise dazu geführt, dass die ansonsten homogene Umgebung der PMN während der Beobachtungszeit nicht zustande gekommen ist. Stattdessen haben sich unter dem Mikroskop sichtbare „Gänge“ in der Kollagenmatrix gebildet (siehe Abbildung 36), an denen entlang sich die Migration im IMARIS[®] abgespielt hat. Eine freie Beweglichkeit in alle Richtungen war so nicht möglich, was die Interpretation der Ergebnisse sehr stark begrenzt. Die Bildung dieser „Gänge“, die unter Versuchsaufbau 1 und 2 nicht beobachtet wurde, könnte auf eine unregelmäßige Aushärtung der Gelmatrix zurückzuführen sein, möglicherweise aufgrund des Fehlens von MEM 10x als Bestandteil der Gelmatrix. Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix spielt eine entscheidende Rolle für den Erfolg solcher Versuchsaufbauten (21). Außerdem werden diese „Gänge“ auch die Diffusion der Stoffe aus den Reservoirs hinein in den Beobachtungskanal verändern und für eine inhomogene Verteilung der Substanzen in der Gelmatrix sorgen. Damit sind die Ergebnisse aus Versuchsaufbau 3 nicht aussagekräftig. In Versuchsaufbau 3 haben sich in allen Versuchen von Beginn an geringer werdende Flächensummen der ROS-produzierenden Zellen ergeben (siehe Abbildung 37), womit die Möglichkeit den Höhepunkt in der ROS-Produktion zu detektieren entfiel. Dieser lag möglicherweise schon während der Inkubationszeit im Brutschrank vor, während derer die PMN bei diesem Versuchsaufbau schon unter Einfluss von PTS standen. Auch denkbar erscheint ein $T_{\max}ROS$ während oder kurz nach Befüllung der Reservoirs. Durch die Befüllung der Reservoirs mit PTS bekommen die PMN einen *second hit* und werden zur starken ROS-Produktion angeregt, die eventuell in den wenigen Minuten zwischen Befüllung der Reservoirs und Start der Beobachtungszeit ihren Höhepunkt erreicht haben könnte. Auch über die Parameter $ET_{50}MPO$ und $ET_{50}NETose$ konnte Versuchsaufbau 3, mutmaßlich wegen der Modifikation der Versuchsbedingungen leider keine Aussagen treffen.

4.2 Limitationen des Studiendesigns

Für die experimentelle Untersuchung der PMN als eine bestimmte Zellpopulation war es notwendig eine Isolierung dieser Zellen durch Zentrifugation durchzuführen. Allerdings beeinträchtigt diese Zentrifugation wichtige Funktionen der PMN. Die chemotaktische

Migration und der oxidative Burst sind bei zentrifugierten Neutrophilen signifikant verringert (47). Eine weitere mögliche Schwäche bei der Durchführung dieser Studie könnte die Auswertung der Bilddaten in IMARIS[®] sein. Bei dieser Arbeit hatte man diverse Möglichkeiten, um IMARIS[®] eine Fläche als „gefärbt“ erkennen zu lassen und damit als Teil der Zellen, die zum Beispiel im Moment ROS produzieren zu zählen. Diese leicht subjektive Art Bilddaten in Zahlenwerte umzuwandeln kann die Aussagekraft der Ergebnisse gering beeinträchtigen. Dieses Problem könnte dadurch minimiert werden, indem mehrere Untersucher die Bilder auswerten und ihre Ergebnisse vergleichen.

4.3 Einfluss der KAP-Behandlung auf PMN und deren Auswirkungen auf die Wundheilung

Ein Aspekt dieser Arbeit befasste sich mit der Frage, ob PTS als *chemoattractant* geeignet ist. Für die Wundheilung beispielsweise ist die Migration von Zellen an den Ort des Geschehens sehr relevant. Im Tiermodell wurden nach direkter KAP-Behandlung der Wundfläche mehr Neutrophile im Wundgebiet gefunden (38). Die Ergebnisse dieser *in vitro* Studie mit indirektem Einfluss auf die PMN durch die PTS verneinen eine chemoattraktive Wirkung von KAP. Es bleibt dennoch möglich, dass die KAP-Behandlung *in vivo* trotzdem eine Auswirkung auf die Migration von PMN haben kann. Dies womöglich über indirekte Effekte einer Vielzahl von Zytokinen oder Wechselwirkungen der beteiligten Zellen untereinander, welche die Migration auf indirektem Wege beeinflussen können.

Eine weitere Erkenntnis aus dieser Studie ist es, dass KAP die ROS-Produktion und die NETose anstoßen kann. Sichtbar gemacht wurde dies an der verkürzten Zeit, bis das Maximum der ROS-Produktion beziehungsweise die halbmaximale NETose detektiert wurde. Dabei stellt sich die Frage, inwieweit eigentlich diese Verkürzung für die Wirkung von ROS und NETs an der Wunde relevant ist. Analog zum Modell der *area under the curve* aus der Pharmakokinetik bedeutet ein früherer *peak* nicht zwangsläufig ein größeres Integral der Konzentrations-Zeit-Kurve. Des Weiteren bleibt es spekulativ, wie lange und intensiv die ROS im Gewebe wirken können: Wegen des physiologischen Vorkommens der durch KAP erzeugten redox-aktiven Substanzen können überschüssige Konzentrationen dieser Stoffe effektiv durch körpereigene antioxidative Abwehrsysteme antagonisiert werden (27). Das richtige Maß der NETose sollte für eine physiologisch ablaufende Wundheilung genau ausbalanciert sein. So fördert eine niedrigkonzentrierte NETose die Kerationzytenproliferation und damit die Wundheilung, eine überschießende NETose hingegen zeigt einen gegenteiligen Effekt (48).

Die vorliegende Studie, die den Einfluss von mit KAP behandeltem Zellkulturmedium auf die Granulozytenfunktionalität untersuchte, eröffnet wertvolle Einblicke in komplexe Interaktionen biologischer Prozesse. Die signifikanten Werte zeigen, dass ROS-Produktion und NETose durch KAP modifiziert werden können. Die Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit zusätzlicher Forschung, um die Interaktionen zwischen den Zellen und den von ihnen und der Plasmaquelle erzeugten Molekülen aufzuklären. Dies wird helfen, die durch KAP verursachten Veränderungen genauer zu bewerten. Unter Verweis auf die unterschiedlichen Resultate bei den verschiedenen Plasmaquellen erscheinen Folgeuntersuchungen nötig, um eine an das jeweilige Wundheilungsstadium angepasste Therapieform wählen zu können. Im Sinne einer stetig verbesserten Patientenversorgung erscheint es bedeutsam weitere Forschung zu diesem Thema anzuregen, um die Bedeutung von KAP auf PMN und deren Auswirkungen auf die Wundheilung noch besser zu ergründen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von KAP auf die Funktionalität neutrophiler Granulozyten untersucht. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) stellen die erste Verteidigungslinie des Immunsystems gegen eindringende Pathogene dar, indem sie eine rasche und effektive Antwort auf Infektionsherde ermöglichen. Die Rolle der PMN, insbesondere ihre Fähigkeit, den Prozess der Phagozytose zu initiieren und Entzündungsreaktionen zu modulieren, ist zum Beispiel bei der Wundheilung von großer Bedeutung.

Wenn gasförmiger Materie weiter Energie zugeführt wird, entsteht Plasma. KAP bezeichnet jenes medizinisch nutzbare Plasma, welches durch eine Temperatur unter 40 °C für den Einsatz am vitalen Gewebe geeignet ist. Die wirksamen Bestandteile von KAP sind mit Ionen und Elektronen, UV- und IR- Strahlung, sichtbarem Licht, elektromagnetischen Feldern, Wärmestrahlung und reaktiven Spezies sehr vielfältig. Im medizinischen Kontext sind neben der UV-Strahlung und dem elektrischen Feld vor allem die im KAP enthaltenen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiven Stickstoffspezies (RNS), von Bedeutung. Die antimikrobielle Wirkung von KAP sowie seine potenzielle Rolle bei der Förderung der Wundheilung und Modulation der Immunantwort bieten vielversprechende Perspektiven für therapeutische Anwendungen. Insbesondere die Fähigkeit von KAP, die Produktion von ROS zu stimulieren, könnte entscheidend für die Beeinflussung der zellulären Funktionen von neutrophilen Granulozyten sein. In dieser Studie wurden zunächst neutrophile Granulozyten

aus dem Blut gesunder Proband*innen isoliert. Anschließend erfolgte die Behandlung des Zellkulturmediums mit KAP durch zwei verschiedene Plasmaquellen. Die PMN selbst waren nicht direkt einer Plasmabehandlung ausgesetzt. Der Kontakt der PMN zu der PTS (*plasma treated solution*) kam in einem speziellem μ -Slide Chemotaxis[®] (siehe 2.2.5) zustande. Für jede einzelne Versuchsdurchführung stand unbehandeltes Zellkulturmedium als Kontrolle zur Verfügung. Das μ -Slide Chemotaxis[®] ermöglichte durch seine verschiedenen Kammern eine modifizierte Befüllung und somit die Durchführung von drei verschiedenen Versuchsaufbauten, die jeweils separat ausgewertet wurden.

Ziel war es, die Auswirkungen von KAP auf die zelluläre Funktionalität der PMN zu untersuchen. Mittels Life-Cell-Imaging wurden die Bewegungen und Verhaltensweisen der neutrophilen Granulozyten über sieben Stunden automatisiert unter einem Mikroskop beobachtet. Die so gewonnenen Bilddaten wurden mit Hilfe verschiedener Software objektiviert und statistisch ausgewertet. Von Interesse waren Effekte von KAP auf die Zellmigration und die ROS-Produktion sowie die NETose als Indikatoren für die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten. In den Ergebnissen zeigte sich abhängig von der Behandlungsdauer der PTS bei beiden Plasmaquellen eine signifikant früher einsetzende ROS-Produktion. Die NETose setzte bei Verwendung von MicroPlaSter[®] signifikant früher ein, bei plasma care[®] blieb sie unverändert. Die Migration der PMN blieb bei beiden Plasmaquellen weitgehend unverändert. Die PTS zeigte keine chemoattraktive Wirkung auf die PMN.

Die Studie liefert wichtige Einblicke in die potenzielle Rolle von KAP in der Immunmodulation und Wundheilung. Die Fähigkeit von KAP, spezifische zelluläre Reaktionen in PMN zu induzieren, unterstreicht das therapeutische Potenzial dieser Technologie in der medizinischen Praxis. Zukünftige Forschungen sollten sich darauf konzentrieren, die molekularen Mechanismen hinter den beobachteten Effekten weiter zu entschlüsseln und die optimale Dosierung sowie die Feineinstellungen von KAP in Abhängigkeit von der verwendeten Plasmaquelle zu bestimmen, um die Effizienz und Sicherheit der Anwendung zu maximieren. Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass kaltes atmosphärisches Plasma eine signifikante Wirkung auf die Funktionalität neutrophiler Granulozyten hat. Abwägend könnte die Modulation der Immunantwort durch KAP eine innovative Möglichkeit bieten die Wundheilung zu fördern und die Abwehr gegen mikrobielle Infektionen zu verstärken. Hierzu sind weitere Untersuchungen erforderlich, um das volle Potenzial von KAP in der Medizin zu erschließen und praktische Anwendungen für die klinische Praxis zu entwickeln.

6 Literatur

1. Murphy. Janeway Immunologie: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
2. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997; 89(10):3503–21.
3. Quinn MT, DeLeo FR. Neutrophil: Methods and Protocols. 3rd ed. 2020. New York, NY: Springer US; 2020. (Methods in Molecular Biology; Bd. 2087).
4. Huttenlocher A, Horwitz AR. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3(9):a005074. doi: 10.1101/cshperspect.a005074.
5. Heit B, Tavener S, Raharjo E, Kubers P. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J Cell Biol* 2002; 159(1):91–102. doi: 10.1083/jcb.200202114.
6. Petri B, Sanz M-J. Neutrophil chemotaxis. *Cell Tissue Res* 2018; 371(3):425–36. doi: 10.1007/s00441-017-2776-8.
7. Malech HL, DeLeo FR, Quinn MT. The Role of Neutrophils in the Immune System: An Overview. In: *Neutrophil Methods and Protocols*: Humana Press, Totowa, NJ; 2014. S. 3–10.
8. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *Blood* 1998; 92(9):3007–17. doi: 10.1182/blood.V92.9.3007.
9. El-Benna J, Hurtado-Nedelec M, Marzaioli V, Marie J-C, Gougerot-Pocidallo M-A, Dang PM-C. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunological Reviews* 2016; 273(1):180–93. doi: 10.1111/imr.12447.
10. Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys* 2018; 640:47–52. doi: 10.1016/j.abb.2018.01.004.
11. Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys* 2018; 640:47–52. doi: 10.1016/j.abb.2018.01.004.
12. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303(5663):1532–5. doi: 10.1126/science.1092385.

13. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 2012; 198(5):773–83. doi: 10.1083/jcb.201203170.
14. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453(7193):314–21. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/nature07039>.
15. Elliott MR, Koster KM, Murphy PS. Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses. *J Immunol* 2017; 198(4):1387–94. doi: 10.4049/jimmunol.1601520.
16. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013; 13(3):159–75. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/nri3399>.
17. Oliveira S de, Rosowski EE, Huttenlocher A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat Rev Immunol* 2016; 16(6):378–91. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/nri.2016.49>.
18. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med* 2014; 6(265):265sr6. doi: 10.1126/scitranslmed.3009337.
19. Wilgus TA, Roy S, McDaniel JC. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013; 2(7):379–88. doi: 10.1089/wound.2012.0383.
20. Doblinger N, Bredthauer A, Mohrez M, Hähnel V, Graf B, Gruber M et al. Impact of hydroxyethyl starch and modified fluid gelatin on granulocyte phenotype and function. *Transfusion* 2019; 59(6):2121–30. doi: 10.1111/trf.15279.
21. Kraus RF. Der Einfluss extrazellulärer Matrix auf die Funktionalität neutrophiler Granulozyten.
22. Hattenkofer M, Gruber M, Metz S, Pfaehler S-M, Lehle K, Trabold B. Time course of chemotaxis and chemokinesis of neutrophils following stimulation with IL-8 or FMLP. *Eur J Inflamm* 2018; 16:205873921881917. doi: 10.1177/2058739218819171.
23. Omelon S, Georgiou J, Habraken W. A cautionary (spectral) tail: red-shifted fluorescence by DAPI-DAPI interactions. *Biochemical Society Transactions* 2016; 44(1):46–9. doi: 10.1042/bst20150231.

24. Metelmann H-R, Woedtke T von, Weltmann K-D, Hrsg. Plasmamedizin: Kaltplasma in der medizinischen Anwendung. Berlin, Heidelberg: Springer; 2016 [Stand: 07.09.2020]. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-662-52645-3.pdf>.
25. Mortimer CE, Müller U. Chemie: Das Basiswissen der Chemie. 13. vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2020. (Thieme eRef).
26. Stroth U. Plasmaphysik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
27. Metelmann H-R, Woedtke T von, Weltmann K-D. Comprehensive Clinical Plasma Medicine: Cold Physical Plasma for Medical Application. Cham: Springer International Publishing; Imprint: Springer; 2018.
28. Metelmann H-R, Woedtke T von, Weltmann K-D, Emmert S, Hrsg. TEXTBOOK OF GOOD CLINICAL PRACTICE IN COLD PLASMA THERAPY. [S.l.]: Springer; 2022.
29. 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. doi: 10.1111/j.1610-0387.2010.07495.x.
30. Kupke LS, Arndt S, Lenzer S, Metz S, Unger P, Zimmermann JL et al. Cold Atmospheric Plasma Promotes the Immunoreactivity of Granulocytes In Vitro. *Biomolecules* 2021; 11(6). doi: 10.3390/biom11060902.
31. Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN, Fridman A. Applied Plasma Medicine. *Plasma Process. Polym.* 2008; 5(6):503–33. doi: 10.1002/ppap.200700154.
32. Heinlin J, Zimmermann JL, Zeman F, Bunk W, Isbary G, Landthaler M et al. Randomized placebo-controlled human pilot study of cold atmospheric argon plasma on skin graft donor sites. *Wound Repair Regen* 2013; 21(6):800–7. doi: 10.1111/wrr.12078.
33. Stratmann B, Costea T-C, Nolte C, Hiller J, Schmidt J, Reindel J et al. Effect of Cold Atmospheric Plasma Therapy vs Standard Therapy Placebo on Wound Healing in Patients With Diabetic Foot Ulcers: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open* 2020; 3(7):e2010411. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.10411.
34. Seebauer C, Lucas C, Kindler S, Metelmann H-R. Wundmanagement – Biologie und Störung der Wundheilung. *Ophthalmologe* 2019; 116(6):585–96. doi: 10.1007/s00347-019-0921-3.

35. Maisch T, Bosserhoff AK, Unger P, Heider J, Shimizu T, Zimmermann JL et al. Investigation of toxicity and mutagenicity of cold atmospheric argon plasma. *Environ Mol Mutagen* 2017; 58(3):172–7. doi: 10.1002/em.22086.
36. Arndt S, Unger P, Berneburg M, Bosserhoff A-K, Karrer S. Cold atmospheric plasma (CAP) activates angiogenesis-related molecules in skin keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells and improves wound angiogenesis in an autocrine and paracrine mode. *Journal of dermatological science* 2018; 89(2):181–90. doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.11.008.
37. 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. doi: 10.1371/journal.pone.0120041.
38. Arndt S, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Heinlin J, Li Y-F 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. doi: 10.1371/journal.pone.0079325.
39. Karrer S, Arndt S. Plasmamedizin in der Dermatologie : Wirkmechanismen und Anwendungsmöglichkeiten. *Hautarzt* 2015; 66(11):819–28. doi: 10.1007/s00105-015-3686-x.
40. Boeckmann L, Bernhardt T, Schäfer M, Semmler ML, Kordt M, Waldner A-C et al. Aktuelle Indikationen der Plasmatherapie in der Dermatologie. *Hautarzt* 2020; 71(2):109–13. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00105-019-04530-0>.
41. Bekeschus S, Winterbourn CC, Kolata J, Masur K, Hasse S, Bröker BM et al. Neutrophil extracellular trap formation is elicited in response to cold physical plasma. *J Leukoc Biol* 2016; 100(4):791–9.
42. ibidi. μ -Slide Chemotaxis | Reproducible Chemotaxis Assays | ibidi; 2023 [Stand: 25.01.2023]. Verfügbar unter: <https://ibidi.com/channel-slides/9--slide-chemotaxis-ibitreat.html>.
43. Balzer J, Demir E, Kogelheide F, Fuchs PC, Stapelmann K, Opländer C. Cold atmospheric plasma (CAP) differently affects migration and differentiation of

- keratinocytes via hydrogen peroxide and nitric oxide-related products. *Clinical Plasma Medicine* 2019; 13:1–8. doi: 10.1016/j.cpme.2018.11.001.
44. Pedersen MM. Comparison of two methods for measurement of chemotaxis of neutrophil polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C* 1987; 95(5):189–93. doi: 10.1111/j.1699-0463.1987.tb00029.x.
45. Chen Z, Lin L, Cheng X, Gjika E, Keidar M. Effects of cold atmospheric plasma generated in deionized water in cell cancer therapy. *Plasma Process. Polym.* 2016; 13(12):1151–6. doi: 10.1002/ppap.201600086.
46. Nguyen GT, Green ER, Mecsas J. Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7:373. doi: 10.3389/fcimb.2017.00373.
47. Hundhammer T, Gruber M, Wittmann S. Paralytic Impact of Centrifugation on Human Neutrophils. *Biomedicines* 2022; 10(11). doi: 10.3390/biomedicines10112896.
48. Sabbatini M, Magnelli V, Renò F. NETosis in Wound Healing: When Enough Is Enough. *Cells* 2021; 10(3):494. Verfügbar unter: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/3/494>.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Exemplarischer Verlauf der ROS-Produktion	6
Abbildung 2: Exemplarischer Verlauf der NETose	7
Abbildung 3: Plasma als vierter Aggregatzustand	8
Abbildung 4: Wirksame Bestandteile von Plasma	9
Abbildung 5: MicroPlaSter®	10
Abbildung 6: Schema der Funktionsweise des plasma care®	11
Abbildung 7: Grundlegende technische Funktionsweise der verwendeten Plasmaquellen.....	12
Abbildung 8: Studienaufbau	14
Abbildung 9: Fraktionen vor und nach Dichtegradientenzentrifugation.....	18
Abbildung 10: Darstellung der μ -Slide Chemotaxis, ibidi®	19
Abbildung 11: Aufbau der Beobachtungseinheiten der μ -Slide Chemotaxis.....	20
Abbildung 12: Beispiel einer Polynomfunktion zur Ermittlung von T_{\max} ROS.....	22
Abbildung 13: Exemplarischer Verlauf der NETose	23
Abbildung 14: Parameter der Migration.....	24
Abbildung 15: Track length bei Versuchsaufbau 1, Plasmaquelle: MicroPlaSter®	27
Abbildung 16: Track length bei Versuchsaufbau 1, Plasmaquelle: plasma care®	28
Abbildung 17: Track displacement x bei Versuchsaufbau 1, Plasmaquelle: MicroPlaSter® ...	29
Abbildung 18: Track displacement x bei Versuchsaufbau 1, Plasmaquelle: plasma care®	30
Abbildung 19: Track straightness bei Versuchsaufbau 1, Plasmaquelle: MicroPlaSter®	31
Abbildung 20: Track straightness bei Versuchsaufbau 1, Plasmaquelle: plasma care®	31
Abbildung 21: T_{\max} ROS bei Versuchsaufbau 1, beide Plasmaquellen	32
Abbildung 22: T_{\max} ROS relativ zur Kontrolle, Versuchsaufbau 1, beide Plasmaquellen.....	33
Abbildung 23: ET_{50} MPO bei Versuchsaufbau 1.....	34
Abbildung 24: ET_{50} MPO relativ zur Kontrolle unter Versuchsaufbau 1	35
Abbildung 25: ET_{50} NETose bei Versuchsaufbau 1, beide Plasmaquellen.....	36
Abbildung 26: ET_{50} NETose relativ zur Kontrolle mit fMLP, Versuchsaufbau 1.....	37
Abbildung 27: Track length bei Versuchsaufbau 2, Plasmaquelle MicroPlaSter®	38
Abbildung 28: Track length bei Versuchsaufbau 2, Plasmaquelle plasma care®	39
Abbildung 29: T_{\max} ROS unter Versuchsaufbau 2, beide Plasmaquellen	40
Abbildung 30: T_{\max} ROS relativ zur Kontrolle, Versuchsaufbau 2, beide Plasmaquellen.....	41
Abbildung 31: ET_{50} MPO, Versuchsaufbau 2, beide Plasmaquellen.....	42

Abbildung 32: ET ₅₀ MPO, Versuchsaufbau 2, beide Plasmaquellen.....	43
Abbildung 33: ET ₅₀ NETose bei Versuchsaufbau 2, beide Plasmaquellen.....	44
Abbildung 34: ET ₅₀ NETose, relativ zur Kontrolle, Versuchsaufbau 2, beide Plasmaquellen .	45
Abbildung 35: Track straightness, Versuchsaufbau 3, Plasmaquelle: MicroPlaSter®	48
Abbildung 36: Typisches Bild im Phasenkontrast unter Versuchsaufbau 3.....	48
Abbildung 37: Typischer Verlauf der ROS-Produktion unter Versuchsaufbau 3	49
Abbildung 38: Ergebnisse der Versuchsreihen komprimiert dargestellt.....	50

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendetes Verbrauchsmaterial	15
Tabelle 2: Verwendete Geräte und Computerprogramme	15
Tabelle 3: Verwendete Substanzen und Chemikalien	16
Tabelle 4: Zellkulturmedien für die Gelmatrix	19
Tabelle 5: Überblick über die Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe und Parameter zur Fluoreszenzmessung	21
Tabelle 6: Versuchsaufbau 1	26
Tabelle 7: Versuchsaufbau 2	26
Tabelle 8: Track length bei Versuchsaufbau 1, Plasmaquelle: MicroPlaSter®	27
Tabelle 9: Track length bei Versuchsaufbau 1, Plasmaquelle: plasma care®	29
Tabelle 10: Mittelwerte von T_{\max} ROS [min] bei Versuchsaufbau 1	32
Tabelle 11: Relation der T_{\max} ROS unter Versuchsaufbau 1	33
Tabelle 12: Mittelwerte von ET_{50} MPO bei Versuchsaufbau 1	34
Tabelle 13: ET_{50} MPO relativ zur Kontrolle, Versuchsaufbau 1	35
Tabelle 14: ET_{50} NETose [min], Mittelwerte mit Standardabweichung, Versuchsaufbau 1	36
Tabelle 15: ET_{50} NETose, relativ zur Kontrolle mit fMLP, Versuchsaufbau 1	37
Tabelle 16: TDx [μ m], Versuchsaufbau 2, beide Plasmaquellen	39
Tabelle 17: T_{\max} ROS relativ zur Kontrolle, Versuchsaufbau 2	41
Tabelle 18: ET_{50} MPO [min], Versuchsaufbau 2	42
Tabelle 19: ET_{50} MPO relativ zur Kontrolle, Versuchsaufbau 2	43
Tabelle 20: ET_{50} NETose [min], Versuchsaufbau 2	44
Tabelle 21: ET_{50} NETose, relativ zur Kontrolle, Versuchsaufbau 2	45
Tabelle 22: Track length bei Versuchsaufbau 3, Plasmaquelle: MicroPlaSter	46
Tabelle 23: Track length bei Versuchsaufbau 3, Plasmaquelle: plasma care®	46
Tabelle 24: Track displacement x, Versuchsaufbau 3, Plasmaquelle: MicroPlaSter®	47
Tabelle 25: Track displacement length x, Versuchsaufbau 3, Plasmaquelle: plasma care®	47

9 Abkürzungsverzeichnis

CI Konfidenzintervall

E. Escherichia

FKS fetales Kälberserum

fMLP Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin

IR Infrarot

KAP kaltes atmosphärisches Plasma

kHz Kilohertz

MPO Myeloperoxidase

MRSA Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus

NET neutrophil extracellular traps

PMN polymorphkernige neutrophile Granulozyten

PTS plasma treated solution

rpm rounds per minute

S. Staphylococcus

SD Standardabweichung

TGF- β transforming growth factor β

UV ultraviolett

VEGF vascular endothelial growth factor

10 Danksagung

11 Lebenslauf

12 Erklärung zum Promotionsverfahren

Nach § 3 Abs. 3 und 4 der Promotionsordnung
der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

Simon Lenzer, geboren am 08. Mai 1989 in Dillingen a.d. Donau

Ich erkläre,

- dass ich den Doktorgrad der Medizin nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland erworben habe.
- dass ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des medizinischen Doktorgrades zugelassen bin.
- dass ich die medizinische Doktorprüfung nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland endgültig nicht bestanden habe.

Außerdem erkläre ich,

- dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen.
- dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 10.07.2024

Simon Lenzer