

Aus dem Lehrstuhl für Dermatologie
Prof. Dr. Mark Berneburg
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Behandlung und Reinigung von Kontaktlinsen mit
plasmaaktivierten Medien

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Julia Maria Magdalene Spörl

2025

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Sigrid Karrer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Matthias Widbiller

Tag der mündlichen Prüfung:

05.05.2025

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Kontaktlinsen

1.1.1 Definition und geschichtliche Aspekte

1.1.2 Kontaktlinsenarten

1.1.2.1 Formstabile Kontaktlinsen

1.1.2.2 Weiche Kontaktlinsen

1.1.3 Kontaktlinseneigenschaften

1.1.3.1 Sauerstoffdurchlässigkeit

1.1.3.2 Wassergehalt

1.1.3.3 Oberflächenbenetzbarkeit

1.1.3.4 Modulus (Materialelastizität)

1.1.4 Kontaktlinsenmaterialien

1.1.5 Ablagerungen auf weichen Kontaktlinsen

1.1.6 Kontaktlinsenreinigung, -hygiene und -pflege

1.1.7 Kontaktlinsenkomplikationen

1.1.7.1 Hornhautvaskularisation

1.1.7.2 Konjunktivitis

1.1.7.3 infektiöse Keratitis

1.2 Kaltes atmosphärisches Plasma

1.2.1 Definition von kaltem atmosphärischem Plasma (KAP)

1.2.2 Herstellung von KAP

1.2.3 Wirkweise von KAP

1.2.4 Einsatz von KAP in der Medizin

1.2.4.1 Antimikrobielle Eigenschaften von KAP

1.2.4.2 Behandlung von chronischen Wunden mit KAP

1.2.4.3 Die Wirkung von KAP auf Tumorzellen

1.2.4.4 Einsatz von KAP in der Ophthalmologie

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

2.1.3 Reagenzien

2.1.4 Bakterienstamm

2.2 Methoden

2.2.1 KAP – Behandlung von verschiedenen Lösungen

2.2.2 Bestimmung von reaktiven Spezies im Kurz- und Langzeitversuch

2.2.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies

2.2.2.2 Wasserstoffperoxid

2.2.2.3 Nitrat/ Nitrit

2.2.3 Bakterizide Wirkung von verschiedenen plasmabehandelten Lösungen auf *Escherichia coli*

2.2.3.1 Herstellung des Mueller – Hinton – Nährmediums

2.2.3.2 Herstellung der Über – Nacht – Kultur

2.2.3.3 Etablierungsversuch mit Millipore Wasser zur Bestimmung der nötigen KAP-Dosis

2.2.3.4 Etablierungsversuch mit Kontaktlinsenmittel zur Bestimmung der nötigen KAP-Dosis

2.2.3.5 Versuch zur bakteriziden Wirkung unterschiedlicher Lösungen auf *Escherichia coli* im unbehandelten Zustand sowie nach KAP – Behandlung

2.2.3.6 Versuch mit verlängerter Einwirkzeit der unterschiedlichen Lösungen auf *Escherichia coli*

2.2.3.7 Statistische Auswertung und grafische Darstellung der Bakterienversuche

2.2.4 Reinigung von lipidbeschichteten Silikon – Hydrogel – Kontaktlinsen mit unterschiedlichen plasmabehandelten und unbehandelten Kontaktlinsenlösungen

2.2.5 pH – Wert – Messung von plasmabehandelten Lösungen

3. Ergebnisse

3.1 Messung der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies im Kurzzeitversuch

3.1.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

3.1.2 Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

3.1.3 Nitrit (NO₂⁻)

3.1.4 Nitrat (NO_3^-)

3.2 Messung der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies im Langzeitversuch

3.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

3.2.2 Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

3.2.3 Nitrit (NO_2^-)

3.2.4 Nitrat (NO_3^-)

3.3 Bakterizide Wirkung von plasmabehandelten Lösungen auf *Escherichia coli*

3.3.1 Etablierungsversuch zur Bestimmung der antibakteriell wirkenden KAP – Dosis

3.3.1.1 Millipore Wasser

3.3.1.2 Kontaktlinsenlösung

3.3.2 Bakterizide Wirkung von unterschiedlichen KAP – behandelten Lösungen auf *Escherichia coli* mit unterschiedlichen Einwirkzeiten

3.4 Reinigungswirkung von plasmabehandelten Lösungen auf lipidbeschichtete Kontaktlinsen

3.5 Auswirkung der KAP – Behandlung auf den pH-Wert der verschiedenen Lösungen in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer

4. Diskussion und Ausblick

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.2 Unmittelbare und langanhaltende Auswirkungen der KAP-Behandlung auf die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) in vier unterschiedlichen Lösungen

4.2.1 Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

4.2.2 reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

4.2.3 Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-)

4.3 Auswirkung der KAP – Behandlung auf die bakterizide Wirkung verschiedener Lösungen am Beispiel von *Escherichia coli*

4.4 Auswirkung der KAP – Behandlung auf die Reinigungswirkung verschiedener Lösungen gegenüber lipidbeschichteter Kontaktlinsen

4.5 Auswirkung der KAP – Behandlung auf den pH – Wert von verschiedenen Lösungen

5. Zusammenfassung

6. Anhang

6.1 Tabellen

6.2 Abbildungen

6.3 Abkürzungsverzeichnis

7. Literaturverzeichnis

8. Danksagung

1. Einleitung

1.1 Kontaktlinsen:

1.1.1 Definition und geschichtliche Aspekte

Bei Kontaktlinsen handelt es sich um optische Sehhilfen, die im direkten Kontakt zum Auge stehen [1]. Bereits in den späten 1880er Jahren entwickelten die drei Ärzte Adolph Fick, Eugene Kalt und August Müller unabhängig voneinander die ersten Kontaktlinsen aus Glas. Hierbei handelte es sich um geblasene oder geschliffene Glaschalen, die direkt auf das Auge gelegt wurden und dieses zum Großteil bedeckten. Durch das hohe Eigengewicht dieser Linsen und die geringe Sauerstoffdurchlässigkeit war der Tragekomfort jedoch mangelhaft und somit mit nur kurzen Tragezeiten von ungefähr 30 Minuten verbunden [2]. In den darauffolgenden Jahren konnten keine nennenswerten Weiterentwicklungen in diesem Bereich verzeichnet werden. Dies änderte sich jedoch grundlegend in den 1930er Jahren, als die chemische Industrie in der Lage war, durchsichtige thermoplastische Kunststoffe herzustellen [3]. 1936 ersetzte dann der Optiker William Feinbloom das Glas teilweise durch Kunststoff, wodurch das Gewicht der Linse relevant reduziert wurde. Er entwickelte eine Linse, bei der der zentrale Anteil weiterhin aus Glas bestand, der skleraabdeckende Part jedoch durch Kunststoff ersetzt wurde. In diesem Jahr wurde außerdem Polymethylmethacrylat (PMMA) in den USA eingeführt, was aufgrund seiner sehr guten optischen Eigenschaften auch zur Herstellung von harten Kontaktlinsen genutzt wurde. 1948 gelang dem Optiker Kevin Tuohy der Durchbruch mit seinem Patent für die erste Hornhautlinse aus PMMA, welche nur die Hornhaut und nicht die gesamte Sklera bedeckte. Dadurch kam es neben einer Gewichtsreduktion zu einem verbesserten Tränen austausch unter der Linse, wodurch sich der Tragekomfort und folglich auch der Absatz von Kontaktlinsen spürbar steigerte [4]. Diese Kontaktlinsen konnten aufgrund der nicht vorhandenen Sauerstoffdurchlässigkeit maximal 6 bis 8 Stunden getragen werden, ohne dass es hierbei zu Schäden im Bereich der Cornea kam [3]. 1954 entwickelte der Chemiker Otto Wichterle Hydroxyethylmethacrylat (HEMA), das erste sogenannte Hydrogel [4]. Die Strukturformel des HEMA ähnelte der des PMMA, jedoch speicherte es bis zu 38% Wasser und war somit besser durchlässig für Sauerstoff [3]. 1962 und 1965 ließ Wichterle sich die „Wichterle-Linse“ aus HEMA patentieren, welche zwar eine schlechte Sehschärfe, jedoch einen sehr hohen Tragekomfort aufgrund der Sauerstoffdurchlässigkeit bot. Zur

schnelleren und zuverlässigen Herstellung der HEMA-Kontaktlinsen entwickelte Otto Wichterle außerdem ein Schleudergussgerät, welches die Herstellung der Kontaktlinse revolutionierte. In den nachfolgenden Jahren übernahmen Bausch + Lomb die Vermarktung der HEMA - Kontaktlinsen und konnte weitere Optimierungen vornehmen. Kurze Zeit später erwarben sie das Patent auf die Linsen und besaßen nun das Monopol für weiche Kontaktlinsen in den Vereinigten Staaten [4]. In den darauffolgenden Jahren erfolgten weitere Verbesserungen sowie Neuerungen im Bereich der Kontaktologie: So wurde beispielsweise 1970 das erste HEMA-freie Material patentiert. Neben den bereits vorhandenen Kontaktlinsenmaterialien erschien 1977 in Europa das erste Silikongummimaterial zur Herstellung von Kontaktlinsen, was 1999 durch Silikonpolymer noch weiter ergänzt wurde [1].

1.1.2 Kontaktlinsenarten

1.1.2.1 Formstabile Kontaktlinsen

Formstabile Kontaktlinsen sind auch unter dem Begriff „harte Kontaktlinsen“ bekannt. Ursprünglich wurden sie aus PMMA hergestellt, was jedoch mit einer schlechten Sauerstoffdurchlässigkeit vergesellschaftet war. Aufgrund dessen war die Tragezeit auf bis zu 4 Stunden beschränkt, um hypoxiebedingte Komplikationen im Bereich des Auges zu vermeiden. Mittlerweile können formstabile Kontaktlinsen aus Silikonacrylat-flourokarboncopolymer hergestellt werden, bei dem eine gute Sauerstoffdurchlässigkeit beobachtet wurde [5]. Diese formstabilen Kontaktlinsen haben einen Durchmesser von 8-10 mm und bedecken die Hornhaut in der Regel nicht vollständig [6]. Sie liegen dem Tränenfilm auf und saugen sich nicht fest. Auf diese Weise wird das ständige Unterspülen der Linse mit Tränenflüssigkeit gewährleistet, was in direkter Verbindung mit einer guten Sauerstoff- und Nährstoffversorgung steht. Bei formstabilen Kontaktlinsen handelt es sich um Jahreslinsen, welche nach der individuellen Anfertigung für einen Zeitraum von bis zu drei Jahre getragen werden können [7]. Im Verlauf kann es jedoch zu einer Anpassung der Kontaktlinse an die Hornhaut kommen, wodurch der zu kompensierende Sehfehler nicht mehr ausreichend korrigiert wird. Ein vorzeitiger Austausch der Kontaktlinse ist dann unumgänglich [8].

1.1.2.2 Weiche Kontaktlinsen

Die weichen Kontaktlinsen schmiegen sich wie eine zweite Haut an die Hornhaut des Auges an und überragen mit einem Durchmesser von 12-16 mm den Limbus im Gegensatz zu den bereits beschriebenen formstabilen Linsen [6]. Der Rand der weichen Linse kommt bei geöffnetem Auge unterhalb des Augenlids zu liegen, wodurch sich der Halt der Linse verbessert [9]. Die Beweglichkeit der Linse beim Lidschlag beträgt nur ein Zehntel Millimeter, somit ist der Austausch von Tränenflüssigkeit unterhalb der Linse begrenzt. Dies begründet letztlich die Empfehlung des Herstellers, die angegebene Tragezeit nicht zu überschreiten, damit eine ausreichende Regeneration der Hornhaut möglich ist [10]. Trotz der beschriebenen Nachteile, gelten weiche Kontaktlinsen im Vergleich zu formstabilen Linsen generell als besser verträglich [11]. Weiche Linsen können je nach Herstellerangabe unterschiedlich lange benutzt werden: So unterscheidet man Tages-, Austausch- und Jahreslinsen. Tageslinsen - auch als Einmal- oder *One-day*-Kontaktlinsen bezeichnet [1] – werden einen Tag lang getragen und dann durch eine neue Linse ersetzt, was die Linsenreinigung und -pflege überflüssig macht. Aufgrund dessen sind sie aus hygienischer Sicht den Austausch- und Jahreslinsen deutlich überlegen [12]. Sie bestehen aus einfachen Materialien und sind deswegen nur wenig sauerstoffdurchlässig. Austauschlinsen hingegen, können je nach Herstellerangabe zwei bis vier Wochen getragen werden, bevor sie durch neue ersetzt werden [1]. Demnach müssen sie täglich gereinigt und gepflegt werden, um eine Keimbefestigung und daraus folgende Komplikationen zu vermeiden. Im Verlauf der Nutzung kann es jedoch auch bei forcierter Reinigung und Pflege zu einer Verschlechterung der Linseneigenschaften kommen [13]. Seit den letzten Jahren gibt es neben den Austauschlinsen aus einfachen Materialien auch Artverwandte aus HEMA-Copolymeren und Silikonhydrogel [1]. Unter den oben genannten Kontaktlinsen hat die Jahreslinse die längste Nutzungsdauer. Sie kann, wie bereits beschrieben, auch deutlich über einem Jahr liegen [14]. Jahreslinsen können individuell für jeden Träger angefertigt werden und bestehen heutzutage vor allem aus HEMA-Copolymeren [1]. Abhängig von der Sauerstoffdurchlässigkeit des Herstellungsmaterials können sie bis zu 12 Stunden getragen werden. Aufgrund der langen Nutzungszeit ist eine gewissenhafte Reinigung essenziell, um eine Keimbefestigung oder auch Proteinablagerungen zu vermeiden [14]. Neben den bereits genannten Kontaktlinsentypen existieren auch Korrelate mit einer verlängerten Tragedauer, kurz vT-Linsen. Diese Linsen können Tag und Nacht getragen werden und haben eine hohe Sauerstoffdurchlässigkeit um die Hornhaut vor

hypoxischen Schäden zu schützen [11]. Entweder spricht man hier von „*Extended Wear*“, wobei sich die Linse 7 Tage und 6 Nächte auf der Hornhaut befindet, oder aber von „*Continuous Wear*“ was einer Tragezeit von 30 Tagen und 29 Nächten entspricht. Eine Sonderform der vT-Linsen stellen Therapie- bzw. Verbandslinsen dar: Diese haben keine optische Wirkung, sondern dienen beispielsweise dem Schutz der Hornhaut oder auch als Medikamententräger zur kontinuierlichen topischen okulären Medikamentenapplikation [1].

1.1.3 Kontaktlinseneigenschaften

1.1.3.1 Sauerstoffdurchlässigkeit

Bei der Sauerstoffdurchlässigkeit handelt es sich um eine physikalische Materialeigenschaft, die den Sauerstofffluss unter bestimmten Bedingungen und definiertem Druckunterschied durch das Kontaktlinsenmaterial mit einer Einheitsdicke beschreibt. Sie wird als DK-Wert abgekürzt, wobei „D“ für den Diffusions- und „K“ für den Löslichkeitskoeffizienten steht. Der Diffusionskoeffizient gibt an, wie schnell sich die gelösten Sauerstoffmoleküle im Kontaktlinsenmaterial bewegen. Der Löslichkeitskoeffizient ist hingegen eine Materialkonstante, die die Menge an gelösten Sauerstoffmolekülen im Material angibt [1]. Bei DK-Werten zwischen 80 und 120 liegt eine sehr hohe Sauerstoffpermeabilität vor, bei 50 eine hohe, bei 20 eine mäßige und bei 10 eine niedrige Sauerstoffdurchlässigkeit [11]. Die Sauerstoffdurchlässigkeit wird beeinflusst durch die Dicke und den Wassergehalt der Kontaktlinse [15]. Grundsätzlich gilt: Je dicker die Linse, desto schlechter durchlässig ist sie für Sauerstoff, der DK-Wert verhält sich demnach umgekehrt proportional zur Linsendicke. Bei zunehmendem Wassergehalt kann hingegen eine Steigerung der Sauerstoffpermeabilität verzeichnet werden [11]. Eine hohe Sauerstoffpermeabilität der Linse ist für Kontaktlinsenträger von großer Bedeutung, denn nur so ist eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Auges unter dieser gewährleistet, hypoxische Schäden am Auge werden vermieden und der Tragekomfort wird gesteigert [16].

1.1.3.2 Wassergehalt

Der Wassergehalt einer Kontaktlinse gibt den prozentualen Anteil an Wasser in einer voll hydratisierten Linse an. Man unterscheidet hierbei einen hohen Wassergehalt, bei dem der Anteil über 50% liegt von einem niedrigen Gehalt unterhalb von 50% [11].

Wird die Kontaktlinse auf das Auge gesetzt, kann anfänglich eine Abnahme des Wassergehalts der Kontaktlinse beobachtet werden. Hierbei spielen Faktoren, wie die Linsendicke, die Osmolarität der Aufbewahrungslösung sowie die Linsentemperatur beim Einsetzen in das Auge eine entscheidende Rolle [16]. Diese sogenannte Dehydratation wirkt sich auf die Flexibilität der Linse, die Sauerstoffdurchlässigkeit, den Linsensitz, den Tragekomfort, die Sehqualität und letztlich auch auf die physiologische Funktion der Hornhaut aus [17]. Nach der initialen Dehydratation stellt sich jedoch im Verlauf des Tragens ein recht konstanter Wassergehalt ein. Bei Kontaktlinsen mit einem hohen Anteil an ungebundenem Wasser konnte diesbezüglich eine deutlich stärkere Dehydratation beobachtet werden im Vergleich zu den Korrelaten mit gebundenem Wasser [16]. Außerdem sind bei Kontaktlinsen mit hohem Wassergehalt während des Tragens tendenziell mehr Ablagerungen gegenüber Kontaktlinsen mit niedrigem Wassergehalt beschrieben worden [1].

1.1.3.3 Oberflächenbenetzbarkeit

Die Oberflächenbenetzbarkeit gibt an, wie gut sich der Tränenfilm auf dem Kontaktlinsenmaterial ausbreiten kann [16]. Eine Beurteilung der Benetzbarkeit erfolgt entweder durch den sogenannten Kontaktwinkel oder durch die Beobachtung des Tränenfilms auf dem Linsenmaterial nach dem Blinzeln unter Zuhilfenahme einer Spaltlampe [18]. Je kleiner der Kontaktwinkel, umso besser verteilt sich die Tränenflüssigkeit auf der Linsenoberfläche und die Oberflächenbenetzbarkeit steigt an [17]. Eine hohe Benetzbarkeit des Linsenmaterials steht letztlich in Verbindung mit einem verbessertem Tragekomfort [16]. Durch den Gebrauch von tensidhaltigen Benetzungsmitteln kann der Kontaktwinkel verkleinert und somit die Benetzbarkeit des Linsenmaterials verbessert werden [17]. Dies spielt eine besondere Rolle, denn im Verlauf kann es durch Tränenfilmbestandteile, wie Proteine oder Muzine, zu einer Beeinflussung der Benetzbarkeit kommen, was sich wiederum negativ auf den Tragekomfort der Linse auswirkt [19].

1.1.3.4 Modulus (Materialelastizität)

Der Modulus gibt an, wie widerstandsfähig das Linsenmaterial gegenüber der Deformation durch Zugkräfte ist. Je höher der Modulus, umso steifer ist das Linsenmaterial, was den Tragekomfort für den Träger folglich reduziert. Kontaktlinsen mit einem hohen

Wassergehalt haben einen niedrigen Modulus und werden beim Tragen dementsprechend als angenehmer empfunden [16].

1.1.4 Kontaktlinsenmaterialien

Die erste weiche Kontaktlinse wurde 1961 aus Poly(2-Hydroxyethylmethacrylat), kurz pHEMA hergestellt [20]. Beim pHEMA handelt es sich um ein unlösliches hydrophiles Polymer, welches als dreidimensionales Netzwerk vorliegt. Durch die Einlagerung von Wassermolekülen quillt es auf und bildet ein flexibles Hydrogel [21]. Hydrogele haben einen unterschiedlich hohen Wassergehalt, welcher vom Aufbau des Polymergitters abhängt [22] und sich auf die Sauerstoffdurchlässigkeit der Linse auswirkt - er liegt in der Regel zwischen 24 und 78% [23]. Der Wassergehalt von Kontaktlinsen aus reinem HEMA liegt bei 38%. Nach langen Tragezeiten dieser Linsen konnten im Bereich des Epithels hypoxische Veränderungen beobachtet werden, welche mit einer zu geringen Sauerstoffversorgung der Hornhaut in Verbindung stehen [1]. Durch die Herstellung von HEMA-Copolymeren versuchte man in der Vergangenheit den Wassergehalt und die damit verbundene Sauerstoffdurchlässigkeit zu erhöhen und fügte hierfür Vinylpyrrolidon (HEMA/NVP-Polymer), Glycerolmethacrylat (HEMA/DMA-Polymer) oder Phosphorylcholin (HEMA/PC-Polymer) hinzu [24]. Neben den HEMA-Kontaktlinsen kam es im Verlauf zu der Entwicklung von HEMA-freien Linsen, bei denen anstelle von HEMA Methylmetacrylat (MMA) verwendet wurde [1]. Beim Tragen von Hydrogel-Kontaktlinsen wurde jedoch beobachtet, dass sich der Feuchtigkeitsfilm der Linse innerhalb kurzer Zeit verflüchtigt und konsekutiv die Sauerstoffdurchlässigkeit absinkt. Sie eignen sich demnach nicht bei trockenen Augen oder bei langen Tragezeiten [25]. Um die hypoxiebedingten Komplikationen zu vermeiden, wurden 1999 [26] Silikon-Hydrogel-Kontaktlinsen erstmalig vorgestellt [27]. Man kombinierte hierfür das sauerstoffundurchlässige Polymer mit einem Silikonpolymer [1]. Mit 20 bis 50% [28] liegt der Wassergehalt der Silikon-Hydrogel-Linsen unter dem der reinen Hydrogel-Linsen. Durch das enthaltene Silikon kann jedoch eine sehr gute Sauerstoffdurchlässigkeit erreicht werden, wodurch sich die Tragezeit deutlich verlängert [29].

1.1.5 Ablagerungen auf weichen Kontaktlinsen

Im Verlauf der Gebrauchsperiode können auf den Kontaktlinsen verschiedenste Ablagerungen beobachtet werden. Hierbei handelt es sich entweder um exogene Faktoren aus der Umwelt - beispielsweise Staub und Kosmetika - oder um endogene Faktoren

aus dem Tränenfilm des Trägers [18]. Der Tränenfilm selbst ist aus drei Schichten aufgebaut, einer Muzinschicht, einer wässrigen Schicht sowie einer Lipidschicht. Die Muzinschicht wird von den Becherzellen der Bindehaut sezerniert und grenzt direkt an die Cornea, sie bildet somit die Innere der drei Schichten. Die mittlere wässrige Schicht macht den größten Anteil des Tränenfilms aus und wird komplett von den Tränendrüsen des Auges gebildet [30]. Der Hauptbestandteil des Tränenfilms von immerhin 98% wird von Wasser bedingt. Weitere Bestandteile in dieser Schicht sind Glucose und Sauerstoff, die für die Versorgung der Cornea von großer Bedeutung sind. Aufgrund von fehlenden Blutgefäßen wird diese durch reine Diffusion ernährt. Einen weiteren Anteil dieser Schicht stellen die Proteine Albumin, Lysozym sowie Lactoferrin dar. Eine antibakterielle Wirkung konnte bei den letzten Beiden beobachtet werden, sie tragen somit maßgeblich zur unspezifischen Immunabwehr bei. Die äußere Lipidschicht wird von der Meibomdrüse sezerniert und verhindert das Verdunsten des Tränenfilms. Sie setzt sich aus Cholesterin, Cholesterinestern, Triglyceriden und Phospholipiden zusammen [31]. Neben der Versorgung der Cornea schützt der Tränenfilm diese und die Konjunktiva vor Fremdkörpern, verhindert ein Austrocknen und glättet letztlich die lichtbrechende Oberfläche - eine Unerlässlichkeit im Hinblick auf die resultierende optische Funktion [30]. Neben der Zusammensetzung des Tränenfilms gibt es noch weitere Faktoren, die sich auf Kontaktlinsenablagerungen auswirken wie die Tragedauer, der Grad der Hydrophilie, der Wassergehalt und die Oberflächenladung des Materials [32]. Linsenmaterialien mit einem guten Wasserbindungsvermögen neigen beispielsweise weniger zu Ablagerungen [1]. Fällt das Wasserbindungsvermögen geringer aus, kommt es im Verlauf zu einer stärkeren Dehydrierung der Kontaktlinse und Fremdkörper können sich einfacher am Linsenmaterial festsetzen, was zuvor durch die gebundenen Wassermoleküle verhindert wurde. Kommt es bei Silikon-Hydrogel-Linsen während des Tragens zu einem Wasserverlust, liegt das negativ geladene Kontaktlinsenmaterial frei und ist somit direkt zugänglich für positiv geladene Komponenten aus dem Tränenfilm, wie Proteine und Lipide [19]. Durch die Zugabe von Siloxan kann bei diesem Material die Sauerstoffdurchlässigkeit verbessert werden, jedoch wird es gleichzeitig spröder und die Oberflächenbenetzbarkeit wird herabgesetzt, was die Anfälligkeit für Proteinablagerungen erhöht. Um die Benetzbarkeit zu verbessern, erfolgt eine Zugabe von Fluor, was die Silikon-Hydrogel-Linse gleichzeitig flexibler macht. Nachteilig zu werten ist jedoch die Tatsache, dass durch die Fluorzugabe eine verstärkte Tendenz an Lipidablagerungen beobachtet wird [18]. Durch Ablagerungen auf der

Linse sinkt deren Benetzbarkeit und letztlich auch die Durchlässigkeit für Sauerstoff. Dieser Sachverhalt kann sich beim Kontaktlinsenträger in Form eines Fremdkörpergefühls, eines geröteten Auges, Juckreiz oder einer Visusminderung äußern [1]. Außerdem kommt es durch die Ablagerungen zu einem gesteigerten Infektionsrisiko für den Kontaktlinsenträger, da diese als Nährboden für Bakterien, Viren und Pilze dienen. Einen physiologischen Schutzmechanismus gegen diese potentiellen Krankheitserreger stellen der Tränenfilm und der Lidschlag dar. Bei Kontaktlinsenträgern konnte jedoch festgestellt werden, dass die Zusammensetzung des Tränenfilms verändert und der Lidschluss nur unvollständig sowie in seiner Frequenz reduziert ist. Aufgrund dessen ist die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung einer Infektion bei Kontaktlinsenträgern erhöht. Mit Hilfe einer Spaltlampe können Ablagerungen auf Kontaktlinsen sichtbar gemacht werden. Proteine erscheinen hierbei in Form von mattweißen Belägen, Lipide hingegen verteilen sich tropfenförmig auf der Linsenoberfläche [33]. Eine weitere typische Ablagerung auf weichen Linsen stellen sogenannte „*Jelly bumps*“ dar, welche als kleine weißgraue Rückstände auf der Linsenoberfläche erscheinen. Es handelt sich hierbei um einen wasserunlöslichen Kalzium-Eiweißkomplex [1], der vor allem bei weichen Kontaktlinsen mit hohem Wassergehalt auftritt. Die Komplexe durchdringen die Linsenmatrix und zerstören so das Linsenmaterial [33]. „*Jelly Bumps*“ wachsen ähnlich wie Kristalle aus der Kontaktlinsenoberfläche heraus und führen zu Irritationen im Bereich des Auges [1]. Im Verlauf konnten neben den beschriebenen vielfältigen Ablagerungen auch Verfärbungen vor allem bei weichen Kontaktlinsen beobachtet werden. Diese haben unterschiedliche Ursachen: Zum Beispiel konnten gelbbraunliche Verfärbungen bei Aktiv- oder Passivrauchern, bei Kontakt mit Leitungswasser oder Brandgasen beobachtet werden. Durch bestimmte Kontrazeptiva, Antibiotika, Anabolika oder Vitamin B12 Präparate kam es im Verlauf zu rosa Verfärbungen. Chlorhexamed (CHX), Algenbefall oder der Konservierungsstoff Sorbin begünstigten wiederum eine grünliche Veränderung der Linse [33].

1.1.6 Kontaktlinsenreinigung, -hygiene und -pflege

Eine gute Kontaktlinsenhygiene stellt eine Grundvoraussetzung bei der Prävention von Kontaktlinsenkomplikationen dar. Laut Roth H-W. stehen 60% der Infektionen bei Kontaktlinsenträgern in Verbindung mit mangelhaften hygienischen Bedingungen bei der Kontaktlinsenpflege [34]. Mithilfe der Kontaktlinsenpflege soll das Auge vor Infektionen geschützt werden, außerdem soll die Leistungsfähigkeit der Linse über die festgelegte

Tragedauer hinweg beibehalten und ein möglichst hoher Tragekomfort gewährleistet werden [35]. Sie setzt sich aus mehreren Bestandteilen zusammen, hierzu gehören die Reinigung, die Desinfektion, die Aufbewahrung und die Benetzung der Linse [1]. Bevor die Kontaktlinsen aus dem Auge entfernt werden, ist es wichtig die Hände sorgfältig mit Seife zu waschen, um eine Kontamination zu vermeiden [36]. Bei der darauffolgenden Reinigung werden Ablagerungen, wie Lipide und Proteine aber auch Mikroorganismen von der Linsenoberfläche entfernt [37]. Je nach verwendeter Reinigungslösung erfolgt eine manuelle Oberflächenreinigung bevor die Linse in den Aufbewahrungsbehälter gelegt wird. Hierzu wird sie in die Handfläche gelegt und mit Reinigungslösung benetzt, bevor sie dann für circa 20 Sekunden mit einem Finger in kreisförmigen Bewegungen abgerieben wird [38]. Bei Silikon-Hydrogel-Kontaktlinsen ist dieser Schritt unerlässlich, um Lipidablagerungen von der Oberfläche zu entfernen. Zur Vereinfachung der Kontaktlinsenreinigung wurden sogenannte „No-Rub“-Lösungen auf den Markt gebracht, bei denen dieser Reinigungsschritt komplett entfällt. Bei diesen Lösungen wird teilweise jedoch ein zusätzlicher Abspülschritt empfohlen [39]. Studien haben gezeigt, dass durch das Abreiben pathologische Mikroorganismen besser entfernt werden können als durch alleiniges Einlegen oder Abspülen [40]. Durch die Reinigung kann die Anzahl der Keime auf der Linsenoberfläche bereits um bis zu 99,99% reduziert werden, je nach verwendeter Reinigungslösung und zuvor durchgeführter manueller Reinigung [39]. Bei der Desinfektion werden schließlich potentiell pathologische Mikroorganismen durch die Kontaktlinsenlösung eliminiert [37]. Außerdem ist es wichtig, dass sie über den Zeitraum der Lagerung hinweg dafür sorgt, dass keine neue Kontamination der Linse erfolgt [39]. Während der Aufbewahrung hält die Kontaktlinsenlösung zudem den Feuchtigkeitsgehalt der Kontaktlinsen bis zum nächsten Einsetzen aufrecht [37]. Im Bereich der Kontaktlinsenreinigungsmittel unterscheidet man grundsätzlich die Peroxid-Systeme von den *All-in-One*-Lösungen. Bei den Peroxid-Systemen fungiert Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Wirkstoff und liegt in einer Konzentration zwischen 0,6 und 3% vor [37]. Die Abtötung der Mikroorganismen erfolgt bei diesem System durch eine Oxidationsreaktion [41] welche letztlich durch freie Sauerstoffradikale hervorgerufen wird [37]. Nach der Reinigung muss das H_2O_2 vollständig von der Linsenoberfläche entfernt werden, um mögliche Irritationen des Auges zu vermeiden. Dies erfolgt durch eine Neutralisation, bei der H_2O_2 in Wasser und Sauerstoff umgewandelt wird. Anhand dieses Neutralisationsprozesses werden zweistufige von einstufigen Peroxid-Systemen unterschieden: Beim zweistufigen System handelt es

sich um das Ältere von beiden. Hierbei wird die Kontaktlinse für die angegebene Desinfektionszeit in die H_2O_2 -Lösung gelegt, welche dann vollständig verworfen und durch Neutralisationslösung ersetzt wird [1]. Als Neutralisationslösung kommen entweder Katalase- oder Natriumpyruvatlösungen zum Einsatz [41]. Bleibt der Neutralisationsschritt aus und die Linse wird direkt aus der H_2O_2 -Lösung auf die Hornhaut gesetzt, kann es zu starken lokalen Irritationen kommen. Beim einstufigen Peroxid-System verweilt die Kontaktlinse für den angegebenen Desinfektionszeitraum in der H_2O_2 -Lösung, welche im Verlauf vollständig neutralisiert wird. Die Neutralisation erfolgt entweder durch die Zugabe von einer Katalasetablette oder durch einen Metallkatalysator, der in dem dafür vorgesehenen Kontaktlinsenbehälter bereits enthalten ist [1]. Als Metallkatalysator kann beispielsweise Platin verwendet werden [37]. Mit zunehmender Nutzungsdauer des Kontaktlinsenbehälters kann es im Bereich des Metallkatalysator zur Biofilmbildung kommen, was eine suffiziente Reinigung der Linse erschwert [42]. Außerdem kommt es nicht selten beim Gebrauch von älteren Behältern zu Irritationen des Auges, da der Katalysator verbraucht ist und eine vollständige Neutralisation somit nicht mehr gewährleistet wird [1]. Verschiedene Studien kamen dementsprechend zu der Schlussfolgerung, dass das zweistufige H_2O_2 -System eine deutlich bessere Wirksamkeit gegenüber Kontaminationen aufweist. So wurden diese hinsichtlich ihres Wirkspektrums an Acanthamoeben, welche zu den relevantesten Keratitisserregern zählen, den einstufigen Systemen gegenüber als deutlich potenter klassifiziert [41, 43]. Des Weiteren lösen H_2O_2 -Systeme aufgrund ihrer Konservierungsmittelfreiheit seltener Allergien oder Überempfindlichkeitsreaktionen aus im Vergleich zu *All-in-One*-Lösungen [1, 6, 16]. Vorsicht ist diesbezüglich jedoch bei pH-Wert empfindlichen Linsen geboten, da diese während der Reinigung ihre Form verändern können: So kann es beispielsweise vorübergehend zur Reduktion des Durchmessers sowie des hinteren optischen Radius kommen [39]. Im Gegensatz zu den erhältlichen H_2O_2 -Systemen ist die Nutzung von *All-in-One*-Lösungen mit einem geringeren Zeitaufwand verbunden [37]. Sie vereinen eine reinigende und desinfizierende Wirkung, können zur Proteinlösung eingesetzt werden oder dienen zur Spülung oder Benetzung der Sehhilfen. Auf diese Weise wird die Handhabung für den Kontaktlinsenträger immens vereinfacht [1]. Zu den Hauptbestandteilen der *All-in-One*-Lösungen zählen antimikrobielle Mittel, wie Borsäure, Biguanide und Polyquaternium, die gleichzeitig auch als Konservierungsmittel der Kontaktlinsenlösung fungieren. Ihre Wirkung kann durch die Zugabe von Ethylenediamintetraacetat (EDTA) unterstützt werden, welches Komplexe mit zweiwertigen

Metallionen bildet, die den Mikroorganismen dann nicht mehr für das Zellwachstum zur Verfügung stehen [21]. Phosphat oder Borat hingegen dienen als Puffersystem und sorgen dafür, dass der pH-Wert der Lösung konstant bleibt und möglichst nah am durchschnittlichen pH-Wert der physiologischen Tränenflüssigkeit ($7,45 \pm 0,16$) liegt [39]. Außerdem werden den Lösungen teilweise zusätzliche Tenside, wie beispielsweise Poloxamine zugesetzt [21], welche organische Substanzen entfernen sollen [1]. Bei früheren Untersuchungen der mikrobioziden Wirkung von *All-in-One*-Lösungen wurden keine zufriedenstellenden Ergebnisse generiert [44], weswegen Kontaktlinsenlösungen seit 2001 anhand einer Prüfnorm auf ihre mikrobiozide Wirkung hin getestet werden [45]. In der DIN EN ISO 14729 sind die Verfahren, die Bedingungen und die Kriterien aufgeführt anhand derer die Kontaktlinsenmittel getestet werden. Zuerst werden die Lösungen der Pflegemitteldirektprüfung unterzogen, welche auch als *Stand Alone* Tests bezeichnet werden. Es handelt sich hierbei um einen Inkubationstest, bei dem die Kontaktlinsenmittel über die vom Hersteller empfohlene Einwirkzeit auf fünf bestimmte Mikroorganismenstämme einwirken. Bei den Mikroorganismen handelt es sich um *Pseudomonas aeruginosa* (Global Biosource Center, ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (Global Biosource Center, ATCC 6538), *Serratia marcescens* (Global Biosource Center, ATCC 13880), *Candida albicans* (Global Biosource Center, ATCC 10231) und *Fusarium solani* (Global Biosource Center, ATCC 36031). Nach Ablauf der Einwirkzeit wird dann die jeweilige Abtötungsrate ermittelt. Anhand der Ergebnisse wird letztlich festgestellt, ob eine Kontaktlinsenlösung zur Linsendesinfektion geeignet ist. Hierzu muss diese bestimmte Kriterien erfüllen, welche auch als primäre Kriterien bezeichnet werden. Bei den oben aufgeführten Bakterienstämmen muss es im Verlauf der Einwirkzeit durch die Kontaktlinsenlösung zu einer Reduktion der koloniebildenden Einheiten um 99,9% kommen. Dies entspricht 3 log-Stufen. Bei den Pilzen *Candida albicans* und *Fusarium solani* wird hingegen lediglich eine Reduktion um 90% gefordert. Außerdem sollte es nach dem Vierfachen der Einwirkzeit nicht erneut zu einem Wachstum der Bakterien und Pilze kommen. Kann die Kontaktlinsenlösung den aufgeführten primären Kriterien nicht gerecht werden, wird kontrolliert, ob sie die sekundären Kriterien erfüllt: Hierbei darf während der empfohlenen Einwirkzeit keine Vermehrung der Pilze beobachtet werden, zudem wird vorausgesetzt, dass die Summe der koloniebildenden Einheiten aller drei Bakterienstämme um mindestens 99,999% reduziert wird. Kann die Linsenlösung diesen sekundären Kriterien gerecht werden, wird das zweite Testverfahren, der sogenannte Regimen Test durchgeführt [42]. Beim

Regimen Test handelt es sich um eine Anwendungsprüfung, bei der die Nutzung der Lösung auf Kontaktlinsen identisch zu deren Herstellervorgaben erfolgt [46]. Nachdem die Kontaktlinse mit der Lösung eines der oben genannten Testorganismen kontaminiert wurde, erfolgt deren Reinigung mit einer Kontaktlinsenlösung. Im nachfolgenden Schritt wird dann die Lebendkeimzahl auf jeder Linse ermittelt. Damit die Linsenlösung als „Komponente eines Systems zur Kontaktlinsendesinfektion“ bezeichnet werden kann, sollte die Wiederfindungsrate pro Linse unterhalb von 10 koloniebildenden Einheiten liegen [47]. Schwachstellen der beschriebenen Testungsmethode für Kontaktlinsenlösungen ergeben sich vorwiegend durch die ausschließliche Verwendung von Laborkeimen, dem Ausbleiben von Belastungstests sowie der mangelnde Bezug auf Viren und Akanthamoeben [35].

1.1.7 Kontaktlinsenkomplikationen

Als Kontaktlinsenkomplikationen werden alle pathologischen Veränderungen im Bereich des äußeren Augenabschnitts bezeichnet, die durch die Benutzung von Kontaktlinsen entstehen oder durch diese verschlimmert werden [15]. Wird die Kontaktlinse auf die Hornhaut gesetzt, wird sie vom Auge als Fremdkörper wahrgenommen und es kommt zu physiologischen Abwehrreaktionen [48]. Beispielsweise wurde beobachtet, dass durch das Tragen von Kontaktlinsen die Tränenproduktion gesteigert wird. Auf diese Weise versucht das Auge den Fremdkörper auszuspülen. Im Verlauf sollte sich das Auge jedoch an diesen Zustand anpassen, ansonsten kann es zu einem Tränenmangel kommen, welcher in direkter Verbindung mit einem gesteigertem Infektionsrisiko steht [49]. Aber nicht nur die Menge der Tränenflüssigkeit ändert sich, auch deren prozentuale Zusammensetzung variiert, da beim Einsetzen der Linse auch immer etwas Kontaktlinsenlösung in das Auge gelangt und somit ein Verdünnungseffekt resultiert [50]. Im Bereich der mikrobiellen Augenflora kann eine weitere Umstellung beobachtet werden: Hierbei werden beschriebener Maßen die ursprünglichen Gram-positiven residenten Keime nach und nach durch Gram-negative Erreger ersetzt [47], welche eine erhöhte Resistenz gegenüber Desinfektionsmitteln und Sauerstoffmangel aufweisen [51]. Hinzu kommt, dass durch die Kontaktlinse die Sauerstoffversorgung der Horn- und Bindehaut beeinträchtigt wird. Auf histologischer Ebene äußerte sich dies in einer reduzierten Mitoserate der Hornhautbasalzellen. Die Regeneration der Epithelzellen ist daher vermindert und es kommt zur Entstehung von Mikrozysten, welche die Stabilität der Hornhaut um bis zu 50% reduzieren und konsekutiv pathogenen

Erregern das Eindringen erleichtern [51]. Außerdem steht der Abfall der Sauerstoffkonzentration in direkter Verbindung mit einem Anstieg des Laktat-, Pyruvat- und Kohlenstoffdioxidgehalts in der Tränenflüssigkeit [48]. Im Gewebe bildet sich eine Azidose aus [52], welche die Entstehung eines Hornhautödems zur Folge hat. Durch dieses kommt es folglich zum Verlust von Epithelzellen, wodurch wiederum eine weitere Schwächung der epithelialen Barriere als Pathogenhindernis resultiert [53]. Hinzu kommt, dass unter diesen hypoxischen Bedingungen die Adhäsionsfähigkeit von Keimen, wie beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa*, an epithelialen Hornhautzellen gesteigert ist, was eine klinisch manifeste Infektion begünstigt [54].

Einen weiteren Punkt stellen Ablagerungen auf der Linse dar: Diese verschlechtern deren Sauerstoffdurchlässigkeit im Verlauf der Nutzung weiter – mit den folglich resultierenden, bereits beschriebenen Komplikationen. Außerdem bieten diese einen Nährboden für Mikroorganismen, wodurch deren Besiedelung auf der Linsenoberfläche deutlich begünstigt wird [55]. Des Weiteren kommt es unter der Kontaktlinse zu einem Temperaturanstieg, welcher das relative Sauerstoffdefizit verstärkt und den vorhandenen Bakterien die optimalen Wachstumsbedingungen liefert [44].

Ob es jedoch letztendlich zu der Ausbildung von Kontaktlinsenkomplikationen kommt, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Einen wichtigen Stellenwert in der Prävention nimmt sicherlich die qualifizierte Linsenanpassung ein [34], bei der auf den richtigen Sitz der Linse geachtet und je nach individuellen Bedürfnissen des Linsenträgers ein entsprechendes Linsenmaterial ausgewählt wird. Außerdem sollte eine Anleitung der Linsenhandhabung erfolgen, sowie die Informationsweitergabe über die vom Hersteller vorgeschriebene maximale Tragezeit, Austauschintervalle und Linsenhygiene. Selbstverständlich spielt auch die Compliance des Linsenträgers eine essentielle Rolle. Durch zu lange Tragezeiten ist beispielsweise das Bruchrisiko der Linse erhöht und es kann zu Epitheldefekten kommen, analog zu einer falschen Linsenhandhabung [56]. Durch diese Defekte wird pathogenen Erregern das Eindringen erleichtert, es resultieren potentielle klinisch relevante Infektionen der Orbitaregion [57]. Aber auch die Vernachlässigung der Linsenhygiene kann Komplikationen begünstigen: Neben Anwenderfehlern jeglicher Art wurde beobachtet, dass Linsenmittel Wirkklücken gegenüber bestimmten pathologischen Mikroorganismen aufweisen [58] und teilweise stellen sie in der Vergangenheit sogar die Ursache für Keratitisausbrüche dar. So kam es

beispielsweise 2006 in Singapur, Hongkong und den vereinigten Staaten in Verbindung mit der Benutzung der ReNUMoistureLoc-Lösung von Bausch + Lomb zu einem vermehrten Auftreten von mykotischen Hornhautentzündungen. Als mögliche Auslöser galten die zwei Chemikalien Alexidin und Polyquaternium 10, die zuvor noch nicht als Bestandteil von Mehrzwecklösungen verwendet wurden. Um weitere Komplikationen zu verhindern wurde die Lösung daraufhin wieder vom Markt genommen [55]. Neben den bereits genannten Aspekten spielt die Immunkompetenz des Kontaktlinsesträgers eine weitere ausschlaggebende Rolle. So konnte bei Kontaktlinsesträgern mit Immundefekten, chronisch systemischen Infektionen oder Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus eine erhöhte Komplikationsrate beobachtet werden [34]. Zu der Vielzahl an Komplikationen zählen beispielsweise die Hornhautvaskularisation, die Konjunktivitis und insbesondere die infektiöse Keratitis.

1.1.7.1 Hornhautvaskularisation

Die Prävalenz einer Vaskularisation der Hornhaut ist hoch: So konnte bei 20% der Kontaktlinsesträger eine derartige Komplikation diagnostiziert werden [59]. Ätiologisch sprossen hierbei Blutgefäße aus der Bindehaut in die gewöhnlich gefäßfreie Hornhaut ein, wodurch vor allem im fortgeschrittenen Stadium Sehstörungen resultieren [60]. Ursächlich für die Vaskularisation ist neben dem Anstieg der Laktatkonzentration die Ausbildung eines Hornhautödems aufgrund von einer beeinträchtigten Sauerstoffversorgung der Hornhaut. Zum Anstieg der Laktatkonzentration kommt es durch die Störung des oxidativen Stoffwechsels und durch die prostaglandinbedingte Einwanderung von Leukozyten [61]. Gerade bei Langzeitträgern von weichen Kontaktlinsen konnte eine hohe Prävalenz für Hornhautvaskularisationen beobachtet werden [59].

1.1.7.2 Konjunktivitis

Bei der Konjunktivitis hingegen kommt es aufgrund von mangelnder Hygiene, überlanger Tragezeiten oder einer Veränderung der mikrobiologischen Flora zur Entzündung der Bindehaut [34]. Diese kann sich in Form von einer Rötung des Auges, verstärktem Tränenfluss, Juckreiz, Brennen, Fremdkörpergefühl oder Schmerzen äußern. Zu den Erregern zählen neben Bakterien auch Viren, Pilze und Parasiten [62]. Eine Ausnahme stellt die gigantopapilläre Konjunktivitis dar, welche durch eine allergische Reaktion verursacht wird und häufig mit dem Tragen von Kontaktlinsen in Verbindung steht. Als

Allergene können denaturierte Proteine auf der Kontaktlinsenoberfläche, Konservierungsstoffe aus der Linsenlösung oder das Linsenmaterial selbst fungieren [34]. Im Bereich der tarsalen Bindehaut des Oberlids kommt es zu einer Papillenhypertrophie. Je nach Lokalisation der Papillen subsummiert man hierbei in die generalisierte oder die lokalisierte Form. Die generalisierte Form tritt vor allem in Verbindung mit der Nutzung von Hydrogel-Kontaktlinsen auf und definiert sich über das Auftreten von hypertrophen Papillen im Bereich des gesamten Tarsus. Bei der lokalisierten Form treten die Riesenpapillen vor allem bei Trägern von Silikon-Hydrogel-Kontaktlinsen im Bereich der Lidkante auf [35]. Die gigantopapilläre Konjunktivitis äußert sich klinisch in Form einer Hyperämie der Bindehaut, einem Bindehautödem, Juckreiz, einer verminderten Linsentoleranz oder auch in der Bildung von mukösem Sekret bei der Kontaktlinsenentfernung [63] und tritt vorwiegend bei Allergikern auf [35]. Zudem konnte bei den Trägern von Silikon-Hydrogel-Linsen eine größere Neigung zur Ausbildung dieser Komplikation beobachtet werden im Vergleich zu Anwendern von Hydrogellinsen [59].

1.1.7.3 Infektiöse Keratitis

Die häufigste und gefährlichste Kontaktlinsenkomplikation ist jedoch die infektiöse Keratitis [35, 64]. Es wurde beobachtet, dass das Risiko an einer Keratitis zu erkranken bei den Trägern von weichen Kontaktlinsen 14 - mal höher ist als bei denen von harten Linsen. Außerdem steigt das Erkrankungsrisiko deutlich an, wenn die Linsen länger als 6 Stunden getragen werden [44]. Eine Keratitis kann sich in Form von Lichtscheu, Vaskularisation, erhöhter Tränenproduktion, Blepharospasmus, Hornhautödem, ziliärer und konjunktivaler Gefäßerweiterung, Epitheldefekt und Ulzeration äußern [34]. Durch das Zusammenspiel verschiedener Faktoren wird die Entstehung der Keratitis bei Kontaktlinsenträgern begünstigt. So konnte bei alternden Kontaktlinsen eine Rissbildung beobachtet werden, die aufgrund der Zersetzung des Polymers im Lauf der Nutzungsperiode erfolgt. Keime adhären nun an diesen Rissen und gelangen somit in das Auge. Aber nicht nur dieser Aspekt erleichtert den Mikroorganismen die Haftung, sondern auch die Tatsache, dass sich die negative Oberflächenladung des Linsenmaterials im zeitlichen Verlauf vermindert [51]. Außerdem kann es durch das Einsetzen und Entfernen der Kontaktlinse im Bereich der Hornhaut zu kleinen Verletzungen kommen, über welche den anhaftenden Keimen das Eindringen erleichtert wird [44]. Zusätzlich kommt es unter der Kontaktlinse zu einem Temperaturanstieg, der sich

positiv auf das Wachstum von Krankheitserregern auswirkt. Nicht nur die kontaktlin-
senassoziierte Temperaturerhöhung hat somit einen positiven Einfluss auf die Bakte-
rien, sondern natürlich auch der hypoxische Zustand unter der Linse: Dieser führt zu
einer Steigerung der Adhäsionsfähigkeit bestimmter Keime, beispielsweise der des
Nasskeims *Pseudomonas aeruginosa* [47]. Dieser Bakterienstamm ist der häufigste
Erreger der infektiösen Keratitis, nahezu 80% dieser Infektionen lassen sich beschrie-
benermaßen auf diesen zurückführen [35]. Weitaus seltener werden Hornhautinfektio-
nen durch Viren, Pilze oder Parasiten verursacht [57]. Jedoch konnte in den letzten
Jahren eine Zunahme der Pilz- und Akanthamöben-Keratitiden beobachtet werden,
was auch mit der Vermarktung der ReNUMoistureLoc-Lösung von Bausch + Lomb in
Verbindung stand. Pilzkeratitiden werden in den meisten Fällen durch *Candida albi-*
cans und *Fusarien* verursacht und treten vor allem in Entwicklungsländern oder im
tropisch beziehungsweise subtropischen Klima auf. Als Hauptrisikofaktor für die Ent-
stehung einer Pilzkeratitis sind Traumata im Bereich der Hornhaut aufzuführen [55].
Bei der Akanthamöbenkeratitis stellt das Tragen von kontaminierten Kontaktlinsen den
Haupttrisikofaktor dar. So bestand in den vereinigten Staaten bei 85% der aufgetrete-
nen Fälle ein Zusammenhang zur Kontaktlinsenapplikation [59]. Ausschlaggebend ist
vor allem der Aspekt, dass bei den meisten Kontaktlinsenlösungen keine Wirkung ge-
gen Akanthamöbenzysten nachgewiesen werden konnte oder deren Verwendung die
Entstehung einer Akanthamöbenkeratitis begünstigte, wie beispielsweise die AMO
Complete MoisturePlus Lösung, die daraufhin wieder vom Markt genommen wurde
[55].

1.2 Kaltes atmosphärisches Plasma

1.2.1 Definition von kaltem atmosphärischem Plasma (KAP)

Bei Plasma handelt es sich um ein ionisiertes Gas, welches neben fest, flüssig und gasförmig den vierten Aggregatzustand von Materie darstellt [65]. Durch Energiezufuhr kann ein Aggregatzustand in den Anderen überführt werden; so schmilzt Eis beispielsweise bei Wärmezufuhr und es entsteht Wasser. Wird dieses Wasser dann bis auf 100 °C erhitzt, fängt es an zu kochen und geht somit in den gasförmigen Zustand, Wasserdampf über [66]. Durch eine weitere Zugabe von Energie kommt es in dem Gas zu Ionisationsprozessen und Plasma entsteht. Im festen Zustand liegen die Moleküle geordnet in einer bestimmten Struktur vor und es kommt kaum zu Teilchenbewegungen. Durch die Energiezufuhr nimmt die Teilchenbewegung zu und die Abstände zwischen den einzelnen Molekülen vergrößern sich. Eine freie Bewegung der Teilchen ist erst im gasförmigen Zustand möglich. Wird dem gasförmigen Aggregatzustand nun weiter Energie in Form von Wärme oder starken elektrischen Feldern zugeführt, so entsteht Plasma. Hierbei werden Elektronen aus der Hülle der Moleküle herausgelöst und positiv geladene Ionen, sogenannte Kationen entstehen. Aufgrund dessen, ist Plasma elektrisch leitfähig [67]. Die entstandenen Kationen können im Verlauf mit den vorliegenden Elektronen reagieren und neutrale Atome entstehen, man spricht dann von einer Rekombination [68]. Die zuvor aufgenommene Energie wird dann in Form von elektromagnetischen Strahlen frei. Beispielhaft hierfür wäre die UV-Strahlung, Infrarotstrahlung, sichtbares Licht oder auch elektrische Felder. Generell gilt, je kleiner die Wellenlänge, desto energiereicher ist die emittierte Strahlung [69]. Anhand bestimmter Eigenschaften können verschiedene Plasmen voneinander unterschieden werden: So unterscheidet man im Hinblick auf den Druck zwischen Hoch-, Atmosphären- bzw. Normal- und Niederdruckplasmen. Hierzu wird Bezug zum atmosphärischen Druck auf Meereshöhe genommen, dieser beträgt 101325 Pa. Von kaltem Plasma ist die Rede, wenn dessen Temperatur bei circa 40 °C liegt, wohingegen heißes Plasma Temperaturen von mehreren tausend Grad erreichen kann [70]. Liegen in einem Kubikmeter Plasma weniger als 100 Elektronen vor, so wird es als dünnes Plasma bezeichnet, dickes Plasma hingegen beinhaltet bei selber Menge mehr als 10^8 Elektronen [71]. Bei KAP handelt es sich um ein unter Atmosphären- bzw. Normaldruck entstandenes Plasma, dessen Temperatur bei ungefähr 40 °C liegt.

1.2.2 Herstellung von KAP

Man unterscheidet thermische und nichtthermische Plasmaquellen. Da die thermischen Plasmaquellen zur Herstellung von heißem Plasma dienen, werden sie nur der Vollständigkeit halber genannt. Nichtthermische Plasmaquellen können sowohl heiße als auch kalte Plasmen generieren [67]. Die Temperatur des Plasmas setzt sich zusammen aus den thermischen Bewegungen der Elektronen und der Atome bzw. Ionen, die auch als schwere Teilchen bezeichnet werden. In einem heißen Plasma kommt es zu starken Zusammenstößen zwischen Elektronen und den schweren Teilchen, woraus eine hohe Teilchendichte resultiert. Alle Teilchen befinden sich in einem thermischen Gleichgewicht und es werden Temperaturen von mehreren tausend Grad erreicht. Bei kalten Plasmen hingegen wird kein thermisches Gleichgewicht aller Teilchen erreicht und die Temperatur der schweren Teilchen liegt mit 25 bis 45 °C deutlich unter der der Elektronen [72]. Die Herstellung von KAP kann durch indirekte oder direkte Plasmaquellen erfolgen, sowie durch Hybridsysteme. Bei den indirekten Plasmaquellen erfolgt die Plasmageneration in einem Hohlraum zwischen zwei Elektroden. Resultierende reaktive Spezies werden dann mittels Gasstroms in die Umgebung transportiert. In diesem Fall kommt die zu behandelnde Oberfläche nur in Kontakt mit dem Effluenten und nicht direkt mit dem Plasma [70]. Als austreibendes Gas finden Edelgase wie Argon oder Helium Verwendung, aber auch Stickstoff, Sauerstoff oder ein Gasgemisch kann genutzt werden [73]. Zu den indirekten Plasmaquellen gehören Plasmanadeln, -jets (vgl. Abbildung 1c) oder -flammen. Ein direkter Kontakt zwischen KAP und der zu behandelnden Oberfläche kann mit den direkten Plasmaquellen erreicht werden. Bei diesen Plasmaquellen ist mindestens eine der Elektroden durch ein Dielektrikum isoliert, welches elektrische Durchschläge verhindert sowie den maximalen Stromfluss drosseln soll [67]. Bei diesen dielektrisch behinderten Entladungen (DBE) kann zwischen Volumen-DBE und Oberflächen-DBE unterschieden werden. Beim Volumen-DBE wird das Plasma in einem Spalt zwischen der dielektrisch abgeschirmten Elektrode und der zu behandelnden Oberfläche generiert (vgl. Abbildung 1a). Das zu behandelnde Objekt dient in diesem Fall als Gegenelektrode und ist Bestandteil der Entladungskonfiguration. Dies ist beim Oberflächen-DBE nicht der Fall, hier wird das Plasma direkt auf der Oberfläche des Dielektrikums nahe der Elektrode erzeugt (vgl. Abbildung 1b), welche unterschiedlich gestaltet sein kann [73]. Bei der

DBE wird das Plasma direkt an der Luft gebildet. Durch beigefügten Sauer- oder Stickstoff kann die Plasmazusammensetzung noch weiter modifiziert werden [70].

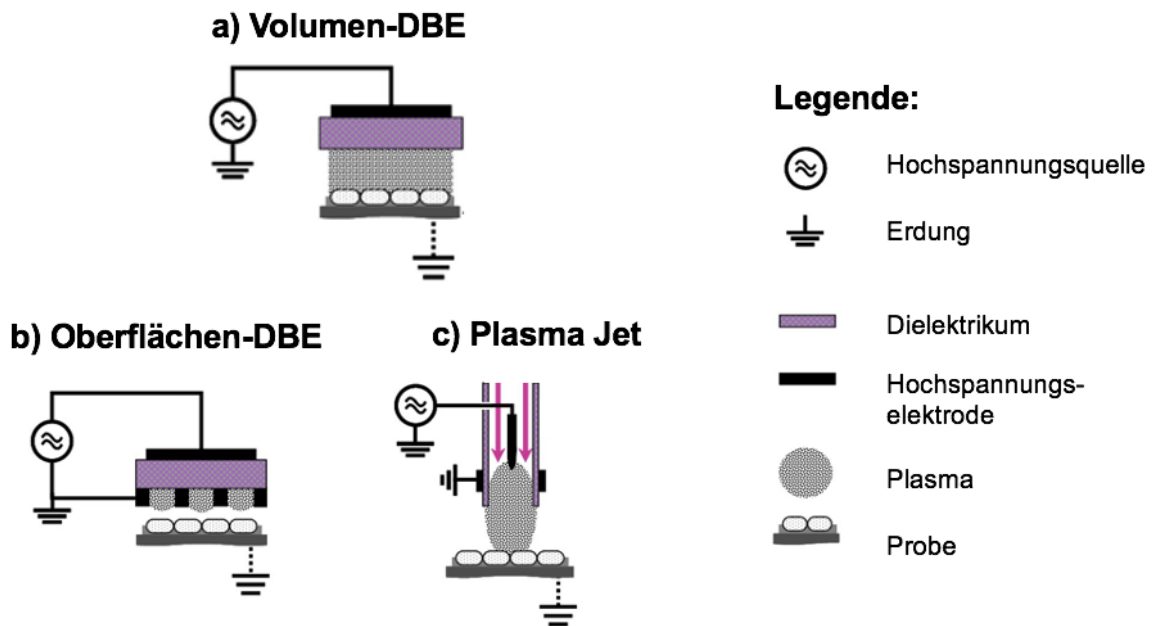


Abbildung 1: Vereinfachte grafische Darstellung des Funktionsprinzips von a) Volumen-DBEs, b) Oberflächen-DBEs und c) Plasmajets; adaptiert an [74]

Bei denen im Rahmen meiner Doktorarbeit durchgeführten Experimenten wurde ein Prototyp des *plasma care®* - Geräts von Terraplasma verwendet (vgl. Abbildung 2). Das Gerät nutzt eine sogenannte Dünnschichttechnologie, kurz SMD, zur Erzeugung von Plasma. Hierbei handelt es sich um eine Weiterentwicklung der Oberflächenmikroentladungstechnologie. Die Plasmaquelle besteht aus einer Hochspannungselektrode, die von einem Dielektrikum umgeben ist, auf welchem sich die gitterförmige, geerdete Elektrode befindet. Durch das Anlegen einer Hochspannung von 3,5 kV kommt es zu Mikroentladungen im Bereich der Gitterelektrode, welche anschließend das Gas ionisieren und somit Plasma generieren [75]. Bei dem vorliegenden Prototyp kann die Frequenz zwischen dem Sauerstoff- (4 kHz) und dem Stickstoffmodus (8 kHz) gewechselt werden. Wie der Name bereits vermuten lässt, werden im 4 kHz Modus vor allem die reaktiven Sauerstoffspezies gebildet, wohingegen der 8 kHz Modus vorrangig reaktive Stickstoffspezies erzeugt. Bei den von uns durchgeführten Versuchen, fiel die Auswahl auf den 4 kHz Modus, da dieser als Standardmodus des käuflichen *plasma care®* - Geräts gilt. Um bei den durchgeführten Versuchen einen standardisierten Abstand zwischen Plasmaquelle und Medium zu generieren, wurde ein Abstandshalter auf das Gerät gesetzt [76].



Abbildung 2: Aufbau des *plasma care*® Geräts von Terraplasma; adaptiert an [77]

1.2.3 Wirkweise von KAP

Neben den entstehenden Ionen und Elektronen basiert die Wirkung von KAP auf verschiedenen chemischen und physikalischen Komponenten (vgl. Abbildung 3).

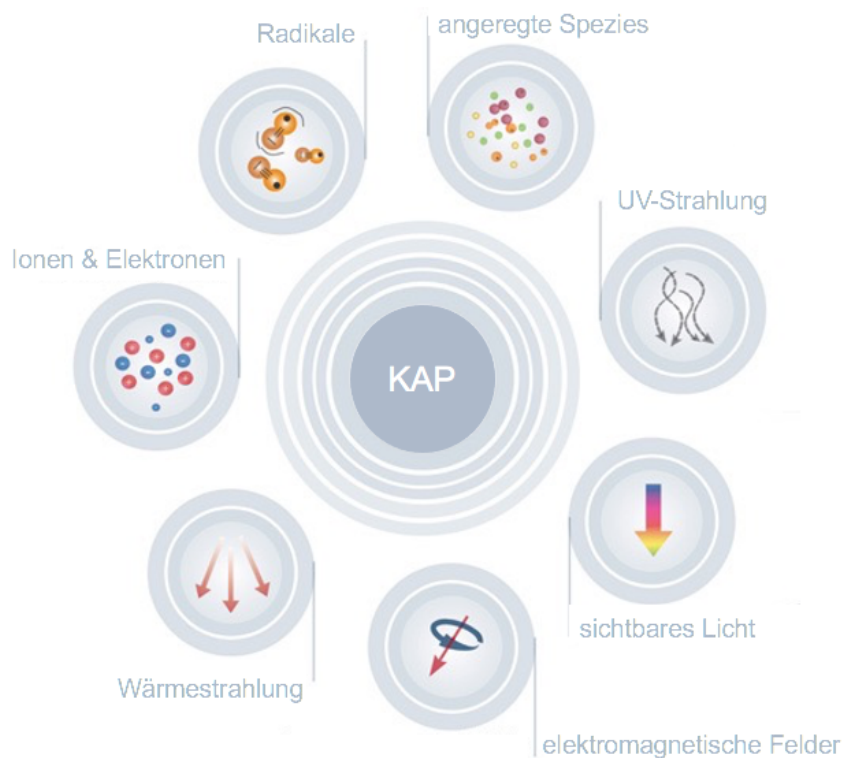


Abbildung 3: Übersicht der verschiedenen Wirkkomponenten von KAP; übernommen aus [78]

Einen maßgeblichen Anteil nehmen hierbei die reaktiven Spezies ein. Es handelt sich um ein Gemisch aus kurzlebigen und reaktionsschnellen Teilchen, wie beispielsweise einzelnen Atomen, deren Ionen, Radikale oder Neutronen. Die jeweiligen Anteile der reaktiven Spezies variieren je nach Plasmaquelle, Arbeitsgas, Energieverbrauch, Lage in Bezug auf die Elektroden und der Behandlungszeit [79]. Da die Plasmaquelle in direkter Verbindung mit der Umgebungsluft steht, werden vor allem reaktive Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) gebildet [70]. Zu den entstehenden ROS zählen neben Superoxiden ($\text{O}_2^{\bullet-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikalen ($\bullet\text{OH}$) auch Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$). Die RNS setzen sich zusammen aus Stickstoffmonoxid ($\bullet\text{NO}$), Stickstoffdioxid ($\bullet\text{NO}_2$) und Peroxynitrit ($\text{ONOO}^{\bullet}$) [73]. Auch auf zellulärer Ebene stößt man auf diese ROS und RNS, wo sie beispielsweise als Signalmolekül Bestandteil von physiologischen Prozessen sind. Durch einen Anstieg der reaktiven Spezies können zellphysiologische sowie -pathologische Mechanismen stimuliert werden [67]. „Bei geringeren Intensitäten der Plasmaeinwirkung wird die Fähigkeit der Zellen zum Umgang mit ROS/ RNS angeregt, z.B. durch eine erhöhte antioxidative Kapazität oder durch eine schnellere Einleitung von Reparaturprozessen. Bei höheren Wirkungsintensitäten wird das antioxidative Potential der Zelle überschritten, die Redoxbalance nachhaltig gestört und der Zelltod eingeleitet.“ [73]. Bei Strahlplasmen, die von einem Edelgas wie Argon, Helium oder Neon angetrieben werden, entstehen außerdem Ionen aus den vorhandenen Edelgasatomen. Diese sind in den meisten Fällen sehr kurzlebig aber energiereich und ihr Vorkommen steht in enger Verbindung mit dem elektrischen Feld, welches die Energie für die Entladung liefert [79]. Eine weitere Wirkkomponente des kalten Plasmas stellt die emittierte Strahlung dar. Hierbei handelt es sich vor allem um UVA- (320 – 400 nm) und UVB-Strahlung (280 – 320nm) [80]. Das elektromagnetische Spektrum des KAP hängt zum einen von der Zusammensetzung des Gases, zum anderen von der Energiedichte des Plasmas ab. Die entstehenden unterschiedlichen elektromagnetischen Strahlen haben verschiedene Eigenschaften und Wirkungen auf Materie. Ultraviolettes Licht, kurz UV-Licht, kann beispielsweise photochemische Prozesse auslösen. Das bedeutet, die Photonen haben je nach Wellenlänge eine Energie zwischen 3,1 und 12,4 eV und sind somit in der Lage chemische Bindungen in organischen Molekülen aufzuspalten [79]. Die bereits bekannte antimikrobielle Wirkung von UV-Licht nimmt bei der Verwendung von Niederdruckplasma einen wesentlichen Anteil bei der Inaktivierung von Bakterien und Sporen ein [81].

Neben der Emission von elektromagnetischen Strahlen werden bei der Plasmaentladung elektrische Felder erzeugt, deren Rolle in der Plasmamedizin noch untersucht werden [79]. Bei der Zündung des Plasmas werden Wechselströme angelegt, weswegen die Feldstärken der entstehenden elektrischen Felder zwischen dem Milli- (kHz-Plasmen), Mikro- (MHz-Plasmen) und Nanosekundenbereich (ns-gepulste Plasmen) schwanken. Die elektrischen Felder sind sehr inhomogen und ihre Stärke hängt deutlich von der Zeit, der Richtung, dem umgebenden Gas sowie dem Entladungszyklus ab. Durch die elektrischen Felder wird die Zell- und Gewebefunktion beeinflusst. So kann es beispielsweise im Bereich der Zellmembran zu einer Veränderung der Durchlässigkeit bis hin zu einem Zellwanddefekt kommen [82]. Bei KAP kann aufgrund der vorhandenen reaktiven Sauerstoffspezies eine synergistische Verstärkung dieser Wirkung erzielt werden. Zuerst kommt es durch das elektrische Feld zur Porenbildung im Bereich der Membran, was durch die vorhandenen reaktiven Sauerstoffspezies erleichtert wird [83]. Durch die entstandenen Poren können ROS nun in das Zellinnere eindringen und dort oxidative Reaktionen begünstigen [84].

Zusammenfassend wird so nun deutlich, dass die Wirkung des KAP auf einer Mischung von verschiedenen Wirkkomponenten begründet ist.

1.2.4 Einsatz von KAP in der Medizin

Die Dekontamination bzw. Sterilisation von medizinisch eingesetzten Instrumenten, die Behandlung von chronischen Hautulzerationen und die onkologische Therapie stellen nur einen kleinen Ausschnitt der Einsatzmöglichkeiten von KAP in der Medizin dar, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

1.2.4.1 Antimikrobielle Eigenschaften von KAP

Laut einer Pressemitteilung des Robert Koch Instituts aus dem Jahr 2019 liegt die Zahl der jährlich auftretenden nosokomialen Infektionen zwischen 400.000 und 600.000 [85]. Als nosokomiale Infektion wird eine Infektion dann bezeichnet, wenn die Ansteckung während eines Krankenhausaufenthaltes oder während einer ambulant durchgeführten medizinischen Behandlung erfolgt [86]. Als häufigste Erreger können *Escherichia coli*, *Clostridium difficile* und *Staphylococcus aureus* nachgewiesen werden [87]. Aber auch antibiotikaresistente Erreger, wie MRSA (*Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus*) führten in Deutschland im Jahr 2013 bereits in 6% der Fälle

zu einer nosokomialen Infektion, welche aufgrund des Resistenzspektrums der Erreger eine fundamentale medizinische Herausforderung darstellt [86]. Die Erreger liegen in der Krankenhausumgebung lange in einer lebensfähigen Form vor und so erfolgt die Übertragung oftmals durch kontaminierte Oberflächen [88]. Durch die Desinfektion sowie die Sterilisation dieser Materialien soll das Infektionsrisiko vermindert und somit das Erkrankungsrisiko minimiert werden.

Bei der Desinfektion kommt es zu einer Abtötung bzw. einer Inaktivierung von Krankheitserregern, wodurch eine Infektion mit diesen deutlich unwahrscheinlicher wird. 84 – 99,9% der Keime werden durch die Desinfektion abgetötet, eine vollständige Keimfreiheit kann also mittels dieses Verfahrens nicht erreicht werden. Neben der chemischen Desinfektion kommen verschiedenste physikalische Varianten zum Einsatz [89]. Bei der chemischen Desinfektion werden je nach Einsatzgebiet biozide Wirkstoffe wie Alkohol, Aldehyde oder Phenole benutzt. Durch trockene Hitze, Dampf oder Strahlung wird die Keimreduktion hingegen bei der physikalischen Desinfektion erreicht. Kommt ein Medizinprodukt jedoch in Kontakt mit Blut, inneren Geweben, Organen oder Wunden so sollte dieses laut Medizinproduktegesetz in einem sterilen Zustand sein. Im Gegensatz zur Desinfektion, welche nur eine limitierte Keimreduktion subsumiert, liegt diese bei Sterilisationsverfahren deutlich höher: Die Wahrscheinlichkeit für das Auffinden von Krankheitserregern auf sterilisierten Oberflächen liegt definitionsgemäß bei kleiner gleich 10^{-6} . Mithilfe von Dampf, Heißluft, Strahlen oder Gas kann diese Keimreduktion bei der Sterilisation technisch umgesetzt werden [90]. Die oben genannten Verfahren der Desinfektion und Sterilisation weisen jedoch deutliche Grenzen auf: So zeigen sich gerade bei den chemisch aktiven Wirkstoffen teils breite Wirkungslücken gegenüber bestimmten Erregern, auch besteht ein gewisses Risiko der Resistenzentstehung. Außerdem stellen viele chemischen Substanzen ein Gesundheitsrisiko dar oder wirken sich negativ auf Oberflächeneigenschaften oder medizinische Geräte aus. Des Weiteren begrenzt sich der Einsatz der thermischen Verfahren auf die thermostabilen Geräte.

Aufgrund dessen hat in den letzten Jahren die Bedeutung von KAP in Bezug auf die Dekontamination im medizinischen Bereich relevant zugenommen. Die Arbeitstemperatur von KAP ist niedrig, weswegen gerade auch die Behandlung von thermolabilen Materialien möglich ist [70]. KAP kann aufgrund der Synergie der verschiedenen Wirkkomponenten Mikroorganismen und Viren auf verschiedene Art und Weise inaktivieren

und abtöten. Durch die Plasmabehandlung können Oberflächen von organischem Material befreit werden. Selbst Prionen, deren Dekontamination durch die bisher bekannten Desinfektions- und Sterilisationsverfahren nicht möglich ist, stellen ein mögliches Einsatzgebiet dar [79]. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass Mikroorganismen keine Resistenzen gegen KAP ausbilden und somit auch eine Bekämpfung multiresistenter Keime, wie *MRSA*, möglich ist [91]. Als Wirkkomponenten sind vor allem die reaktiven Spezies und die geladenen Teilchen hervorzuheben, deren gute bakterizide Wirkung erst durch ein Zusammenwirken erzielt wird.

Die UV-Strahlung spielt hingegen nur eine untergeordnete bakterizide Rolle [92]. Zwar kommt es durch die UV-Strahlung in einem Wellenlängenbereich zwischen 220 und 280 nm auf zellulärer Ebene zu oxidativem Stress, welcher sich bei den vorhandenen Bakterien durch DNA-, Protein- und Lipidveränderungen bemerkbar macht und so das Bakterienwachstum hemmen kann [93]. Jedoch muss für einen bakteriziden Effekt eine ausreichend hohe UV-Dosis generiert werden. Oftmals reicht die entstandene UV-Dosis im angegebenen Wellenlängenbereich nicht für das Abtöten von Keimen aus, weswegen die UV-Strahlung nur eine untergeordnete Rolle bei der Keimabtötung durch KAP spielt [92].

Basierend auf den reaktiven Spezies konnte hingegen eine bakterizide Wirkung nachgewiesen werden. Angriffspunkte stellen hierbei beispielsweise die Bakterienmembran und deren Stoffwechsel dar. Eine durch reaktive Spezies hervorgerufene bakterizide Wirkung hängt wiederum von deren Dosis ab und wird folglich erst erreicht, wenn diese in ausreichend hohen Konzentrationen vorliegen [93]. Auch durch die entstehenden geladenen Teilchen, wie Ionen und Elektronen, kann eine Ruptur der Bakterienmembran verursacht werden [94].

1.2.4.2 Behandlung von chronischen Wunden mit KAP

Bei der erfolgreichen Behandlung von Wunden nehmen die Hautdesinfektion und das aseptische Arbeiten einen großen Stellenwert ein, um eine Kontamination und damit verbundene Infektion zu verhindern. Die oben bereits beschriebene keimreduzierende Wirkung von KAP konnte auch bei der Behandlung von Wunden beobachtet werden. Neben dieser fielen jedoch noch weitere Effekte auf, welche die Wundheilung stimulieren und somit selbst die Abheilung chronischer ausgeprägter Wunden ermöglichen. Der Wundheilungsprozess gliedert sich in drei Phasen, die sich zeitlich überschneiden [95]. Sie werden als Entzündungs-, Proliferations- und Umbauphase bezeichnet [96].

Verschiedene Zelltypen wirken auf die Wundheilung ein. Neben den Immunzellen, wie Monozyten, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten, sind zudem Endothelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten beteiligt.

Nach der Gewebeschädigung setzt direkt die Entzündungsphase ein, deren Ziel es ist einen weiteren Blutverlust sowie eine Infektion zu verhindern und devitalisiertes Gewebe zu entfernen [97]. Nach 7 Tagen hat die Entzündung dann ihren Höhepunkt erreicht [98]. In der darauffolgenden Proliferationsphase kann 2 bis 10 Tage nach der Verletzung die Bildung von neuem Gewebe beobachtet werden. Bei der Zellproliferation kommt es neben der Angiogenese zur Migration verschiedener Zelltypen, wie Keratinozyten, Makrophagen und Fibroblasten. 2 bis 3 Wochen nach der Verletzung setzt die letzte Phase, die Umbauphase ein. Je nach Wunde kann diese ein Jahr andauern oder noch länger gehen. Während dieser Zeit stellen sich die Prozesse, die nach der Gewebeverletzung aktiviert wurden, ein und das Ersatzgewebe bleibt übrig. Dieses ist zellarm und besteht zum Großteil aus Kollagen und anderen extrazellulären Matrixproteinen [97].

Die Wundheilung wird von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen reguliert, die ab dem Zeitpunkt der Gewebeverletzung freigesetzt werden. Hierzu gehören beispielsweise der *Transforming Growth Factor β 1* (TGF- β 1) und β 2 (TGF- β 2), *Interleukin 6* (IL-6) und 8 (IL-8) sowie das *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) [96]. Durch den Wachstumsfaktor TGF- β werden die Vorgänge der Wundheilung reguliert; es kommt neben der Chemotaxis von Makrophagen und Fibroblasten zur Aktivierung der Makrophagen, welche daraufhin Signalmoleküle wie Interleukine freisetzen. Diese verstärken dann die Expression von Kollagen und hemmen die Kollagenasen [99]. Auch mithilfe von MCP-1 wird die Migration von Makrophagen reguliert [100]. Bei IL-6 handelt es sich um eine Signalsubstanz des Immunsystems [101], wohingegen IL-8 als lokaler Entzündungsmediator fungiert [102].

Um eine Abheilung von chronisch venösen Ulzerationen zu erreichen, setzt sich die Standardtherapie aus einem kausalen und einem symptomatischen Anteil zusammen. Während bei der kausalen Therapie im Falle von z.B. venös bedingten Ulzera die Kompressionsbehandlung von großer Bedeutung ist, wird bei der symptomatischen Therapie Wert auf Wunddebridement, Wundreinigung und aktive Wundauflagen gelegt. Neben der Standardtherapie im Sinne eines modernen Wundmanagements kommt auch KAP bei der Behandlung von chronischen Wunden zum Einsatz. Die KAP-Behandlung

ist nicht invasiv, örtlich begrenzt und wird von den Patienten als schmerzlos empfunden [103]. Im Gegensatz zu Wundauflagen oder topisch applizierten Substanzen dringt das Plasma in kleinste Poren und schwer zugängliche Wundbereiche ein, wodurch die Behandlung deutlich effizienter gestaltet wird [96]. Des Weiteren wurden durch die KAP-Behandlung bisher keine allergischen Reaktionen hervorgerufen [104]. Auf zellulärer Ebene konnte durch die Behandlung mit kaltem Plasma eine gesteigerte Migration von Fibroblasten ins Wundgebiet beobachtet werden. Infolgedessen wurden vermehrt Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie TGF- β 1/2, IL-6, IL-8 und MCP1 stimuliert und aktiviert, welche die Wundheilung positiv beeinflussen. Durch die gesteigerte Ausschüttung dieser Faktoren wird eine verbesserte Immunabwehr in der Entzündungsphase vermutet [96], so ist bereits nach 4 Tagen der Höhepunkt der Entzündung erreicht und nicht erst nach 7 [98]. Neben den bereits genannten Aspekten wirkt sich die Plasmabehandlung auch auf den pH-Wert aus, welcher absinkt und in einen sauren Bereich verschoben wird [105]. Der physiologische pH-Wert der Haut liegt im sauren Bereich zwischen 4,5 und 5,5 und ist ein Bestandteil des Säureschutzmantels. Durch den Säureschutzmantel wird verhindert, dass Bakterien oder Pilze wachsen [106]. Bei chronischen Wunden kann jedoch ein Anstieg des pH-Wertes auf über 7,3 beobachtet werden. Durch die Plasmabehandlung wird der veränderte pH-Wert wieder gesenkt, was die natürliche Wundheilung unterstützt [107]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Behandlung mit KAP ein wichtiger Bestandteil in der Therapie von chronischen Wunden ist. Die bisherige Standardtherapie könnte also in Zukunft durch den Einsatz von KAP sinnvoll ergänzt werden.

1.2.4.3 Die Wirkung von KAP auf Tumorzellen

Das Ziel bisheriger onkologischer Therapieansätze besteht vereinfacht darin, die vorhandenen Tumorzellen abzutöten wohingegen gesunde Zellen unbeschadet bleiben sollen. Als Therapieformen können an dieser Stelle beispielsweise die Chemo- oder Bestrahlungstherapie aufgeführt werden, bei denen jedoch genauso gesunde Zellen in Mitleidenschaft gezogen werden und es zu teils schweren Nebenwirkungen kommt [108]. Auch die KAP-Behandlung hat verschiedenste Effekte auf Tumorzellen, wie die Induktion von Apoptose oder Nekrose maligner Zellen, eine Verminderung der Tumorzellproliferation und eine damit verbundene Wachstumsinhibition sowie deren Migrationsinhibition [65]. Die Plasmaeffekte hängen ab von der Art der Plasmaentstehung, der Plasmazusammensetzung, der Behandlungsdauer, dem Trägergas, dem Abstand

zwischen der Plasmaquelle und dem Objekt und ob es sich um eine direkte oder indirekte Behandlung handelt [65]. Im Gegensatz zu den bisher bestehenden Therapieformen hat KAP jedoch eine selektive Wirkung auf die Tumorzellen wodurch die gesunden Zellen unbeschadet bleiben. Diese tumorselektive Wirkung lässt sich anhand folgender Aspekte begründen:

Die bei der Plasmabehandlung entstandenen geladenen reaktiven Spezies gelangen über bestimmte Kanäle und Transporter durch die zytoplasmatische Membran in das Zellinnere. Im Gegensatz zu den gesunden Zellen exprimieren die meisten Tumorzellen vermehrt Aquaporinkanäle auf ihrer Zellmembran [109]. Aufgrund dessen wird der passive H_2O_2 -Transport erleichtert [110] und die H_2O_2 -Aufnahmegeschwindigkeit steigt an. Außerdem kommt es durch die Plasmabehandlung zu einer Zunahme von extrazellulärem ROS, welches in die Tumorzelle aufgenommen wird. Da aufgrund des erhöhten Stoffwechsels in Tumorzellen bereits die intrazelluläre ROS-Konzentration erhöht ist, kommt es durch die Aufnahme zu einer schnelleren Überschreitung des tödlichen Schwellenwertes im Gegensatz zu den gesunden Zellen [109]. Auch der Zellzyklus wird durch die KAP-Behandlung beeinflusst, was sich durch einen Arrest der behandelten Zelle in der G2/M-Phase äußert [111]. Da bei Tumorzellen das Zellteilungspotential erhöht ist, werden diese dadurch selektiv stärker beeinflusst als andere Zellen [65]. Des Weiteren kommt es nach der KAP-Behandlung von Tumorzellen zu einem Ca^{2+} -Anstieg im Cytoplasma aus intrazellulären Speichern. Ca^{2+} fungiert als wichtiger Botenstoff, der an der Tumorentstehung und -progression beteiligt ist. Kommt es zu einer andauernden Konzentrationsveränderung, wird das Zellüberleben beeinflusst und es können Signalwege, wie die zelluläre Seneszenz induziert werden [112]. Bei der KAP-Behandlung unterscheidet man die direkte Behandlung von der Indirekten. Während des direkten Verfahrens wirkt KAP unmittelbar auf die Tumorzellen, wohingegen die Tumorzellen beim indirekten Verfahren lediglich mit einem KAP-behandelten Medium in Verbindung gebracht werden. In Bezug auf Tumorzellen stellt die direkte KAP-Behandlung jedoch die effektivere Therapieform dar [113], denn neben den langlebigen reaktiven Spezies entfalten hierbei auch die Kurzlebigen ihre Wirkung ebenso wie die physikalischen Effekte, zu denen UV-Strahlung, Wärme und die elektrischen Felder zählen. Die Zellen können so in einen Aktivierungszustand versetzt werden, in welchem sie besonders empfindlich auf reaktiven Spezies reagieren [114]. Als Schwachstelle dieser Methode kann die begrenzte Eindringtiefe des Plasmas angeführt werden [115]. Es ist somit nur möglich Tumore in den oberen Hautschichten

direkt zu behandeln oder bei Operationen, wenn beispielsweise Tumorzellnester nahe großer Gefäße liegen und eine komplikationslose Entfernung nicht möglich ist. In den KAP behandelten Medien sind vor allem langlebige reaktive Spezies wie H_2O_2 , Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) enthalten [113]. Außerdem reagieren manche Spezies bereits miteinander bevor sie in die Lösung eindringen. Diese KAP-behandelten Medien kommen vor allem zum Einsatz, wenn der Tumor nicht für die direkte Methode zugänglich ist. Die toxische Wirkung der indirekten Methode auf die zu behandelnden Tumorzellen ist jedoch relativ gering [116]. Durch eine Kombination mit anderen Therapieformen, wie beispielsweise der Chemotherapie, kann die Effektivität der indirekten KAP-Behandlung verbessert werden [117]. Die klinische Anwendung der KAP-Behandlung im Bereich der Onkologie begrenzte sich bisher lediglich auf den palliativen Bereich, um beispielsweise bei offenen infizierten Ulzerationen im Kopf-Hals-Bereich eine Keimreduktion und einen positiven Effekt auf die Wundheilung zu erzielen [115]. Als Vorteile der KAP-Behandlung in der Krebstherapie kann neben der Tumorspezifität außerdem die Schmerzfreiheit und die geringe Anzahl an Nebenwirkungen aufgezählt werden [65].

Neben den oben genannten Einsatzgebieten des KAP in der Medizin erfolgt außerdem bereits eine vielfältige Nutzung in der Zahnmedizin, beispielsweise in der Periimplantitis- und Kariestherapie aber auch in der Endodontie [119, 120]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Plasmamedizin ein sehr umfassendes Gebiet ist, das mit großer Wahrscheinlichkeit auch in den nächsten Jahren noch weiter an Bedeutung gewinnt.

1.2.5 Einsatz von KAP in der Ophthalmologie

Um kaltes atmosphärisches Plasma bedenkenlos im Bereich der Ophthalmologie einsetzen zu können, ist es von großer Bedeutung zuerst einmal die Wirkung von KAP auf das Auge zu analysieren. Dazu führten verschiedene Forschungsgruppen histologische Untersuchungen an explantierten Hornhäuten und Schweineaugen durch, nachdem sie diese mit kaltem Plasma behandelt hatten [121]. Hierbei wurden keine histologischen Veränderungen der Hornhaut, der Linse oder der Iris festgestellt. Auf zellulärer Ebene konnte innerhalb der konjunktivalen Fibroblasten und Keratinozyten ein zeitlich begrenzter Anstieg von ROS detektiert werden, welcher nach 12 – 24 Stun-

den wieder auf den Ausgangswert abfiel [121]. Da neben den genannten histologischen Aspekten die Durchlässigkeit der Hornhaut und der Linse von immenser Bedeutung für das uneingeschränkte Sehen sind, wurde kontrolliert inwieweit die KAP-Behandlung eine Eintrübung dieser Strukturen begünstigt. Nur so konnten mögliche negative Auswirkungen von KAP auf die Sehleistung ausgeschlossen werden. Neben den reaktiven Spezies entsteht bei der Plasmageneration, wie bereits unter 1.2.3 erwähnt UVA- und UVB-Strahlung, deren schädliche Wirkung auf das Auge bereits bekannt ist [122]. Diese kann sich in Form von einer Photokeratitis, einer Makuladegeneration oder einem Katarakt äußern [123]. Mit dem Einsatz der indirekten Plasmabehandlung ließe sich dieses Risiko jedoch vermeiden [124]. Neben der UVA- und UVB-Strahlung gibt es weitere Ursachen für die Entstehung einer Keratitis, wie beispielsweise Bakterien, Viren, Pilze und Protozoen. Bei den bakteriellen Erregern handelt es sich vor allem um *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*, die mittels lokalem Breitbandantibiotikum eliminiert werden können [125]. Durch die zunehmende Resistenzbildung der Bakterien gegenüber Antibiotika wird eine erfolgreiche Behandlung jedoch erschwert [126]. Bei der Behandlung mit KAP konnten auf bakterieller Ebene bisher noch keine Resistenzen festgestellt werden, was dessen Einsatz bei der Keratitistherapie sehr attraktiv erscheinen lässt. Mithilfe eines Hornhautstromagewebemodells konnte nach 5-minütiger direkter KAP-Behandlung außerdem eine bakterizide Wirksamkeit gegen *Escherichia coli* bis zu einer Tiefe von 200 µm nachgewiesen werden [127], was das Plasma auch für die Therapie der tiefen Keratitis befähigen würde. Neben Bakterien lösen auch Viren, wie Adeno- oder Herpes-Simplex-Viren (HSV) Keratitiden aus. Bei zuvor mit HSV-1 infizierten kornealen Epithelzellen und Hornhäuten konnte durch die Behandlung mit KAP eine dosisabhängige Reduktion des zytopathischen Effekts, der viralen Genomreplikation sowie der Gesamtproduktion viraler Nachkommenschaft beobachtet werden [124]. Eine weitere Form stellt die Akanthamöbenkeratitis dar, die vor allem bei Kontaktlinsenträgern auftritt [128]. Bei den Akanthamöben handelt es sich um opportunistische Erreger, die in der Natur ubiquitär verbreitet sind. Sie können entweder in der aktiven Form, dem Trophozoitenstadium, vorliegen oder unter lebenswidrigen Umständen in die hochresistente ruhende Überdauerungsform, das Zystenstadium, übergehen [129]. Im Zystenstadium sind Akanthamöben auch gegenüber Desinfektion oder Austrocknung unempfindlich, was eine suffiziente Reinigung von Kontaktlinsen mittels Mehrfachlösung unmöglich macht. So bleiben sie auch nach Jahrzehnten noch lebensfähig und pathogen [130], was mit einem teilweise

fehlenden Ansprechen auf gegenwärtig verfügbare Medikamente verbunden ist [131] und somit die Behandlung mit KAP interessant macht. Erstaunlicherweise konnte herausgefunden werden, dass KAP sowohl die Akanthamöben im Trophozoitenstadium als auch im Zystenstadium inaktivieren kann und diese Fähigkeit auch auf Kontaktlinsenmaterial an den Tag legt [129]. Zudem ermöglichten plasmabehandelte Hydrogele, welche auf infizierten Spenderhornhäuten gelegt wurden, eine potente Inaktivierung von Akanthamöben [131].

Ein weiteres Einsatzgebiet von KAP stellt die Behandlung der Kontaktlinse selber dar, durch welche die Oberflächeneigenschaften verbessert werden. Auf diese Weise lässt sich der Tragekomfort für den Kontaktlinsenträger steigern. Es kommt zu einer Entfernung von Überresten aus dem Herstellungsprozess, ohne dass das Grundmaterial verändert wird [19]. Außerdem wird während des Vorgangs der Benetzungswinkel der Kontaktlinse reduziert, wodurch die Benetzbarkeit der Kontaktlinse und somit das Tragegefühl im Auge verbessert wird [132]. Neben der gesteigerten Benetzbarkeit konnte eine Verringerung der bakteriellen Adhäsion [133], eine Reduktion von Protein- und Zellablagerungen [134], sowie eine erhöhte Sauerstoffdurchlässigkeit beobachtet werden [135]. Aber auch die sterilisierende Wirkung von KAP auf die Kontaktlinsen ist von großer Bedeutung [134].

Wie bereits unter 1.1.6 erwähnt, haben viele Kontaktlinsenreinigungsmittel eine mangelhafte bakterizide Wirkung, wodurch das Auftreten von schwerwiegenden Komplikationen begünstigt wird. Aufgrund dieses Sachverhaltes stellte sich die Frage, inwieweit und wodurch die Wirkung der Reinigungslösungen verbessert werden kann. KAP konnte in der Vergangenheit gute bakterizide Eigenschaften zugesprochen werden, welche sich bereits auch auf verschiedene Medien übertragen lassen [136].

Diese Beobachtung stellte letztlich die Grundlage für das vorliegende Dissertationsprojekt dar. In diesem wurde untersucht, ob durch die KAP-Behandlung von Kontaktlinsenmitteln und anderen Lösungen, wie NaCl, eine verbesserte Kontaktlinsenreinigung erzielt werden kann. Neben der Analyse der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies direkt nach der KAP-Behandlung wurde auch deren Stabilität über einen Zeitraum von bis zu 4 Wochen beobachtet und analysiert. Des Weiteren wurde die bakterizide Wirkung der plasmabehandelten Lösungen auf *Escherichia coli* in Abhängigkeit von der Einwirkzeit untersucht. Neben der bakteriziden Wirkung wurde auch

die Auswirkung der KAP-Behandlung auf die Reinigungswirkung verschiedener Lösungen gegenüber lipidbeschichteter Kontaktlinsen kontrolliert, bevor abschließend gemessen wurde inwieweit die KAP-Behandlung den pH-Wert der verwendeten Lösungen beeinflusst.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Artikelbezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Plasmagerät:	<i>plasma care®</i> Prototyp	Terraplasma GmbH, Gar- ching, Deutschland
Pipetten:	div. Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	PIPETGIRL	INTEGRA, Biebertal, Deutschland
	Transferpette® 20 - 200 µl	Brand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland
	Transferpette® - 8 elec- tronic 5 – 100 µl	Brand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland
Mikroskope:	Axiostar plus	Carl Zeiss Vision, Hall- bergmoos, Deutschland
	Axio Imager Z1	Carl Zeiss Vision, Hall- bergmoos, Deutschland
Werkbank:	Thermo Scientific™ HERASAFE™ 2030i	Fisher Scientific, Pitts- burgh, USA
Waage:	CP225D	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Zentrifugen:	Minispin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	UNIVERSAL 320R	Hettich ZENTRIFUGEN, Tuttlingen, Deutschland
pH-Messgerät:	Five Easy pH/mV	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Schüttelgerät:	Kreis-Schüttler Typ 3017	Lauda-GFL, Lauda-Kö- nigshofen, Deutschland

	TPM-2	SARSTEDT AG & CO. KG, Nümbrecht, Deutschland
Magnetrührer:	uniSTIRRER 1	LAB LOGISTICS GROUP GmbH, Meckenheim, Deutschland
Spektrometer:	SPECORD® 50 Plus	Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland
Multifunktions- Plattenleser:	<i>Varioscan Flash</i>	Thermo Fisher, Schwerte, Deutschland
Färbekammer:	Färbekammer Stain- Tray™ Deckel schwarz, Passend für: 20 Objektträger	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

<u>Hersteller</u>	<u>Artikel</u>
Bausch + Lomb, Rochester, USA	<i>Biotrue® ONEday lenses</i> , PWR - 1,00
BEMIS FLEXIBLE PACKAGING, Neenah, USA	PARAFILM® LABORATORY FILM 4 IN.X 125 FT.ROLL
B. Braun, Melsungen, Deutschland	Injekt® solo Spritze 20 ml Luer exzentrisch PVC-frei 100 X 20 ml Injekt®-F Feindosierungsspritzen 1 ml ohne Kanüle
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Rotilabo®-Reaktionsgefäße PP, farblos, 1,5 ml
Corning Incorporated, New York, USA	Cell culture plate 96 Well Primaria™ Easy Grip Cell Culture Dish
Fisher Scientific, Pittsburgh, USA	FisherBiotech® ProbeON™ Plus Microscope Slides Charged and Precleaned FisherBiotech® ProbeON™ Plus Microscope Slides Charged and Precleaned
Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland	Cell culture microplate, 96 well, PS, F-Bottom (Chimney well), µClear®, Black

	CELLreaktor™ Röhrchen mit Filterober- teil CELLSTAR® Tubes 15 ml CELLSTAR® Tubes 50 ml Reaktionsgefäß 5 ml, pp, natur, ange- hängter Deckel
INTEGRA, Biebertal, Deutschland	25 ml Clear Advantage Reagent Reser- voirs 25 ml Reagenz Reservoir für Mehrka- nalpipetten
Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg, Regensburg, Deutschland	Miller-Hinton-Agarplatten
Johnson & Johnson Medical GmbH, Jacksonville, USA	<i>ACUVUE® oasys with HydraLuxe™ 1 - Day Tageslinsen D - 1,00</i>
Pall Corporation, New York, USA	Acrodisc® 32 mm Syringe Filter with 0,45 µm Supor® Membrane
SARSTEDT AG & CO. KG, Nüm- brecht, Deutschland	Container 25 ml 54 x 27 PS + Cap YLW Impfschlingen Küvetten Pipette tip 1000 µl Tip Stack Pack 10 µl Tip Stack Pack 200 µl
VWR International, Radnor, USA	Schnappdeckelgläschen 5 ml

2.1.3 Reagenzien

Hersteller	Substanz
Apotheke Uniklinikum Regensburg, Regensburg, Deutschland	Chlorhexidindigluconat-Lsg 0,2% 100 ml für ZEP Millipore Wasser
Bausch + Lomb, Rochester, USA	<i>Biotrue All-in-one Lösung</i> <i>Boston® Ein-Flaschen-Kombi-Lösung</i>
B. Braun, Melsungen, Deutschland	NaCl 0,9% 500 ml

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Aceton ROTIPURAN® ≥ 99,8%, p.a., ACS, ISO
Fisher scientific GmbH, Schwerte, Deutschland	Gibco DPBS (1 x) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 500 ml
La Española, Sevilla, Spanien	Natives Olivenöl Extra
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	MUELLER-HINTON broth
MPG&E Handel und Service GmbH, Bordesholm, Deutschland	<i>Eyemax24 Kontaktlinsenlösung</i>
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Dihydrorhodamin 123 ≥ 95% Ethanol ROTIPURAN® ≥ 99,8%, p.a. Fluorometric Hydrogen Peroxide Assay Glycerol (Glycerin) Minimum 99% n-Hexan Nile-Red Nitrite/ Nitrate Assay Kit colorimetric Wasserstoffperoxid-Lösung 30% (w/w) in H ₂ O, contains stabilizer

2.1.4 Bakterienstamm

Escherichia coli atcc. 25922

2.2 Methoden

2.2.1 KAP – Behandlung von verschiedenen Lösungen

Im Rahmen der Versuche wurden verschiedene Lösungen mit KAP behandelt. Neben Millipore Wasser (MP), physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) und phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) wurden drei, hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, unterschiedliche Kontaktlinsenreinigungsmittel verwendet. Hierbei handelte es sich um die *Biotrue All-in-one Lösung* von Bausch + Lomb (BT), die *Boston® Ein-Flaschen-Kombi-Lösung* von Bausch + Lomb (B&L) und die *Eyemax24 Kontaktlinsenlösung* vom MPG&E Handel (EM). Mittels Pipette wurden jeweils 2,5 ml von den oben genannten Lösungen in eine Zellkulturschale (*Primaria™ Easy Grip Cell Culture Dish*) gegeben. Im darauffolgenden Schritt wurde die gefüllte Zellkulturschale samt Rührfisch auf den Magnetrührer platziert, welcher zuvor auf 150 – 200 Umdrehungen pro Minute eingestellt wurde. Als Einstellung des Plasmageräts wurde bei allen durchgeführten Versuchen eine Frequenz von 4 kHz genutzt. Je nach Versuchsaufbau variierte die Dosis des kalten atmosphärischen Plasmas (KAP) zwischen 1, 2, 5 und 10 Minuten. Mitsamt Abstandshalter wurde die Plasmaquelle über die Zellkulturschale positioniert und die KAP-Behandlung wurde begonnen. Da der Durchmesser der Zellkulturschale dem des Abstandhalters entsprach, wurde durch dessen Aufsetzen ein geschlossenes System geschaffen, was das Entweichen der Plasmakomponenten verhinderte.

2.2.2 Bestimmung von reaktiven Spezies im Kurz- und Langzeitversuch

Nach der KAP – Behandlung wurden in den Lösungen auf verschiedene Weise die entstandenen reaktiven Spezies analysiert und mit den jeweils unbehandelten Lösungen verglichen. Der Fokus lag hierbei auf den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-). Je nach Versuchsaufbau erfolgte die Messung direkt nach der KAP – Behandlung (Kurzzeitversuch) oder ein bis vier Wochen später (Langzeitversuch). Beim Langzeitversuch wurden die unbehandelten sowie die behandelten Lösungen bis zum Zeitpunkt der Messung in ein 25 ml Schraubgefäß von Sarstedt umgefüllt und dunkel aufbewahrt. In der Regel erfolgte die Messung der reaktiven Spezies in den Lösungen im Kurzzeit- sowie im Langzeitversuch in dreimaliger Durchführung ($n=3$). Eine Ausnahme stellte jedoch PBS dar. Hier erfolgte die Messung der reaktiven Spezies lediglich mit einer Versuchswiederholung ($n=2$).

2.2.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Mithilfe von Dihydrorhodamin 123 (DRH 123) wurde im Kurz- und Langzeitversuch ROS in KAP – behandelten Kontaktlinsenmittel (KM), PBS, NaCl und MP sowie in den jeweils unbehandelten Lösungen bestimmt. Als Kontaktlinsenlösung wurde in allen Kurz- und Langzeitversuchen ausschließlich die *Biotrue All-in-one Lösung* von Bausch + Lomb verwendet. Bei DRH 123 handelt es sich um einen nichtgeladenen, fluoreszierenden Farbstoff, der als Indikator für ROS eingesetzt wird. Im Beisein von ROS wird DRH 123 zu seinem kationischen Derivat Rhodamin 123 (R123) oxidiert. Da DRH 123 passiv durch Zellmembranen diffundieren kann, wird es beispielsweise zur Messung von oxidativem Stress in Makrophagen verwendet. Aber auch in Flüssigkeiten kann durch diesen Indikator ein Nachweis von ROS erfolgen, was im Kurz- und Langzeitversuch genutzt wurde [137, 138]. Hierzu wurde zuerst DRH 123 in Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration von 5 mmol/l gelöst und in 500 µl *Alliquots* bei -20 °C aufbewahrt. Direkt vor der Versuchsdurchführung wurde die Lösung im Dunkeln aufgetaut und mit PBS im Verhältnis 1:10 verdünnt. Danach wurden jeweils 2 µl der Verdünnung pro Well auf einer schwarzen 96-Well-Platte vorgelegt. Diese wurde im Anschluss dunkel auf Eis gelagert, bevor zu dem verdünnten DRH 123 100 µl der KAP-behandelten oder unbehandelten Lösung gegeben wurden. Bis zur Messung der ROS-Aktivierung mithilfe des *Varioscans* wurde die 96-Wellplatte erneut dunkel auf Eis gelagert. Die Fluoreszenz wurde bei einer Extinktion (Ex) von 505 nm und einer Emission (Em) von 534 nm gemessen. Bei allen durchgeführten Versuchen wurden Duplikate von den verschiedenen Lösungen angelegt.

Statistische Auswertung und grafische Darstellung:

Zuerst erfolgte eine Bestimmung des Mittelwerts und der Standardabweichung aller Werte, die mithilfe des *Varioscans* gemessen wurden. Im darauffolgenden Schritt wurde die ROS-Intensität der plasmabehandelten Lösungen im Vergleich zu der jeweilig unbehandelten Lösung ermittelt. Hierfür wurde die unbehandelte Lösung auf 1 normiert. Die grafische Darstellung und die statistische Auswertung wurden im Anschluss mit Hilfe des Programms *Prism (GraphPad Version 9)* durchgeführt. Für die Statistik wurde die Varianzanalyse (2way ANOVA) mit dem *Dunnett's multiple comparisons test* genutzt, wobei sich die Signifikanzen auf die jeweils unbehandelte Lösung beziehen.

2.2.2.2 Wasserstoffperoxid

Bei H_2O_2 handelt es sich auch um eine reaktive Sauerstoffspezies, welche aus molekularem Sauerstoff gebildet wird. Intrazellulär fungiert H_2O_2 zum einen als Signalgeber, andererseits kann durch eine erhöhte Konzentration oxidativer Stress hervorgerufen werden [139]. Auch im Bereich der Kontaktlinsenreinigung nimmt Wasserstoffperoxid aufgrund seiner bakteriziden Wirkung eine wichtige Stellung ein. Angesichts dessen stellt die Messung von H_2O_2 in den KAP-behandelten Medien einen essentiellen Aspekt in der vorliegenden Dissertation dar. Mithilfe des *fluorometrischen Wasserstoffperoxid-Assay-Kits* (Sigma-Aldrich) wurde der H_2O_2 -Gehalt im Kurz- und Langzeitversuch in den KAP-behandelten und unbehandelten Lösungen ermittelt. Hierfür reagierte ein im Kit enthaltenes Peroxidase-Substrat mit H_2O_2 zu einem infrarot fluoreszierenden Produkt. Dieses konnte mithilfe eines fluoreszierendem Plattenlesegerät, dem *Varioscan*, ermittelt werden [139]. Zu Beginn des Versuchs wurde, analog zu den Vorgaben des technischen Merkblatts, ein Standard erstellt. Hierzu wurden aus 22,7 μl H_2O_2 (3%) und 977 μl Assay Puffer eine 20 mM Stammlösung erstellt, die im nächsten Schritt weiter zu einer 10 μM -Arbeitslösung verdünnt wurde. Diese Arbeitslösung wurde mithilfe des Assay Puffers noch weiter verdünnt, sodass jeweils ein 10, 3, 1, 0,3, 0,1 und 0 μM -Standard entstand. 50 μl von diesen Standards wurde in Form von Duplikaten auf eine dunkle 96-Wellplatte vorgelegt. Im Anschluss erfolgte die Verdünnung der plasmabehandelten Lösungen mithilfe von PBS im Verhältnis 1:20 und 1:50. Jeweils 50 μl von diesen Verdünnungen wurde danach in Form von Duplikaten auf die 96-Wellplatte aufgetragen. Bei den unbehandelten Proben wurde hingegen keine Verdünnung vorgenommen. Nachdem die Proben in die Wells überführt wurden, erfolgte die Zugabe von 50 μl Assay-Puffer in jedes bereits befüllte Well. Abschließend wurde die Aktivierungslösung in die bereits befüllten Wells gegeben, welche zuvor aus 4,75 ml Assay Puffer, 20 μl *Peroxidase-Stock* und 50 μl *Red Peroxidase Substrat* hergestellt wurde. Bevor die Fluoreszenzmessung mittels *Varioscan* erfolgte, wurde die 96-Wellplatte für 30 Minuten dunkel gelagert. Die Fluoreszenz wurde bei $\text{Ex} = 540 \text{ nm}$ und $\text{Em} = 590 \text{ nm}$ ermittelt.

Statistische Auswertung und grafische Darstellung:

Mithilfe des Standards konnte im Anschluss an den Versuch die H_2O_2 -Konzentration der Proben in μM berechnet werden. Von diesen ermittelten Konzentrationen wurden im nächsten Schritt der jeweilige Mittelwert, sowie die Standardabweichung bestimmt. Abschließend erfolgte eine Berechnung der H_2O_2 -Intensität, wobei die unbehandelten

Lösungen auf 1 normiert wurden. Für die grafische Darstellung und die statistische Auswertung wurde das Programm *Prism* (*GraphPad Version 9*) verwendet. Die Statistik wurde mit Hilfe der Varianzanalyse (*2way ANOVA*) in Kombination mit dem *Dunnnett's multiple comparisons test* durchgeführt, wobei sich die Signifikanzen auf die jeweils unbehandelte Lösung beziehen.

2.2.2.3 Nitrat/ Nitrit

Anhand des *Nitrit-/ Nitrat-Assay-Kits* (Sigma-Aldrich) wurde die Nitratkonzentration in den plasmabehandelten sowie in den unbehandelten Lösungen im Lang- wie auch im Kurzzeitversuch bestimmt. Es handelt sich hierbei um einen empfindlichen kolorimetrischen Assay zur Bestimmung von NO-Metaboliten in einem Konzentrationsbereich von 10 – 100 μM . Mithilfe des Griess-Assays wird hierbei die Gesamtkonzentration der NO-Metaboliten in den Lösungen bestimmt. Da durch den Griess-Test nur Nitrit nachgewiesen werden kann, wird Nitrat durch die Nitratreduktase in Nitrit umgewandelt. Das Nitrit reagiert mit dem zugegebenen Sulfanilamid zu einem Diazoniumsalz, welches wiederum durch die sogenannte Azokopplung mit Naphthylethylendiamin zu einem rot-rosa erscheinenden kolorimetrischen Komplex reagiert. Dieser verhält sich proportional zu den vorhandenen NO-Metaboliten [140]. Zu Beginn wurde ein Standard erstellt. Zur Nitritbestimmung wurden hierzu 0, 20, 40 und 100 μl von der NaNO_2 Standard Lösung mit so viel Pufferlösung vermischt, dass sich in jedem Well insgesamt 100 μl befanden. Es wurden jeweils zwei Wells mit den gleichen Mengen befüllt. Für die Nitratmessung wurde anstelle der NaNO_2 Standard Lösung die NaNO_3 Standard Lösung verwendet. Hiervon wurden dann 0, 20, 40 und 80 μl in jeweils zwei Wells gegeben und mit Pufferlösung aufgefüllt, sodass die Gesamtmenge letztendlich 80 μl ausmachte. Auch hierbei wurden Duplikate angelegt. Im darauffolgenden Schritt wurden die plasmabehandelten und unbehandelten Proben aufgetragen. Von den unbehandelten Lösungen wurden zur Nitritbestimmung unverdünnt 100 μl oder 200 μl in jeweils ein Well gegeben, zur Nitratbestimmung waren es 80 μl bzw. 160 μl . Die KAP-behandelten Proben wurden zuvor je nach Plasmabehandlungsdauer mit der im Kit enthaltenen Pufferlösung im Verhältnis 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 verdünnt. Danach wurden von den Verdünnungen 100 bzw. 80 μl in ein Well gegeben. Genau wie der Standard wurden alle Verdünnungen in Form von Duplikaten auf die 96-Wellplatte aufgetragen. Bei der Nitratbestimmung wurden im folgenden Schritt zu der Probe 10 μl *Enzyme Cofactor* und 10 μl *Nitrate Reductase* in jedes Well gegeben bevor die 96-

Wellplatte für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttelgerät platziert wurde. Zur Nitritbestimmung wurde die 96-Wellplatte direkt ohne jegliche Zugabe für 2 Stunden auf das Schüttelgerät gestellt. Nach Ablauf der 2 Stunden wurden alle Proben des Nitrat- und Nitritversuchs gleich weiterbehandelt. Zuerst wurde in jedes bereits befüllte Well 50 µl *Griess Reagent A* gegeben bevor die Platte erneut für 5 Minuten auf das Schüttelgerät gestellt wurde. Danach wurde in jedes Well 50 µl *Griess Reagent B* pipettiert und die Platte abermals für 10 Minuten geschüttelt. Im Anschluss erfolgte mittels *Varioscan* die Messung der Absorption bei 540 nm.

Statistische Auswertung und grafische Darstellung:

Im Anschluss an die Messung mit dem *Varioscan* erfolgte anhand des Standards die Berechnung der Nitrit- und Nitratkonzentration in mM, wie in der Produktbeschreibung erläutert. Von den berechneten Konzentrationen wurde dann der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet, bevor die grafische Darstellung und die statistische Analyse mithilfe des Programms *Prism (GraphPad Version 9)* durchgeführt wurde. Anhand der Varianzanalyse (2way ANOVA) und dem *Dunnett's multiple comparisons test* wurde die statistische Auswertung umgesetzt. Die Signifikanzen beziehen sich hierbei auf die jeweils unbehandelte Lösung.

2.2.3 Bakterizide Wirkung von verschiedenen plasmabehandelten Lösungen auf *Escherichia coli*

2.2.3.1 Herstellung des Mueller-Hinton-Nährmediums

Zur Herstellung des Mueller-Hinton-Nährmediums wurde, wie in den Herstellerangaben beschrieben, das *Mueller-Hinton Broth* in MP aufgelöst und danach bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert.

2.2.3.2 Herstellung der Über-Nacht-Kultur

Zuerst wurden 15 ml des Mueller-Hinton-Nährmediums in ein *Falcon™ Tube* mit Filteroberteil gegeben. Anschließend wurden mithilfe einer Impfschlinge *E. coli* von der Miller-Hinton-Platte aufgenommen und danach mit rührenden Bewegungen im bereits abgefüllten Nährmedium verteilt. Danach wurde das *Falcon™* mit Deckel und *Parafilm®* verschlossen. Über Nacht erfolgte dann die Inkubation bei 37 °C auf dem Kreisschüttler.

2.2.3.3 Etablierungsversuch mit Millipore Wasser zur Bestimmung der nötigen KAP-Dosis

Zuerst wurde die hergestellte Über-Nacht-Kultur 5 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die übrig gebliebene Bakterienkultur mit 5 ml PBS vermischt. Im Anschluss erfolgte die Einstellung der optischen Dichte mithilfe des Spektrometers auf 0,6. Hierzu wurde zuerst die optische Dichte von 1 ml PBS bestimmt, zu welcher dann die der erstellten Bakterienlösung ins Verhältnis gesetzt wurde. Lag diese oberhalb von 0,6, so erfolgte eine weitere Verdünnung der Bakterienlösung mit PBS bis sie dem Wert entsprach. Nach Einstellung der optischen Dichte wurden jeweils 400 µl der Bakterienlösung in sieben 1,5 ml *Eppendorf Reaktionsgefäße* gegeben und erneut bei 5000 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Auch hier wurde der Überstand verworfen und das entstandene Bakterienkultur wurde mit einer der folgenden Lösungen vermischt. Zu den Lösungen zählten MP, 3%iges H₂O₂, 70%iges Ethanol und 0,2%iges Chlorhexamed (CHX). MP wurde zum einen unbehandelt verwendet und fungierte auf diese Weise als Negativkontrolle. Dem gegenüber stand das 2-, 5- oder 10-minütig KAP-behandelte MP. Als Positivkontrolle kamen neben H₂O₂ auch Ethanol und CHX zum Einsatz. Nach der einstündigen Einwirkzeit der Lösungen auf die Bakterien, wurden jeweils 200 µl aus den verschiedenen *Eppendorf Reaktionsgefäßen* entnommen und untereinander in die erste Spalte einer 96-Wellplatte gegeben. Als nächstes wurde eine Verdünnungsreihe mit PBS im Verhältnis 1:10 angelegt. Die verschiedenen Verdünnungen der gleichen Lösung wurden auf eine zuvor in sieben gleichgroße Segmente unterteilte Miller-Hinton-Platte aufgetragen. Pro Segment wurden jeweils drei 20 µl Tropfen der gleichen Verdünnung von 10⁻² bis 10⁻⁸ gegeben. Dieser Schritt erfolgte unter einer sterilen Werkbank. Nachdem die Tropfen getrocknet waren, wurden die Miller-Hinton-Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte dann die Auszählung der entstandenen Bakterienkulturen.

2.2.3.4 Etablierungsversuch mit Kontaktlinsenmittel zur Bestimmung der nötigen KAP-Dosis

Die Versuchsdurchführung wurde in Analogie zu 2.2.3.3 durchgeführt. Anstelle von MP wurde jedoch KM verwendet. KM kam in unbehandelter und in KAP-behandelter Form zum Einsatz. Als KAP-Dosis wurden, wie in 2.2.3.3 beschrieben, 2, 5 und 10 Minuten

ausgewählt. Als Negativkontrolle fungierte PBS, als Positivkontrollen wurden erneut 3%iges H₂O₂, 70%iges Ethanol und 0,2%iges CHX verwendet.

2.2.3.5 Versuch zur bakteriziden Wirkung unterschiedlicher Lösungen auf *E. coli* im unbehandelten Zustand sowie nach KAP-Behandlung

Bei diesem Versuch kamen neben BT noch die Kontaktlinsenreinigungsmittel EM und BL zum Einsatz. Anders als bei den Etablierungsversuchen unter 2.2.3.3 und 2.2.3.4 wurden die unterschiedlichen Lösungen ausschließlich 10 Minuten mit KAP behandelt. Auch die unbehandelten Linsenmittel fanden Verwendung wie bereits in 2.2.3.3 und 2.2.3.4 beschrieben. Als Positivkontrolle wurde diesmal ausschließlich 3%iges H₂O₂ verwendet. Als Negativkontrolle diente in diesem Versuch neben MP auch NaCl. Die beiden Lösungen wurden sowohl im unbehandelten wie auch im behandelten Zustand benutzt. Bis auf diese Aspekte erfolgte die Versuchsdurchführung wie in 2.2.3.3 und 2.2.3.4.

2.2.3.6 Versuch mit verlängerter Einwirkzeit der unterschiedlichen Lösungen auf *E. coli*

Bei diesem Versuch wurde die Einwirkzeit der Lösungen auf die Bakterienkultur von einer Stunde auf 4 bzw. 24 Stunden verlängert. Die Verdünnungsreihe in der 96-Wellplatte wurde also erst 4 oder 24 Stunden nach Zugabe der Lösungen in die 1,5 ml *Eppendorf Reaktionsgefäße* zu der Bakterienkultur erstellt. Die anschließende Versuchsdurchführung und Auswahl von Lösungen entsprach 2.2.3.5.

2.2.3.7 Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Bakterienversuche

Nach der Inkubation über Nacht wurden am nächsten Morgen die entstandenen Bakterienkulturen auf den Miller-Hinton-Agarplatten ausgezählt. Pro Verdünnung wurden jeweils drei Zahlenwerte ermittelt, die für die drei 20 µl Tropfen standen, die pro Verdünnung auf die Platte gegeben wurden. Von diesen wurde dann jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Waren die entstandenen Bakterienkulturen aufgrund von starker Überlagerung nicht einzeln zählbar, so wurden sie von der Auswertung exkludiert. Wenn hingegen keine Bakterienkulturen nachweisbar waren, wurde der Zahlenwert 1 verwendet. Die grafische Darstellung erfolgte mittels *Prism* (*GraphPad Version 9*), mit dem auch die Statistik mittels *Mann-Whitney test* durchgeführt wurde. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die unbehandelte Lösung. Die

unter 2.2.3.3 – 2.2.3.6 erläuterten Versuche wurden insgesamt dreimal durchgeführt (n=3).

2.2.4 Reinigung von lipidbeschichteten Silikon-Hydrogel-Kontaktlinsen mit unterschiedlichen plasmabehandelten und unbehandelten Kontaktlinsenlösungen

Aufgrund der schlechten Lipidablagerungstendenz auf den *ONEday* Hydrogel-Tageslinsen von Biotrue in den Vorversuchen wurden für die folgenden Versuche die Silikon-Hydrogel-Tageslinsen von *Acuvue Oasys with Hydraluxe* verwendet. Da sich während der Etablierungsversuchen eine homogene Lipidbeschichtung der Kontaktlinsen mit Cholesterol erschwert zeigte, wurde in den hier beschriebenen Versuchen natives Olivenöl verwendet, bei welchem eine relativ homogene Verteilung der Lipidtropfen zu erkennen war. Die Kontaktlinsen wurden für 24 Stunden bei Raumtemperatur in Olivenöl aufbewahrt bevor sie mithilfe einer Schere halbiert wurden. Im Anschluss wurden die ölbeschichteten Kontaktlinsenhälften für 24 Stunden in unterschiedliche Reinigungslösungen gegeben. Als Reinigungslösungen diente MP, die *Biotrue All-in-One*-Lösung von Bausch + Lomb, die *Eyemax24 Kontaktlinsenlösung* vom MPG&E Handel, die *Boston® Ein-Flaschen-Kombi-Lösung* von Bausch + Lomb sowie 3%iges H₂O₂. Diese wurden zuvor entweder 10 Minuten mit KAP behandelt oder unbehandelt appliziert. H₂O₂ diente in diesem Versuch als Positivkontrolle und wurde nicht mit KAP vorbehandelt. Nach der Inkubation in der jeweiligen Reinigungslösung wurde der verbleibende Lipidanteil auf den Kontaktlinsen wie bereits von A. D. Pucker und J. J. Nichols mithilfe einer *Nile-Red-Glycerollösung* unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt [141]. Für die Herstellung der *Nile-Red-Glycerollösung* wurde in einem Glasschnappglas *Nile-Red* in Aceton mit einer Konzentration von 1 mg/ml aufgelöst. Die entstandene Lösung wurde nach der Zubereitung dunkel gelagert. Als nächstes wurde eine 75%ige Glycerollösung aus MP und 100%igem Glycerol generiert, welche mit dem zuvor gelösten *Nile-Red* im Verhältnis 1:1000 vermischt wurde. Diese Lösung wurde abschließend mithilfe eines 0,45 µl Filters filtriert und danach dunkel gelagert. Nach der Herstellung der *Nile-Red-Glycerollösung* wurden die Kontaktlinsenhälften aus den verschiedenen Reinigungslösungen entnommen und auf einem Objektträger platziert. Anschließend wurden für 10 Minuten jeweils 100 µl der *Nile-Red-Glycerollösung* auf die Kontaktlinsen gegeben. Hierzu wurden die Kontaktlinsen dunkel gestellt. Nach diesen 10 Minuten Inkubationszeit wurde die *Nile-Red-Glycerollösung* mit 1ml PBS von

der Linsenoberfläche gespült. Um ein Austrocknen der Linse zu verhindern, wurde diese direkt im Anschluss auf dem Objektträger mit 100 µl PBS benetzt. Für die Darstellung unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die vorbehandelten Kontaktlinsen jeweils auf einen neuen Objektträger platziert und das überschüssige PBS wurde mithilfe eines Papiertuches entfernt. Von jeder Linsenhälfte wurden bei 5-facher Vergrößerung zwei Aufnahmen aus verschiedenen Bereichen aufgenommen. Diese Aufnahmen wurden mit der *Axiocam MR* angefertigt. Die beste bildliche Darstellung war im Wellenlängenbereich von 542 bis 554 nm gegeben.

Statistische Auswertung und grafische Darstellung

Zur Auswertung des Versuches wurden alle Lipidkugeln pro Bild ausgezählt und ein Mittelwert sowie die Standardabweichung von den zwei Aufnahmen bestimmt. Es wurden jeweils die plasmabehandelten Lösungen mit den unbehandelten Lösungen verglichen und der prozentuale Anteil an Lipidkugeln auf der Linsenoberfläche bestimmt. Die ermittelte Anzahl an Lipidkugeln in den unbehandelten Lösungen entsprach 100%. Die grafische Darstellung erfolgte mit *Prism (GraphPad Version 9)*, mit dem auch die Statistik mittels gepaartem t-Test durchgeführt wurde. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die unbehandelte Lösung. Insgesamt wurde der Versuch fünfmal (n=5) durchgeführt.

2.2.5 pH-Wert-Messung von plasmabehandelten Lösungen

Bei diesem Versuch wurde der pH-Wert von unbehandelten und KAP-behandelten KM, MP, NaCl und PBS ermittelt. Als KAP-Dosis wurden 1, 2 und 5 Minuten gewählt. Direkt nach der Behandlung wurden die Lösungen in ein 5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gefüllt und der pH-Wert wurde mittels pH-Messgerät (Mettler-Toledo GmbH) bestimmt. Insgesamt wurde die pH-Messung dreimal durchgeführt (n=3).

Statistische Auswertung und grafische Darstellung der pH-Messung:

Danach wurde aus den ermittelten pH-Werten der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Im Anschluss erfolgte mithilfe des Programms *Prism (GraphPad Version 9)* die grafische Darstellung aus den ermittelten Messwerten, sowie die statistische Auswertung mit dem *2way ANOVA Dunnett's multiple comparisons test*. Die Signifikanzen beziehen sich hierbei jeweils auf die unbehandelte Lösung.

3. Ergebnisse

3.1 Messung der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies im Kurzzeitversuch

Im Kurzzeitversuch erfolgte die Messung der Intensität der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) in vier unterschiedlichen Lösungen direkt nach deren Behandlung mit kaltem atmosphärischem Plasma (KAP). Auf diese Weise sollte die unmittelbar nach der KAP-Behandlung messbare Auswirkung auf die RONS-Intensität in den jeweiligen Lösungen im Vergleich zur unbehandelten Lösung ermittelt werden. Bei den Lösungen handelte es sich um Millipore Wasser (MP), eine phosphatgepufferte Lösung (PBS), physiologische Kochsalzlösung (NaCl) und eine Kontaktlinsenlösung (KM). Als KM wurde die *Biotrue All-in-One Lösung* von Bausch + Lomb (BT) verwendet, eine handelsübliche All-in-One-Kontaktlinsenlösung, die zum Pflegen, Reinigen, Desinfizieren, Abspülen und Aufbewahren von Kontaktlinsen geeignet ist. In der Vergangenheit konnten einzelne All-in-One-Lösungen keine zufriedenstellenden antimikrobiellen Wirkungen erzielen. KAP konnten hingegen gute antimikrobielle Eigenschaften nachgewiesen werden, welche sich auch auf Lösungen übertragen ließen [142]. Aufgrund dessen stellte sich die Frage, ob durch eine KAP-Behandlung diese antimikrobiellen Eigenschaften auch auf das KM übertragbar wären.

Die antimikrobiellen Eigenschaften von KAP setzen sich aus verschiedenen Wirkkomponenten zusammen; darunter auch den reaktiven Spezies. Aufgrund dessen wurde die Intensität der verschiedenen RONS nach der KAP-Behandlung von KM ermittelt. Neben den bakteriziden Bestandteilen ist in Kontaktlinsenlösungen auch häufig ein Puffersystem enthalten, welches den pH-Wert der Lösung aufrechterhält. Auf diese Weise sollen Irritationen des Auges vermieden werden. Um herauszufinden, ob das Puffersystem eine mögliche Auswirkung auf die RONS-Intensität hat, wurde eine weitere gepufferte Lösung in den Versuchen verwendet. Es handelte sich hierbei um PBS. Neben vielen Kontaktlinsenlösungen kommt oft auch NaCl zum Einsatz, um Kontaktlinsen abzuspielen und so von groben Verunreinigungen zu befreien. NaCl können jedoch keine bakteriziden Eigenschaften zugeschrieben werden, was den Einsatz dieser Lösung stark begrenzt. Mithilfe dieses Versuchs sollte herausgefunden werden, ob durch eine KAP-Behandlung von NaCl ein Anstieg der RONS hervorgerufen werden kann. Auf diese Weise könnten die antimikrobiellen Eigenschaften auf NaCl übertragen werden. Somit könnte KAP aktiviertes NaCl deutlich an Reinigungswirkung für

Kontaktlinsen gewinnen. Da in KM, NaCl und PBS, unterschiedlichste Bestandteile enthalten sind, die mit KAP interagieren und sich somit auf die RONS-Intensität auswirken können, wurde MP als neutrale Lösung verwendet. Neben der Auswirkung der KAP-Behandlung auf die RONS-Intensität in den unterschiedlichen Lösungen sollte im Kurzzeitversuch herausgefunden werden, ob eine Korrelation zwischen der jeweiligen RONS-Intensität und der KAP-Dosis besteht. Dazu wurden die vier Lösungen jeweils für 1, 2 und 5 Minuten mit KAP behandelt. Insgesamt wurden in den Lösungen die Intensität von vier unterschiedlichen RONS bestimmt. Neben den reaktiven Stickstoffspezies Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) fiel die Auswahl auf Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und weitere unterschiedliche Sauerstoffspezies (ROS). Zu dieser Auswahl an RONS lagen bereits verschiedene Veröffentlichungen vor, die sich auch mit der Auswirkung der KAP-Behandlung auf das Verhalten von reaktiven Spezies in Lösungen beschäftigt haben [143]. Im folgenden Abschnitt wurde ein Anstieg der Intensität um bis zum 100-fachen im Vergleich zur unbehandelten Lösung als leicht bezeichnet. Lag der Anstieg im Vergleich zur unbehandelten Lösung hingegen über dem 100-fachen jedoch unter dem 1.000-fachen, so wurde er als stark bezeichnet. Eine Intensitätssteigerung über das 1.000-fache wurde als sehr stark beschrieben.

3.1.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

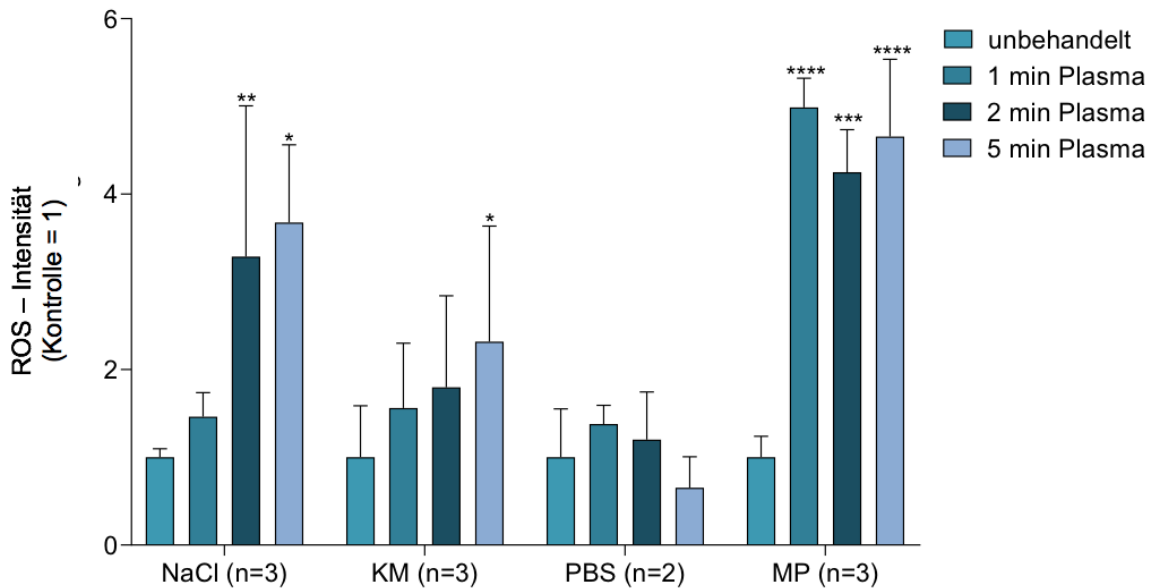


Abbildung 4: ROS-Intensität im Kurzzeitversuch von NaCl, KM, PBS und MP im unbehandelten Zustand sowie nach 1-, 2- und 5-minütiger Plasmabehandlung (4 kHz). Die Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich zwischen der unbehandelten Probe mit der jeweils Plasmabehandelten. Statistische Analyse: *two-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

a) NaCl

Durch die KAP-Behandlung konnte im Kurzzeitversuch bei NaCl ein leichter dosisabhängiger Anstieg der ROS-Intensität im Vergleich zur unbehandelten Probe verzeichnet werden (vgl. Abb. 4).

b) KM

Auch beim KM konnte eine leichte dosisabhängige Zunahme von ROS im Vergleich zur unbehandelten Probe erzielt werden.

c) PBS

Die KAP-Behandlung von PBS hatte im Kurzzeitversuch keine ausschlaggebende Wirkung auf die ROS-Intensität im Vergleich zur unbehandelten Probe. ROS verhielt sich auch bei einem Anstieg der KAP-Dosis recht stabil.

d) MP

Bei MP konnte durch die KAP-Behandlung eine leichte dosisunabhängige Steigerung von ROS im Vergleich zur unbehandelten Probe erzielt werden.

3.1.2 Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

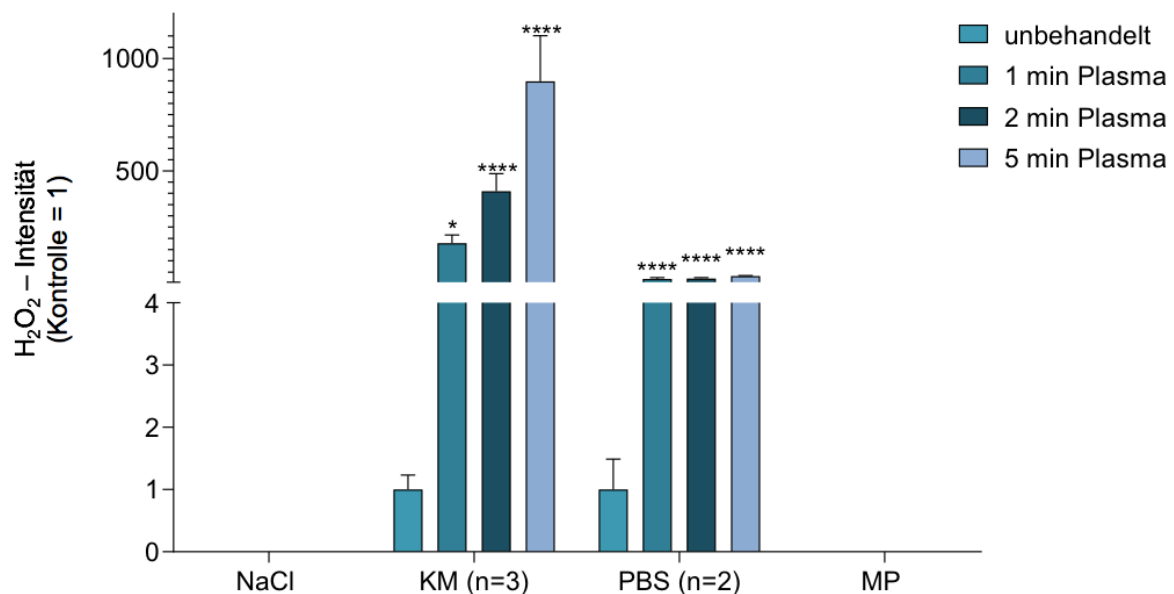


Abbildung 5: H_2O_2 -Intensität im Kurzzeitversuch von NaCl, KM, PBS und MP im unbehandelten Zustand sowie nach 1-, 2- und 5-minütiger Plasmabehandlung (4 kHz). Die Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich zwischen der unbehandelten Probe mit der jeweils Plasmabehandelten. Statistische Analyse: *two-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test*. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$.

a) NaCl

Die nach der KAP-Behandlung von NaCl ermittelte H_2O_2 -Intensität verhielt sich in den mehrfach wiederholten Versuchen sehr heterogen, was eine weitere Auswertung und grafische Darstellung unmöglich machte.

b) KM

Durch die KAP-Behandlung von NaCl konnte eine starke, dosisabhängige Steigerung von H_2O_2 im Vergleich zur unbehandelten Lösung erzielt werden (vgl. Abb. 5).

c) PBS

Bei PBS konnte nach der KAP-Behandlung ein leichter, dosisabhängiger Anstieg von H_2O_2 im Vergleich zur unbehandelten Lösung beobachtet werden.

d) MP

Genau wie bei NaCl wurden beim MP nach der Plasmabehandlung sehr heterogene Werte der einzelnen Versuchsreihen für die H_2O_2 -Intensität ermittelt, weswegen eine grafische Darstellung nicht möglich war.

3.1.3 Nitrit (NO_2^-)

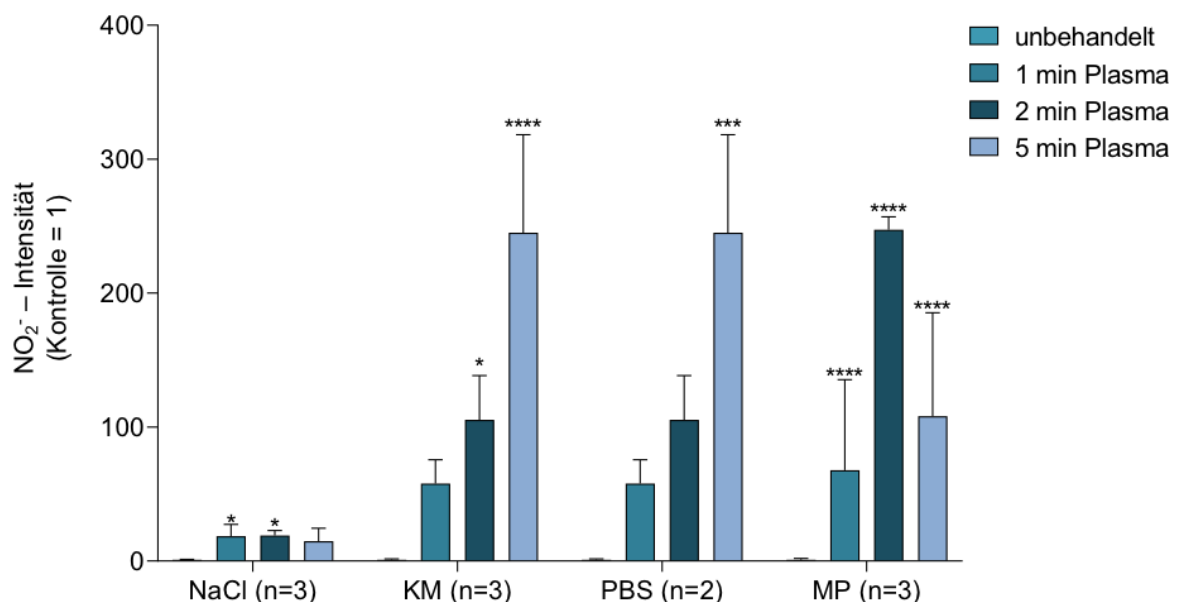


Abbildung 6: NO_2^- -Intensität im Kurzzeitversuch von NaCl, KM, PBS und MP im unbehandelten Zustand sowie nach 1-, 2- und 5-minütiger Plasmabehandlung (4 kHz). Die Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich zwischen der unbehandelten Probe mit der jeweils Plasmabehandelten. Statistische Analyse: *two-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test*. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

a) NaCl

Im Kurzzeitversuch konnte bei NaCl nach der KAP-Behandlung eine leichte dosisunabhängige Steigerung von NO_2^- im Vergleich zur unbehandelten Probe ermittelt werden (vgl. Abb. 6).

b) KM

Beim KM konnte durch die KAP-Behandlung ein starker, dosisabhängiger Anstieg der NO_2^- -Intensität im Vergleich zur unbehandelten Probe beobachtet werden.

c) PBS

Auch bei PBS konnte die KAP-Behandlung eine starke dosisabhängige Induktion von NO_2^- im Vergleich zur unbehandelten Probe hervorrufen.

d) MP

Bei MP kam es durch die KAP-Behandlung zu einer starken dosisunabhängigen Zunahme von NO_2^- im Vergleich zur unbehandelten Probe.

3.1.4 Nitrat (NO_3^-)

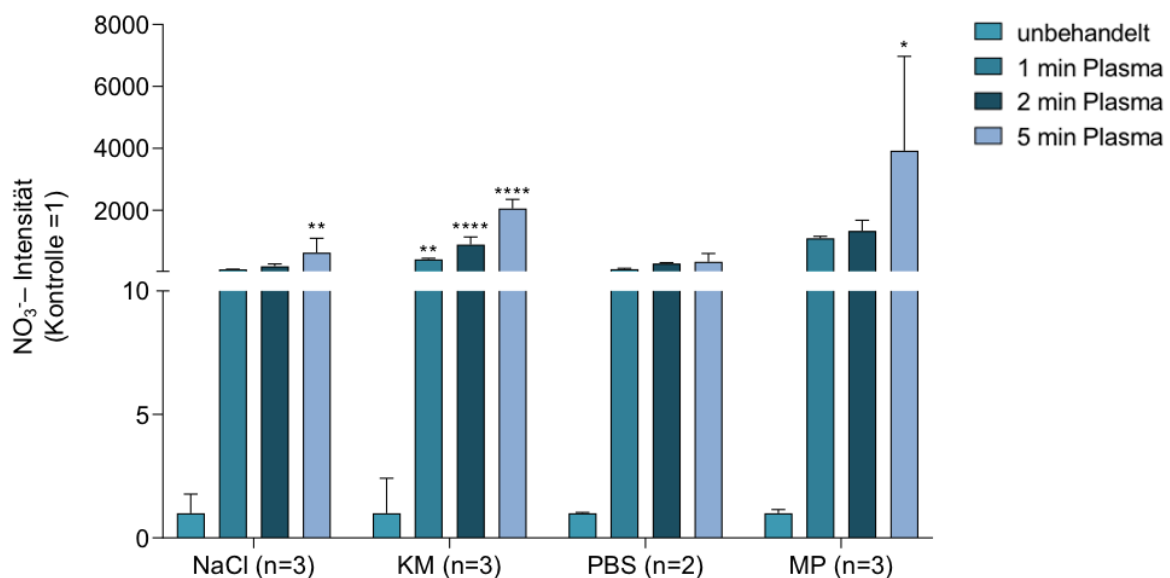


Abbildung 7: NO_3^- -Intensität im Kurzzeitversuch von NaCl, KM, PBS und MP im unbehandelten Zustand sowie nach 1-, 2- und 5-minütiger Plasmabehandlung (4 kHz). Die Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich zwischen der unbehandelten Probe mit der jeweils Plasmabehandelten. Statistische Analyse: *two-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

a) NaCl

Durch die KAP-Behandlung konnte eine starke, dosisabhängige Steigerung der NO_3^- -Intensität im Vergleich zur unbehandelten Lösung erzielt werden (vgl. Abb. 7).

b) KM

Bei KM konnte nach der KAP-Behandlung eine sehr starke, dosisabhängige Zunahme von NO_3^- im Vergleich zur unbehandelten Lösung beobachtet werden.

c) PBS

Auch bei PBS kam es gegenüber der unbehandelten Lösung zu einem starken, dosisabhängigen Anstieg der NO_3^- -Intensität nach der durchgeführten KAP-Behandlung.

d) MP

Nach der KAP-Behandlung konnte insbesondere nach einer 5-minütigen KAP-Behandlung eine sehr starke dosisabhängige Steigerung von NO_3^- im Vergleich zur unbehandelten Probe beobachtet werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bis auf eine Ausnahme bei allen KAP-behandelten Lösungen eine Steigerung von ROS, H_2O_2 , NO_2^- und NO_3^- beobachtet werden konnte. Am stärksten konnte durch die KAP-Behandlung die Intensität von NO_2^- und NO_3^- gesteigert werden. Der Anstieg von ROS fiel bei allen Lösungen hingegen gering aus. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Intensität der reaktiven Spezies in den meisten Fällen von der KAP-Dosis abhing.

3.2 Messung der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies im Langzeitversuch

Im Kurzzeitversuch wurde ermittelt, wie sich die RONS-Intensität direkt nach der KAP-Behandlung in den unterschiedlichen Lösungen verhielt. Da laut Gebrauchsanweisung BT bis zu 90 Tage nach dem Öffnen angewendet werden kann, stellte sich die Frage, ob die RONS auch nach mehreren Wochen noch in den behandelten Lösungen nachweisbar sind. Deswegen behandelten wir die bereits in 3.1 verwendeten Lösungen jeweils 1, 2 und 5 Minuten mit 4 kHz KAP und inkubierten diese bei Raumtemperatur für bis zu 4 Wochen dunkel in Schraubgefäßen. Nach Ablauf von 1, 2, 3 und 4 Wochen wurde dann die Intensität der bereits unter 3.1 ermittelten RONS gemessen. Die gemessene Intensität wurde dann mit der jeweils unbehandelten Lösung verglichen sowie mit den Ergebnissen aus dem Kurzzeitversuch. Genau wie im Kurzzeitversuch beschrieben, wurde die Intensität in schwach, stark und sehr stark unterteilt.

3.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

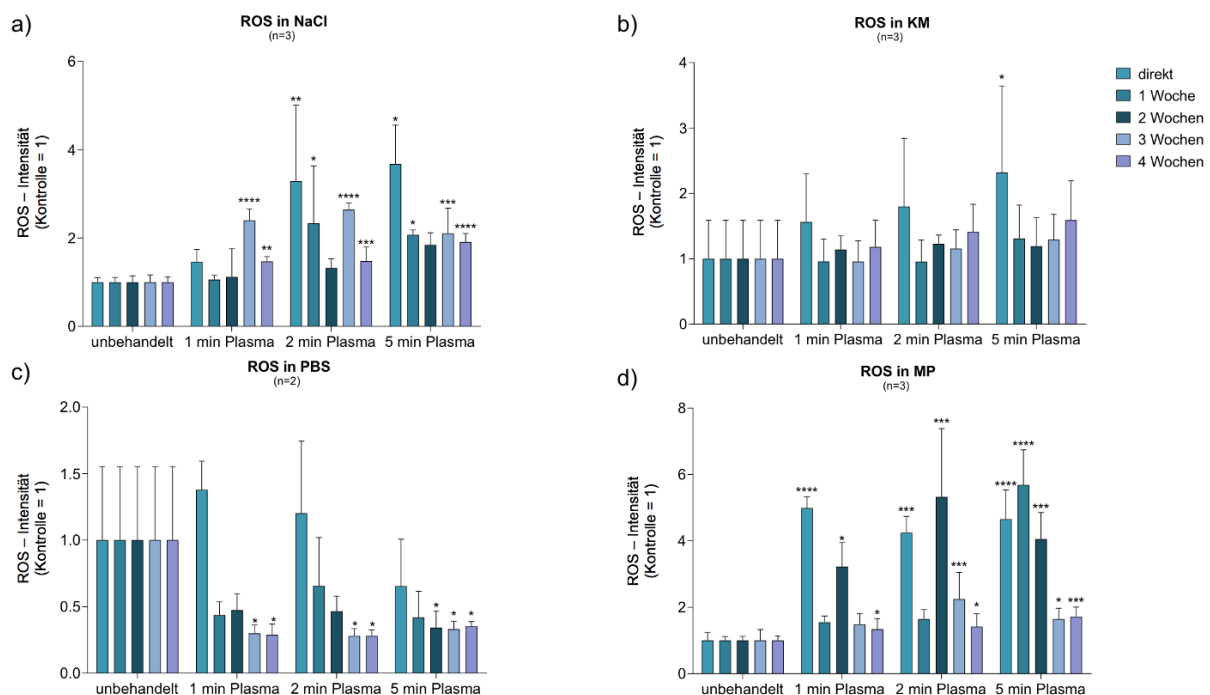


Abbildung 8: ROS-Intensität im Langzeitversuch von a) NaCl, b) KM, c) PBS und d) MP im unbehandelten Zustand sowie nach 1-, 2- und 5-minütiger Plasmabehandlung (4 kHz) im Verlauf von vier Wochen. Die Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich zwischen der unbehandelten Probe mit der jeweils Plasmabehandelten. Statistische Analyse: two-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

a) NaCl

Genau wie im Kurzzeitversuch konnte auch nach Ablauf der vier Wochen bei allen behandelten Proben eine leichte dosisabhängige Steigerung von ROS im Vergleich zur unbehandelten Lösung ermittelt werden (vgl. Abb. 8 a). Gegenüber der gemessenen ROS-Intensität aus dem Kurzzeitversuch sinkt diese im Verlauf von vier Woche leicht ab.

b) KM

Bei allen behandelten Proben aus dem Langzeitversuch konnten leicht erhöhte dosisabhängige ROS-Werte im Vergleich zur unbehandelten Lösung beobachtet werden (vgl. Abb. 8 b). Gegenüber dem Kurzzeitversuch kam es im Langzeitversuch jedoch im Verlauf der vier Wochen zu einer Reduktion von ROS.

c) PBS

Verglichen mit der unbehandelten Probe konnte bei PBS nach der KAP-Behandlung ein leichter Abfall von ROS beobachtet werden (vgl. Abb. 8 c). Gegenüber dem Kurzzeitversuch kam es innerhalb der vier Wochen zu einem weiteren Abfall der ROS-Werte.

d) MP

Im Vergleich zu der unbehandelten Probe konnte bei allen Proben aus dem Langzeitversuch eine leichte Steigerung von ROS ermittelt werden (vgl. Abb. 8 d). Diese fiel jedoch geringer aus als die des Kurzzeitversuchs.

3.2.2 Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

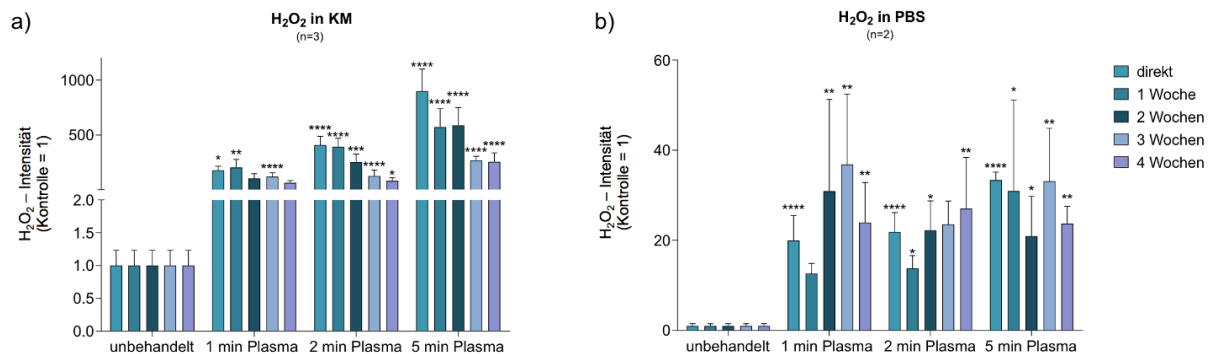


Abbildung 9: H₂O₂-Intensität im Langzeitversuch von a) KM und b) PBS im unbehandelten Zustand sowie nach 1-, 2- und 5-minütiger Plasmabehandlung (4 kHz) im Verlauf von vier Wochen. Die Signifikanz bezieht sich auf den Vergleich zwischen der unbehandelten Probe mit der jeweils Plasmabehandelten. Statistische Analyse: two-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

a) KM

Im Vergleich zum unbehandelten KM konnten bei allen KAP-behandelten Proben im Langzeitversuch ein starker dosisabhängiger Anstieg von H₂O₂ beobachtet werden (vgl. Abb. 9 a). Gegenüber dem Kurzzeitversuch fiel dieser jedoch im Verlauf der vier Wochen wieder ab.

b) PBS

Bei PBS konnte im Langzeitversuch durch die KAP-Behandlung eine leichte dosisunabhängige H₂O₂-Steigerung im Vergleich zur unbehandelten Probe hervorgerufen werden (vgl. Abb. 9 b). Diese verhielt sich auch im Verlauf von vier Wochen recht stabil.

Genau wie im Kurzzeitversuch wurden beim plasmabehandelten NaCl und MP heterogene H₂O₂-Intensitäten ermittelt, was die weitere Auswertung und grafische Darstellung unmöglich machte.

3.2.3 Nitrit (NO_2^-)

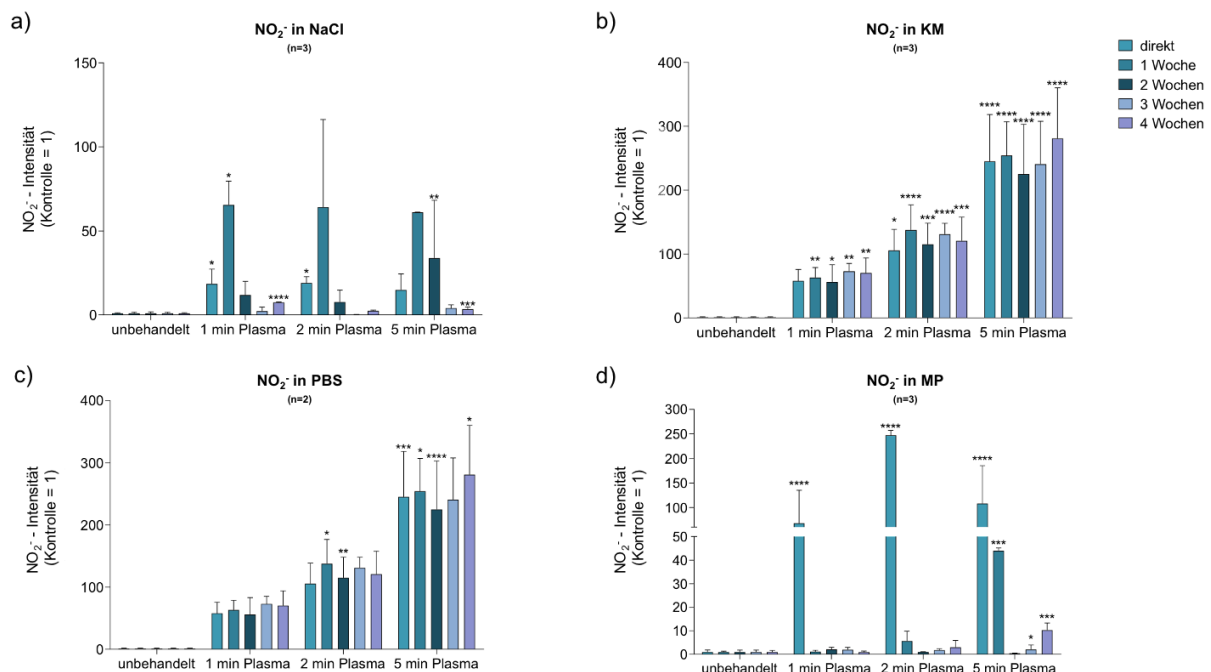


Abbildung 10: NO_2^- -Intensität im Langzeitversuch von a) NaCl, b) KM, c) PBS und d) MP im unbehandelten Zustand sowie nach 1-, 2- und 5-minütiger Plasmabehandlung (4 kHz) im Verlauf von vier Wochen. Die Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich zwischen der unbehandelten Probe mit der jeweils Plasmabehandelten. Statistische Analyse: *two-way ANOVA*, *Dunnnett's multiple comparisons test*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

a) NaCl

Bei allen KAP-behandelten Proben aus dem Langzeitversuch konnte im Vergleich zu der jeweils unbehandelten Probe ein leichter dosisunabhängiger Anstieg von NO_2^- ermittelt werden (vgl. Abb. 10 a). Im Verlauf von vier Wochen erfolgte dann gegenüber der Probe aus dem Kurzzeitversuch eine tendenzielle Abnahme.

b) KM

Bei KM konnte durch die KAP-Behandlung genau wie im Kurzzeitversuch auch im Langzeitversuch eine starke dosisabhängige Steigerung von NO_2^- verglichen mit der unbehandelten Probe erzielt werden (vgl. Abb. 10 b). Diese verhielt sich über die vier Wochen hinweg recht konstant.

c) PBS

Auch bei PBS konnte im Langzeitversuch ein starker dosisabhängiger Anstieg von NO_2^- entgegen der unbehandelten Probe beobachtet werden, welcher sich auch im Verlauf der vier Wochen recht stabil verhielt (vgl. Abb. 10 c).

d) MP

Gegenüber der unbehandelten Probe kam es bei allen KAP-behandelten MP-Proben im Langzeitversuch zu einer leichten dosisunabhängigen Zunahme von NO_2^- (vgl. Abb. 10 d). Diese nahm aber im Vergleich zu den Messungen aus dem Kurzzeitversuch stark ab.

3.2.4 Nitrat (NO_3^-)

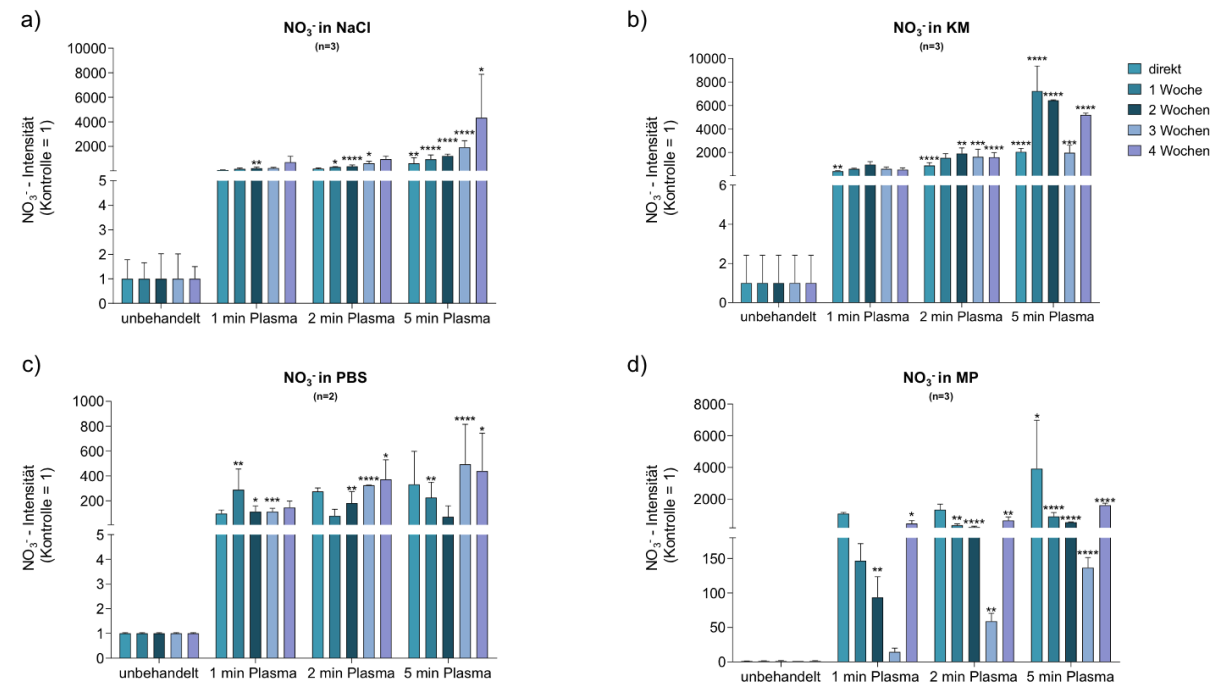


Abbildung 11: NO_3^- -Intensität im Langzeitversuch von a) NaCl, b) KM, c) PBS und d) MP im unbehandelten Zustand sowie nach 1-, 2- und 5-minütiger Plasmabehandlung (4 kHz) im Verlauf von vier Wochen. Die Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich zwischen der unbehandelten Probe mit der jeweils Plasmabehandelten. Statistische Analyse: *two-way ANOVA*, *Dunnett's multiple comparisons test*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

a) NaCl

Gegenüber der unbehandelten Probe konnte bei allen KAP-behandelten Proben im Langzeitversuch eine sehr starke dosisabhängige Steigerung von NO_3^- ermittelt werden, welche sich auch während der vier Wochen recht stabil verhielt (vgl. Abb. 11 a).

b) KM

Dieser sehr starke dosisabhängige NO_3^- -Anstieg war auch bei allen KAP-behandelten KM-Proben des Langzeitversuchs verglichen mit den unbehandelten Proben ersichtlich (vgl. Abb. 11 b). Über die vier Wochen hinweg stellte sich dieser als recht beständig dar.

c) PBS

Im Vergleich zu den unbehandelten Proben konnte bei allen KAP-behandelten PBS-Proben im Langzeitversuch eine starke dosisunabhängige Zunahme von NO_3^- beobachtet werden, welcher sich auch im Verlauf der vier Wochen sehr stabil darstellte (vgl. Abb. 11 c).

d) MP

Entgegen der unbehandelten Probe konnte bei allen behandelten Proben des Langzeitversuchs ein sehr starker dosisunabhängiger Anstieg von NO_3^- gemessen werden (vgl. Abb. 11 d). Im Vergleich zu der gemessenen NO_3^- -Menge aus dem Kurzzeitversuch kam es jedoch während der vier Wochen zu einem leichten Abfall.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bis auf eine Ausnahme (ROS in PBS) bei allen KAP-behandelten Proben auch nach Ablauf von vier Wochen erhöhte RONS-Werte im Vergleich zur unbehandelten Probe ersichtlich waren. Je nach gemessener reaktiver Spezies und Lösung kam es jedoch zu Unterschieden. So fiel auf, dass die reaktiven Spezies sich in den gepufferten Lösungen KM und PBS häufig stabiler verhielten als in MP und NaCl. ROS verhielt sich in allen getesteten Lösungen im Langzeitversuch instabil und es kam im Vergleich zum Kurzzeitversuch zu einem leichten Abfall. Die in NaCl, KM und MP nachgewiesenen ROS lagen jedoch weiterhin über dem Wert der jeweils unbehandelten Lösung.

3.3 Bakterizide Wirkung von plasmabehandelten Lösungen auf *Escherichia coli*

Nachdem in 3.1 und 3.2 sichergestellt wurde, dass es durch die KAP-Behandlung von NaCl, KM, PBS und MP zu einem Anstieg der reaktiven Spezies im Vergleich zur unbehandelten Probe kam, sollte im folgenden Schritt getestet werden, inwieweit sich dies auf die bakterizide Wirkung dieser Lösungen auswirkt. Da sich die antimikrobielle Wirkung von KAP aus verschiedenen Wirkkomponenten zusammensetzt, stellte sich die Frage, ob allein durch den nachgewiesenen Anstieg der reaktiven Spezies eine bessere antimikrobielle Wirkung der Lösungen erzielt werden kann. Außerdem sollte herausgefunden werden, ob die Steigerung der reaktiven Spezies für eine bessere antimikrobielle Wirkung ausreichend ist und inwieweit diese von der KAP-Dosis abhängt. Um die Abhängigkeit der bakteriziden Wirkung von der KAP-Dosis zu untersuchen wurden die Lösungen wie in 3.2.1 und 3.2.2 für 2 und 5 Minuten mit 4 kHz KAP behandelt, zusätzlich wurde die KAP Dosis auf 10 Minuten erhöht. Da in KM, PBS und NaCl eine Vielzahl von Lösungsbestandteilen enthalten sind, wurde zuerst die bakterizide Wirkung von KAP-behandeltem MP untersucht. Auf diese Weise sollten mögliche Interaktionen zwischen KAP und Lösungsmittelbestandteilen ausgeschlossen werden, um so eine relativ neutrale Aussage zur bakteriziden Wirkung durch den alleinigen Anstieg der reaktiven Spezies nach durchgeführter KAP-Behandlung zu erhalten. In der Vergangenheit wurde in unserem Labor vor allem mit dem Bakterienstamm *E. coli* gearbeitet, weswegen dieser auch bei den unten aufgeführten Versuchen eingesetzt wurde. Nachdem bei KAP-behandeltem MP eine gute bakterizide Wirkung auf *E. coli* nachgewiesen werden konnte, wurde unter 3.3.1.2 die Wirkung von KAP-behandeltem KM getestet.

3.3.1 Etablierungsversuch zur Bestimmung der antibakteriell wirkenden KAP-Dosis

3.3.1.1 Millipore Wasser

Durch die KAP-Behandlung von MP konnte dessen bakterizide Wirkung auf *E. coli* im Vergleich zur unbehandelten Probe signifikant gesteigert werden (vgl. Abb. 12). Durch eine 2-minütige Plasmabehandlung konnte die Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) um 98,69% gesenkt werden. Nach einer 5-minütigen Behandlung waren es 99,75% und nach einer 10-minütigen Plasmaapplikation trat eine noch umfassendere

Reduktion um 99,97% ein. Von einer desinfizierenden Wirkung spricht man ab einer Reduktion der KBE um 99,999%, welche nach einer einstündigen Einwirkzeit jedoch nur bei den drei Positivkontrollen (PK) H₂O₂, Ethanol und Chlorhexamed (CHX) vorlag. Die KBE der PK lagen jeweils unterhalb der Detektionsgrenze von 10⁰.

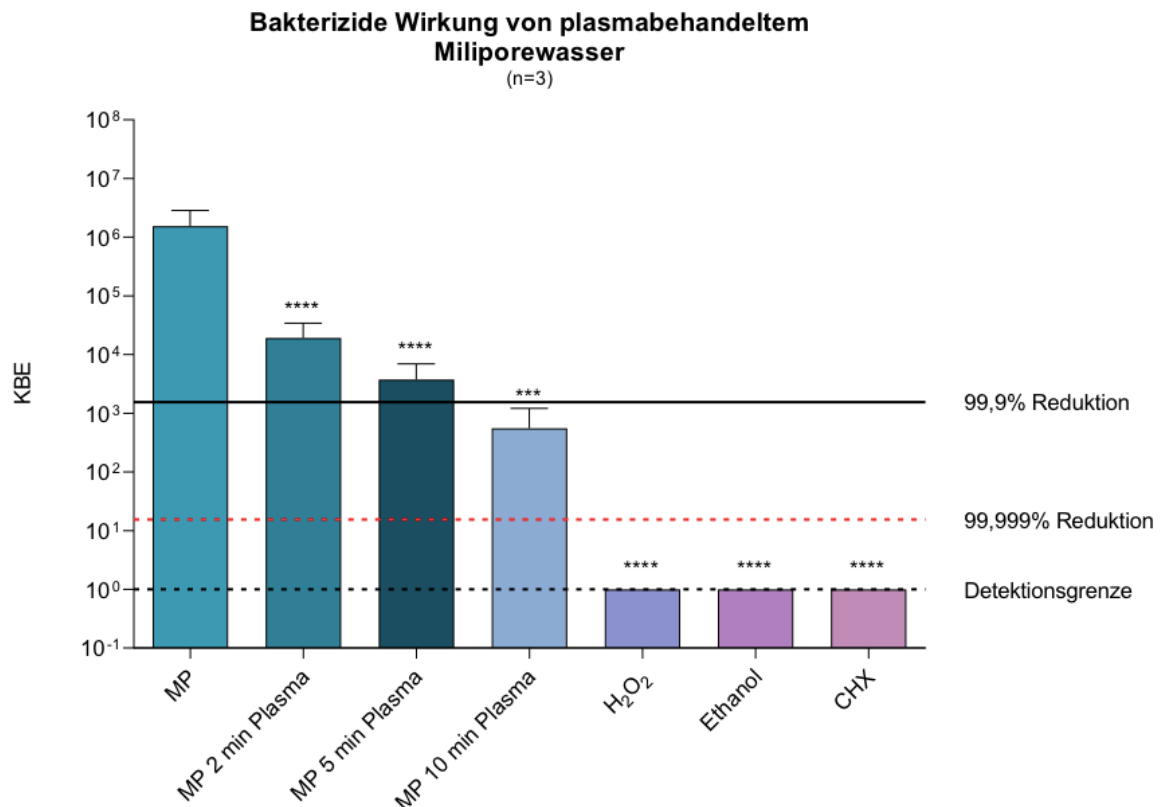


Abbildung 12: Bakterizide Wirkung von KAP-behandeltem Millipore Wasser (MP) auf *Escherichia coli* (*E. coli*) nach einer Stunde Einwirkzeit. Dargestellt werden die koloniebildenden Einheiten (KBE) in MP nach 2-, 5- und 10-minütiger KAP-Behandlung (4 kHz). Die Signifikanzen beziehen sich auf das unbehandelte MP. Statistische Analyse: two-way ANOVA; Dunnett's multiple comparisons test. *** p < 0.001, **** p < 0.0001

3.3.1.2 Kontaktlinsenmittel

Nach der KAP-Behandlung der *Biotrue All-in-One Lösung* von Bausch + Lomb konnten keine ausschlaggebenden Veränderungen auf die antibakterielle Wirkung im Vergleich zur unbehandelten Lösung beobachtet werden (vgl. Abb.13). Nach der 2-minütigen KAP-Behandlung zeigte sich ein tendenzieller Anstieg der KBE um das 3,4-fache im Vergleich zum unbehandelten KM. Nach der 5-minütigen Behandlung entsprach der Anstieg dem 3,3-fachen und nach 10 Minuten dem 2,5-fachen. H₂O₂, Ethanol und CHX fungierten wie unter 3.3.1.3 als PK. Die Anzahl an KBE lag bei ihnen jeweils unter der Detektionsgrenze von 10⁰. Als Negativkontrolle (NK) diente PBS. Im Vergleich zu PBS kann beim unbehandelten KM eine leichte antibakterielle Wirkung beobachtet werden.

Die Wirkung vom plasmabehandelten KM ist hingegen mit der Wirkung von PBS vergleichbar.

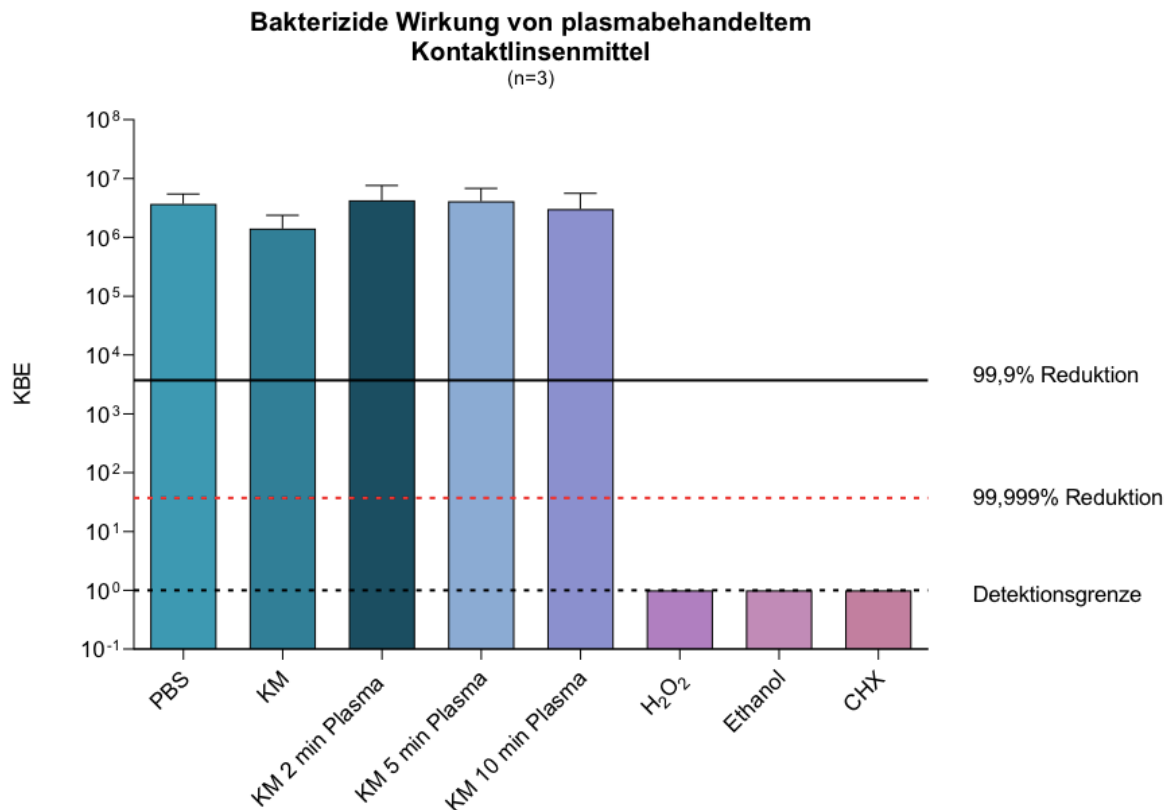


Abbildung 13: Bakterizide Wirkung von KAP-behandeltem Kontaktlinsenmittel (KM) auf *Escherichia coli* nach einer Stunde Einwirkzeit. Als KM wurde die *Biotrue All-in-One Lösung* von Bausch + Lomb verwendet (BT). Dargestellt werden die koloniebildenden Einheiten (KBE) in KM nach 2-, 5- und 10-minütiger KAP-Behandlung (4 kHz). Es konnten keine Signifikanzen zwischen dem KAP-behandeltem KM und dem unbehandeltem KM bestimmt werden. Statistische Analyse: two-way ANOVA Dunnett's multiple comparisons test.

3.3.2 Bakterizide Wirkung von unterschiedlichen KAP-behandelten Lösungen auf *Escherichia coli* mit unterschiedlichen Einwirkzeiten

Im Versuch 3.3.1.2 fiel auf, dass die bakterizide Wirkung von dem verwendeten Kontaktlinsenmittel BT im Vergleich zur NK nur gering ausfiel. Aus Veröffentlichungen war bereits bekannt, dass die bakterizide Wirkung von manchen All-in-One-Lösungen nur als mangelhaft bewertet wurde. Deswegen wurden unter 3.3.2 noch zwei weitere Kontaktlinsenlösungen getestet, um herauszufinden, ob bei diesen eine bessere bakterizide Wirkung im Vergleich zu BT vorliegt. Als zusätzliche Kontaktlinsenlösungen wurde die *Eyemax24 Kontaktlinsenlösung* von der MPG&E Handel und Service GmbH (EM) und die *Boston® Ein-Flaschen-Kombi-Lösung* von Bausch + Lomb (B&L) eingesetzt.

Außerdem sollte herausgefunden werden, ob durch die KAP-Behandlung die bakterizide Wirkung dieser beiden Kontaktlinsenlösungen stärker beeinflusst werden kann als die von BT. Da unter 3.3.1.1 die bakterizide Wirkung vom KAP-behandelten MP von der KAP-Dosis abhing, wurde in diesem Versuch ausschließlich die maximale Behandlungsdauer von 10 Minuten ausgewählt. Des Weiteren konnte in den Packungsbeilagen von BT und B&L nachgelesen werden, dass die Einwirkzeit mindestens 4 Stunden betragen soll. Bei EM wurde hingegen sogar eine Mindesteinwirkzeit von 6 Stunden empfohlen. Angesichts dieser Informationen stellte sich die Frage, ob durch eine Verlängerung der Einwirkzeit der Kontaktlinsenmittel deren bakterizide Wirkung verbessert werden kann. Aufgrund dessen wurde in diesem Versuch die Einwirkzeit von einer auf 4 bzw. 24 Stunden verlängert. Auf diese Weise sollte herausgefunden werden, ob die bakterizide Wirkung der unbehandelten und der KAP-behandelten Lösungen von der Einwirkzeit abhängt. Als PK wurde bei diesem Versuch 3%iges H_2O_2 verwendet.

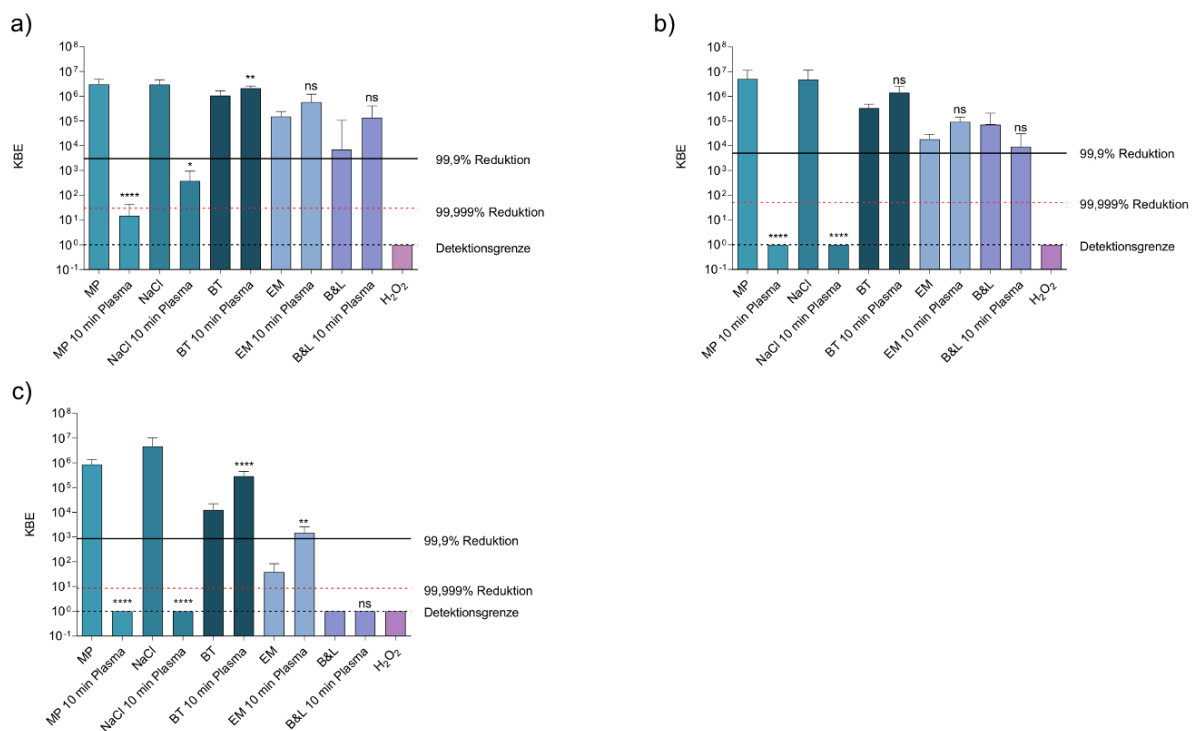


Abbildung 14: Bakterizide Wirkung von unterschiedlichen KAP-behandelten Lösungen auf *Escherichia coli* nach a) einer, b) vier und c) 24 Stunde Einwirkzeit. Dargestellt werden die koloniebildenden Einheiten (KBE) in den Lösungen nach 10-minütiger KAP-Behandlung (4 kHz). H_2O_2 fungiert als PK. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die unbehandelte Lösung. Statistische Analyse: Mann-Whitney test. Ns (nicht signifikant), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

a) 1 Stunde Einwirkzeit

Bei MP und NaCl konnte durch die 10-minütige KAP-Behandlung eine verbesserte bakterizide Wirkung auf *E. coli* im Vergleich zur unbehandelten Lösung beobachtet

werden (vgl. Abb. 14 a). Demnach konnten durch das KAP-behandelte MP die KBE um mehr als 99,999% reduziert werden. Beim KAP-behandelten NaCl lag die Reduktion bei über 99,9%. Bei den drei verwendeten Kontaktlinsenmitteln blieb die bakterizide Wirkung auch nach der 10-minütigen KAP-Behandlung im Vergleich zur jeweils unbehandelten Lösung recht konstant und lag unter 99,9%. Bei der PK lag die Anzahl der KBE unter der Detektionsgrenze von 10^0 .

b) 4 Stunden Einwirkzeit

Auch nach der vierstündigen Einwirkzeit zeigten das KAP-behandelte MP und NaCl eine bessere bakterizide Wirkung gegenüber der jeweils unbehandelten Probe. Im Vergleich zur einstündigen Einwirkzeit fiel diese stärker aus und die Anzahl der KBE lag bei beiden Lösungen unterhalb der Detektionsgrenze von 10^0 (vgl. Abb. 14 b). Die antibakterielle Wirkung der drei unbehandelten Kontaktlinsenlösungen war nach der vierstündigen Einwirkzeit vergleichbar mit den ermittelten Werten aus 3.3.2 a. Auch nach der KAP-Behandlung der drei Kontaktlinsenlösungen konnten keine ausschlaggebenden Veränderungen im Bereich der bakteriziden Wirkung verzeichnet werden. Die Reduktion der KBE lag bei den unbehandelten und KAP-behandelten Kontaktlinsenlösungen unter 99,9%. Wie unter 3.3.2 a lag die Anzahl der KBE bei der PK unterhalb der Detektionsgrenze.

c) 24 Stunden Einwirkzeit

Nach 24 Stunden war die bakterizide Wirkung vom KAP-behandelten MP und NaCl mit den Ergebnissen aus 3.3.2 b vergleichbar. Die Anzahl der KBE lag bei beiden Lösungen unter der Detektionsgrenze. Bei den drei unbehandelten Kontaktlinsenmitteln konnte nach der verlängerten Einwirkzeit eine tendenziell bessere bakterizide Wirkung gegenüber *E. coli* erreicht werden. Die bakterizide Wirkung von BT lag weiterhin unter 99,9% jedoch sank die Anzahl der KBE von ursprünglich 10^6 (vgl. Abb. 14 a) auf 10^4 (vgl. Abb. 14 c). Bei EM stieg die bakterizide Wirkung an und lag letztendlich bei über 99,9% (vgl. Abb. 14 c). Durch B&L konnte die Anzahl der KBE nach der 24-stündigen Einwirkzeit so stark gesenkt werden, dass sich diese unterhalb der Detektionsgrenze befand. Die beiden plasmabehandelten Kontaktlinsenmittel BT und EM bewirkten im Vergleich zur jeweils unbehandelten Probe eine weniger starke Reduktion der KBE. Bei B&L konnte hingegen kein Unterschied zwischen dem plasmabehandelten und

-unbehandelten Zustand gemacht werden. Bei der PK lag die Anzahl der KBE unterhalb der Detektionsgrenze.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch die KAP-Behandlung von MP und NaCl eine stark bakterizide Wirkung gegenüber *E. coli* erzielt werden konnte. Schon nach der kurzen Einwirkzeit von einer Stunde war bei den beiden vorbehandelten Lösungen die Reduktion der KBE klar ersichtlich. Ab einer vierstündigen Einwirkzeit war die bakterizide Wirkung vom plasmabehandelten MP und NaCl mit der von H₂O₂ vergleichbar. Dem gegenüber wurden die antimikrobiellen Eigenschaften der drei ausgewählten Kontaktlinsenlösungen durch die KAP-Behandlung in Bezug auf *E. coli* per se nur gering beeinflusst. Durch eine Verlängerung der Einwirkzeit konnten diese jedoch leicht gesteigert werden.

3.4 Reinigungswirkung von plasmabehandelten Lösungen auf lipidbeschichtete Kontaktlinsen

Neben der Kontamination mit Bakterien kommt es während der Kontaktlinsennutzung auch zu Lipidablagerungen auf der Linse. Neben den physiologischen Lipiden aus dem Tränenfilm können auch Lipide aus Cremes oder Kosmetika auf die Linsenoberfläche gelangen. Durch diese Ablagerungen wird wiederum die Adhäsion von Bakterien begünstigt, weswegen die Reinigung der Oberfläche von Lipidbestandteilen durch Kontaktlinsenmittel neben der bakteriziden Wirkung eine essentielle Rolle einnimmt. Aufgrund dessen sollte analysiert werden, ob die KAP-Behandlung einen positiven Effekt auf die Lipidreinigungswirkung der Kontaktlinsenmittel hat. Hierfür wurden die drei, bereits unter 3.3.2 verwendeten Kontaktlinsenmittel genutzt. Auch die KAP-Dosis von 10 Minuten wurde aus diesem Versuch übernommen. Da mithilfe von Cholesterol keine homogene Lipidbeschichtung auf der Kontaktlinsenoberfläche erzielt werden konnte, wurde für die vorliegenden Versuche natives Olivenöl benutzt. Gegenüber den zuerst verwendeten Hydrogel-Kontaktlinsen zeigten die Silikon-Hydrogel-Linsen eine bessere Lipidablagerungstendenz, weswegen die Auswahl letztendlich auf diese fiel.

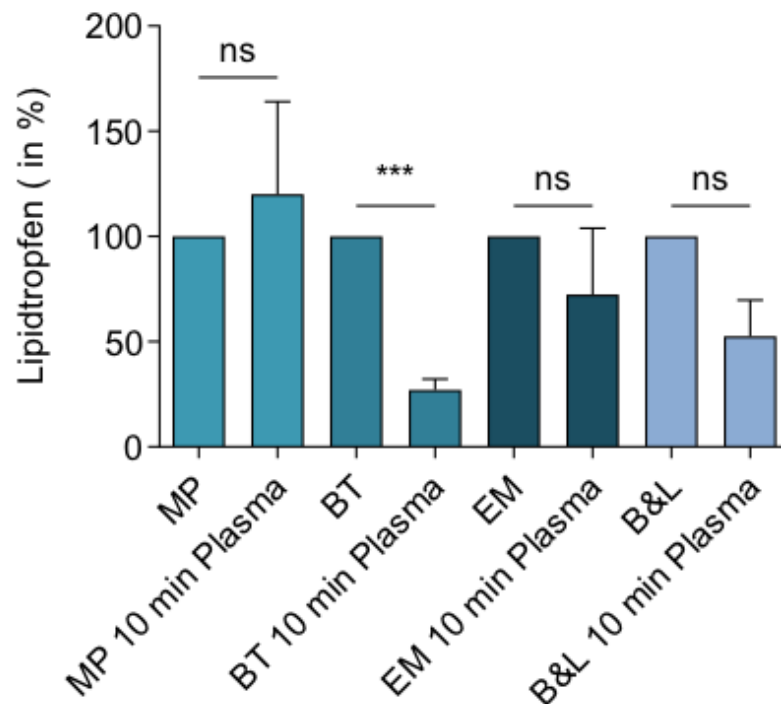


Abbildung 15: Vergleich der Reinigungswirkung von unbehandeltem Millipore Wasser (MP), der *Biotrue All-in-One-Lösung* von Bausch + Lomb (BT), der *Eyemax24 Kontaktlinsenlösung* von der MPG&E Handel und Service GmbH (EM) und der *Boston® Ein-Flaschen-Kombi-Lösung* von Bausch + Lomb (B&L) mit der jeweils plasmabehandelten Lösung (4 kHz) auf lipidbeschichtete Kontaktlinsen. KAP-Behandlungszeit von 10 min. n=5. Statistische Analyse: *Paired t test*. Ns (nicht signifikant), *** p < 0.001

Durch die 10-minütige KAP-Behandlung konnte bei der *Biotrue All-in-One Lösung* von Bausch + Lomb (BT) eine signifikant bessere Reinigungswirkung auf lipidbeschichtete Kontaktlinsen im Vergleich zur unbehandelten Lösung erzielt werden (vgl. Abb. 15). Nach der Reinigung der beschichteten Linsen mit der plasmabehandelten BT-Lösung, konnten 73% weniger Lipidkugeln auf deren Oberfläche vorgefunden werden als nach der Reinigung mit der unbehandelten Lösung (vgl. Abb. 16). Auch bei den anderen beiden Kontaktlinsenreinigungsmitteln EM und B&L konnte durch die KAP-Behandlung eine tendenziell bessere Reinigung der Linsenoberfläche von Lipiden gegenüber der jeweils unbehandelten Linsenlösung erzielt werden. Beim plasmabehandelten EM konnten im Vergleich zur unbehandelten Lösung die Lipidablagerungen um 27,6% reduziert werden. Noch ausgeprägter war der Effekt bei B&L, hier wurde die Reinigung der Kontaktlinsen von Lipiden um 47,4% gesteigert. Bei MP konnte im Gegensatz zu

den Kontaktlinsenreinigungsmitteln durch die KAP-Behandlung keine verbesserte Reinigungswirkung gegenüber der Lipidbeschichtung erzielt werden. MP fungierte in dem Versuch als NK, H₂O₂ als PK.

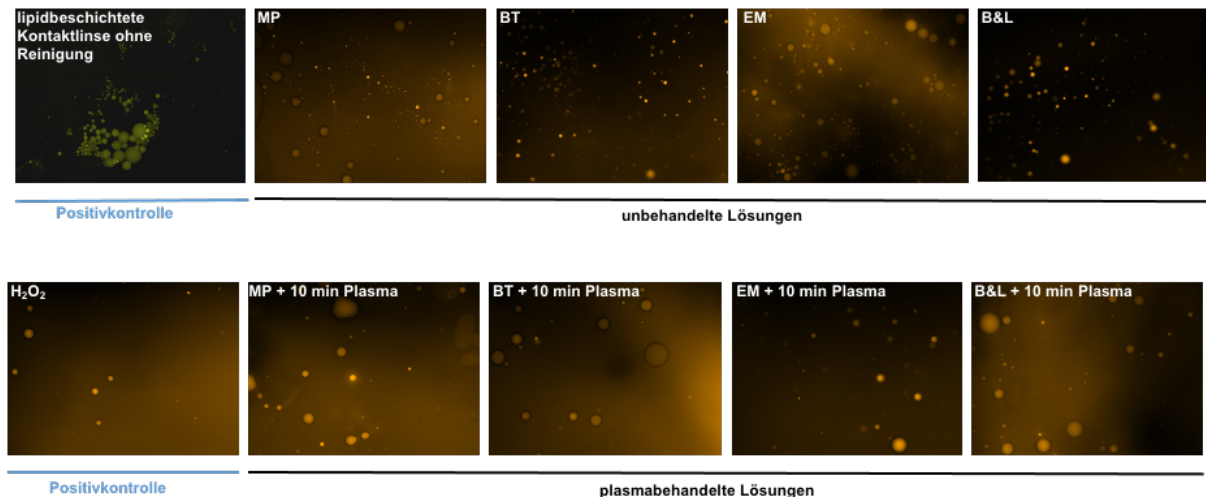


Abbildung 16: Exemplarische Darstellung der Reinigungswirkung von Millipore Wasser (MP), der *Biotrue All-in-One-Lösung* von Bausch + Lomb (BT), der *Eyemax24 Kontaktlinsenlösung* von der MPG&E Handel und Service GmbH (EM) und der *Boston® Ein-Flaschen-Kombi-Lösung* von Bausch + Lomb (B&L) nach Plasmabehandlung (4 kHz) und im unbehandelten Zustand auf lipidbeschichtete Silikon-Hydrogel-Tageslinsen unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 5-facher Vergrößerung. Verwendeter Fluoreszenzfarbstoff: *Nilrot*. Aufnahmen mit *Axiocam MR* im Wellenlängenbereich von 542 bis 554 nm.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass durch die KAP-Behandlung die Reinigungswirkung der von uns getesteten Kontaktlinsenreinigungsmittel gegenüber Lipiden gesteigert werden konnte.

3.5 Auswirkung der KAP-Behandlung auf den pH-Wert der verschiedenen Lösungen in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer

Um Irritationen durch Kontaktlinsenmittel bei Kontaktlinsenträgern zu verhindern, spielt der pH-Wert der Reinigungslösung eine wichtige Rolle. Er ähnelt dem der physiologischen Tränenlösung und liegt bei $7,45 \pm 0,16$. In verschiedenen Studien wurden Veränderungen des pH-Wertes nach einer KAP-Behandlung beschrieben [144][145]. Nun stellte sich die Frage, ob die KAP-Behandlung auch einen Einfluss auf den pH-Wert von KM, PBS, MP und NaCl hat.

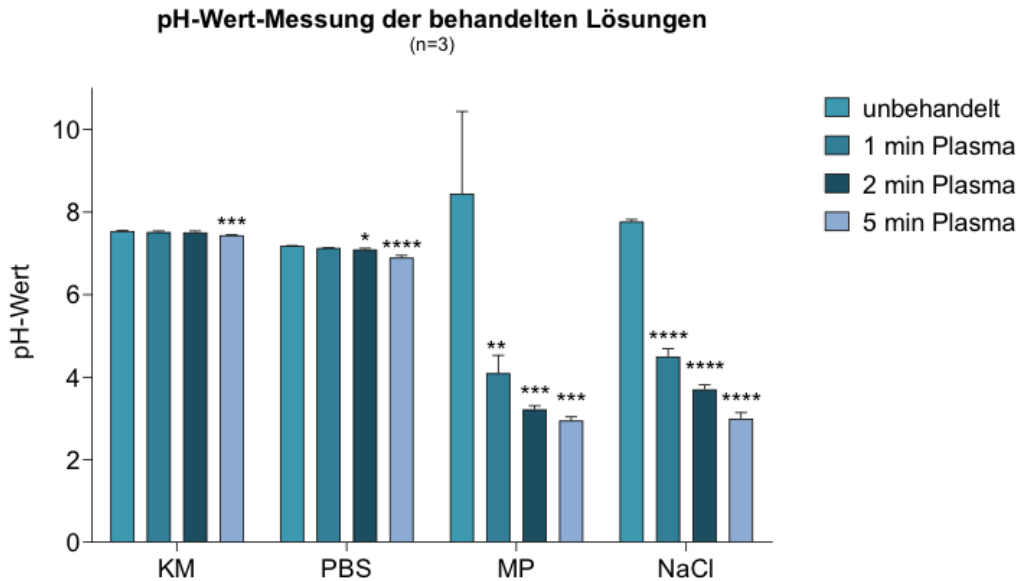


Abbildung 17: Auswirkung der KAP-Behandlung (4 kHz) auf den pH-Wert von Kontaktlinsenmittel (KM), phosphat-gepufferte Lösung (PBS), Millipore Wasser (MP) und physiologische Kochsalzlösung (NaCl). Die KAP-Dosis beträgt 1 min, 2 min und 5 min. Die Signifikanzen beziehen sich auf die jeweils unbehandelte Probe. Statistische Analyse: *two-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Die KAP-Behandlung der vier untersuchten Lösungen hatte unterschiedliche Auswirkungen auf deren pH-Werte. Bei KM und PBS verhielt sich der pH-Wert während der Behandlung recht stabil. Der ursprüngliche pH-Wert vom unbehandelten KM lag bei 7,54 und war somit leicht alkalisch. Durch die 5-minütige Plasmabehandlung sank der Wert um 0,1 ab und lag bei 7,44. Bei PBS konnte hingegen eine Abnahme des pH-Wertes um 0,28 verzeichnet werden (vgl. Abb. 17). Durch die 5-minütige KAP-Behandlung fiel der pH-Wert der Lösung von 7,18 auf 6,9 und lag somit im leicht sauren Milieu. Stärkere Schwankungen wurden beim KAP-behandelten MP und NaCl registriert. So fiel der Ausgangswert im MP von ursprünglich 8,45 durch die 5-minütige Behandlung auf 2,95 ab, bei NaCl von 7,77 auf 2,99. Bei allen Lösungen konnte nach der KAP-Behandlung ein Abfall des pH-Wertes beobachtet werden. Dieser sank abhängig von der jeweiligen KAP-Dosis. Bei den beiden gepufferten Lösungen KM und PBS war der Abfall des pH-Wertes jedoch geringer ausgeprägt als bei NaCl und MP.

4. Diskussion und Ausblick

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch Kontaktlinsen konnte in den vergangenen Jahrzehnten ein immenser Fortschritt im Bereich des Refraktionsausgleichs erzielt werden. Dennoch dürfen auch potenzielle Kontaktlinsenkomplikationen, wie Hornhautvaskularisationen, Konjunktivitiden oder Keratitiden nicht verharmlost werden. Das Risiko für das Auftreten einer solchen Komplikation lässt sich vor allem durch die gründliche Reinigung der Linse reduzieren. Untersuchungen in der Vergangenheit zeigten jedoch, dass die mikrobiozide Wirkung von All-in-One-Kontaktlinsenmitteln oftmals nicht zufriedenstellend ist [54].

In den letzten Jahren hat die Desinfektion mithilfe von kaltem atmosphärischem Plasma (KAP) im medizinischen Bereich beträchtlich an Bedeutung gewonnen [69], weswegen die Frage aufkam, ob sich die Eigenschaften von KAP auch auf Kontaktlinsenlösungen übertragen lassen und man somit die antibakterielle Wirkung von diesen verbessern kann.

Die Inaktivierung und Abtötung von Mikroorganismen und Viren durch den Einsatz von KAP basiert auf der Synergie von verschiedenen physikalischen und chemischen Wirkkomponenten. Neben elektromagnetischen Feldern, Wärmestrahlung und UV-Strahlung sind die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) von großer Bedeutung. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen der KAP-Behandlung auf unterschiedliche RONS im Kontaktlinsenmittel untersucht.

Als Kontaktlinsenmittel kam hierbei exemplarisch die *Biotrue All-in-One-Lösung* von Bausch + Lomb (BT) zum Einsatz. In Kontaktlinsenmitteln werden Phosphat oder Borat als Puffersystem eingesetzt, um einen konstanten pH-Wert zu erreichen, welcher dem physiologischen Tränenfilm entspricht. Deswegen wurden neben BT die Auswirkungen der KAP-Behandlung auf die RONS-Konzentration in einer weiteren phosphatgepufferten Lösung (PBS) untersucht. Außerdem wurden die Untersuchungen durch eine physiologische Kochsalzlösung (NaCl) und Millipore Wasser (MP) ergänzt. NaCl wird bereits teilweise verwendet, um Kontaktlinsen abzuspülen und so von groben Verunreinigungen zu befreien, ohne jedoch antibakteriell zu wirken. Im Rahmen dieser Studienversuche wurde getestet, ob durch eine KAP-Behandlung eine antibakterielle Wirkung erreicht werden kann und sich somit der Einsatzbereich von NaCl im Bereich

der Kontaktlinsenreinigung erweitern lässt. Im Gegensatz zu den drei zuvor aufgezählten Lösungen sind in MP, keine Mineralien oder Ionen enthalten, die mit dem KAP interagieren können.

Im sogenannten Kurzzeitversuch wurden direkt nach der KAP-Behandlung (4 kHz; 1, 2 und 5 Minuten) die Menge von Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Nitrat (NO_3^-), Nitrit (NO_2^-) und weiteren reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ermittelt. Dabei fiel auf, dass nach der KAP-Behandlung ein Konzentrationsanstieg der RONS im Vergleich zur jeweils unbehandelten Lösung erfolgte. In den meisten Fällen verhielt sich dieser Anstieg dosisabhängig. Da die *Biotrue All-in-One-Lösung*, wie in der Packungsbeilage beschrieben, bis zu 90 Tage nach Anbruch verwendet werden kann, stellte sich die Frage, ob der beobachtete Anstieg der reaktiven Spezies auch über einen längeren Zeitraum in den getesteten Lösungen nachweisbar ist. Aufgrund dessen erfolgte im Langzeitversuch die Messung der RONS eine, zwei, drei und vier Wochen nach der KAP-Behandlung. Hierbei fiel auf, dass die ermittelte Konzentration der reaktiven Spezies auch im Verlauf von vier Wochen in den meisten Fällen noch über dem Wert der unbehandelten Probe lag. Es konnten jedoch Unterschiede zwischen den vier Lösungen beobachtet werden. So verhielten sich die reaktiven Spezies beispielsweise in den beiden gepufferten Lösungen, KM und PBS, stabiler als im NaCl und im MP.

Im Anschluss wurde außerdem kontrolliert, inwieweit der bereits nachgewiesene Anstieg der reaktiven Spezies nach der KAP-Behandlung eine Auswirkung auf die bakterizide Wirkung der vier Lösungen auf den Bakterienstamm *Escherichia coli* (*E. coli*) hat. Neben der bereits benutzten *Biotrue All-in-One Lösung* von Bausch + Lomb wurden zwei weitere Kontaktlinsenlösungen genutzt, um herauszufinden, ob deren antibakterielle Wirkung gegenüber *E. coli* mit BT vergleichbar ist. Es handelte sich hierbei um die *Boston® Ein-Flaschen-Kombi-Lösung* von Bausch + Lomb (B&L) und *Eyemax24 Kontaktlinsenlösung* von der MPG&E Handel und Service GmbH (EM). Es wurden verschiedene Einwirkzeiten ausgewählt, in denen die unterschiedlichen Lösungen auf die Bakterien einwirkten. In Abhängigkeit von der Einwirkzeit der Kontaktlinsenlösungen konnte die Reduktion der gramnegativen Bakterien etwas gesteigert werden. Bei NaCl und MP konnte hingegen durch die KAP-Behandlung ein starker Anstieg der bakteriziden Wirkung gegenüber *E. coli* verzeichnet werden.

Neben der Kontamination der Kontaktlinse mit potentiell pathogenen Erregern können auch Ablagerungen auf der Linsenoberfläche den Tragekomfort deutlich reduzieren und als Nährboden für Bakterien fungieren [1] [33]. Aufgrund dessen spielt neben der

bakteriziden Wirkung auch die Reinigungswirkung der Linsenmittel gegenüber Lipid- und Proteinablagerung eine ausschlaggebende Rolle. Inwieweit sich die Reinigungswirkung durch die Plasmabehandlung beeinflussen lässt, wurde an lipidbeschichteten Silikon-Hydrogel-Tageslinsen getestet. Durch die Plasmabehandlung der drei Kontaktlinsenlösungen konnte der Reinigungseffekt gegenüber Lipidablagerungen in allen Fällen gesteigert werden. Da neben der Reinigungswirkung des Linsenmittels auch die Verträglichkeit nicht völlig außer Acht gelassen werden sollte, wurde zusätzlich noch getestet, inwieweit sich die KAP-Behandlung auf den pH-Wert der vier Lösungen auswirkt und ob eine Dosisabhängigkeit hierbei ersichtlich wird. Bei den beiden gepufferten Lösungen konnte nur ein geringer pH-Wert-Abfall beobachtet werden, wohingegen bei MP und NaCl ein beträchtlicher Abfall gemessen wurden.

Im nun folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse diskutiert und ein Ausblick bezüglich der KAP-Behandlung von Kontaktlinsenmittel wird gegeben.

	NaCl	PBS	MP		KM	
				BT	EM	B&L
Reaktive Spezies (KZV)	↑	↑	↑	↑	-	-
Reaktive Spezies (LZV)	↑	↑	↑	↑	-	-
Bakterizide Wirkung	↑↑**	-	↑↑**	↔	↔	↔
Lipidreinigung	-	-	↓	↑↑*	↑	↑
pH-Wert	↓↓**	↓**	↓↓*	↓*	-	-

Tabelle 1: Übersicht über die Auswirkung der KAP-Behandlung verschiedener Lösungen auf die Konzentration der reaktiven Spezies im Kurz- (KZV) und Langzeitversuch (LZV), die bakterizide Wirkung gegenüber *Escherichia coli*, den pH-Wert und die Lipidreinigungsfunktion.

Bemerkung: Bezug wird jeweils zur unbehandelten Probe genommen. ↑↑ starker Anstieg, ↑ leichter Anstieg, ↔ keine ersichtliche Auswirkung, ↓ leichter Abfall, ↓↓ starker Abfall, - es wurden keine Versuche durchgeführt.

NaCl (physiologische Kochsalzlösung), PBS (phosphatgepufferte Lösung), MP (Millipore Wasser), KM (Kontaktlinsenlösung), BT (*Biotrue All-in-One-Lösung*), EM (*Eyemax24 Kontaktlinsenlösung*), B&L (*Boston® Ein-Flaschen-Kombi-Lösung*), * signifikante Veränderung nach der maximaler KAP-Behandlungsdauer (5 oder 10 Minuten je nach Versuchsaufbau) im Vergleich zur unbehandelten Lösungen $p < 0.001$, ** signifikante Veränderung nach der maximaler KAP-Behandlungsdauer (5 oder 10 Minuten je nach Versuchsaufbau) im Vergleich zur unbehandelten Lösungen $p < 0.0001$.

4.2 Unmittelbare und langanhaltende Auswirkungen der KAP-Behandlung auf die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) in vier unterschiedlichen Lösungen

Wie bereits unter 4.1 beschrieben lässt sich die Wirkung von KAP auf das synergistische Zusammenspiel verschiedenster physikalischer und chemischer Komponenten zurückführen. Vor allem die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) nehmen hierbei einen wichtigen Stellenwert ein. Die genaue Zusammensetzung der RONS variiert je nach Plasmaquelle, Arbeitsgas, Energieverbrauch, Behandlungszeit und Lage der zu behandelnden Probe zur Elektrode [69]. Die bei der KAP-Behandlung generierten RONS können in Lösungen eindringen und so ihre Wirkung auf diese übertragen. Bei diesen plasmaaktivierten Lösungen (PAL) handelt es sich um ein komplexes Gemisch aus verschiedenen chemischen Komponenten, deren Zusammensetzung von der behandelten Lösung, dem verwendeten Gas sowie der Art der Aktivierung abhängt [136]. Während der Plasmabehandlung von Lösungen können drei Phasen unterschieden werden. Sie werden als Gasphase, Plasma-Flüssigkeits-Grenzfläche und Flüssigkeitsbereich bezeichnet [142]. In der Gasphase liegen kurz- und langlebige reaktive Spezies, wie Stickstoffmonoxid, Ozon, Hydroxylradikale, Singulett-Sauerstoff und Superoxidanionen vor [143]. Durch Zusammenstöße der reaktiven Spezies kann es in der Gasphase zur Ausbildung von Sekundärprodukten kommen. Im Bereich der Plasma-Flüssigkeits-Grenzfläche treten die reaktiven Spezies mit Wasserdampf in Kontakt, bevor dann die wasserlöslichen Spezies in die flüssige Phase übertreten und in Lösung gehen [142] [146]. In PAL sind vor allem langlebige reaktive Spezies enthalten, welche eine wesentliche Rolle für die biologische Wirkung der Lösung spielen. Da es sich hierbei vor allem um Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) handelt [143], führten wir direkt im Anschluss an die KAP-Behandlung eine Konzentrationsbestimmung dieser reaktiven Spezies in den verschiedenen Lösungen durch (Kurzzeitversuch). In einem Langzeitversuch wurde außerdem die Stabilität, der bei der KAP-Behandlung entstandenen reaktiven Spezies über vier Wochen hinweg beobachtet. Kontaktlinsenlösungen können bis zu 90 Tage nach Anbruch benutzt werden, weswegen die Stabilität der reaktiven Spezies über diesen Zeitraum hinweg von immenser Bedeutung ist, zumal die Wirkung von plasmabehandelten Lösungen in erster Linie von den reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies abhängt [147]. In der Vergangenheit gab es bereits Messungen dazu, inwieweit und für wie lange die reaktiven

Spezies in unterschiedlichen Lösungen stabil sind. Die meisten Veröffentlichungen liegen bisher zu plasmabehandeltem Wasser vor, wobei jedoch die Lagerzeiten und die Lagerbedingungen stark variieren [148] [149] [150]. Teilweise wird in den Studien über die antibakterielle Wirkung der plasmabehandelten Lösung auf die Stabilität der reaktiven Spezies geschlossen [147]. Es wird geschlussfolgert, dass ohne eine gesteigerte Konzentration an RONS keine antibakterielle Wirkung der plasmabehandelten Lösung vorliegen kann. In den vorliegenden Studien wurden unterschiedliche Ergebnisse generiert. So nimmt laut Traylor et al. die H_2O_2 - und NO_2^- -Konzentration in plasmaaktiviertem Wasser (PAW) innerhalb von zwei Tagen stark ab und liegt letztendlich unter der Nachweisgrenze [148]. Die NO_3^- -Konzentration hingegen steigt jedoch im Verlauf von vier Tagen langsam an. Beim plasmaaktivierten PBS können demgegenüber im Verlauf von sieben Tagen keine Schwankungen der RONS-Konzentrationen verzeichnet werden [148]. Im Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen von Vlad und Anghel, bei denen sich NO_3^- und H_2O_2 in PAW im Verlauf von einer 21-tägigen Lagerung im Dunkeln bei Raumtemperatur stabil verhalten [149]. Neben den unterschiedlichen Lagerzeiten spielen auch die Lagerungsbedingungen, allen voran die Lagertemperatur, eine besondere Rolle. So untersuchten Shen et al. die H_2O_2 -, NO_2^- und NO_3^- Konzentration in PAW im Verlauf von 30 Tagen bei einer Lagertemperatur von 25, 4, - 20 und - 80 °C. Die H_2O_2 - und NO_2^- -Konzentration verhält sich in diesem Zeitraum bei - 80 °C konstant, wohingegen bei den höheren Temperaturen ein Konzentrationsabfall beobachtet wird. Bei NO_3^- kommt es unabhängig von der Lagertemperatur im Verlauf der 30 Tage zu einem Abfall der Konzentration [150]. Die Lagerung der vier von uns verwendeten Lösungen erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln, da Kontaktlinsengemittel in der Regel so aufbewahrt werden. Interessant wäre es außerdem, in Anlehnung an die vorliegenden Publikationen herauszufinden, inwieweit das Absenken der Temperatur sich auf die Konzentration und die Stabilität von H_2O_2 , NO_2^- und NO_3^- in den vier Lösungen auswirkt.

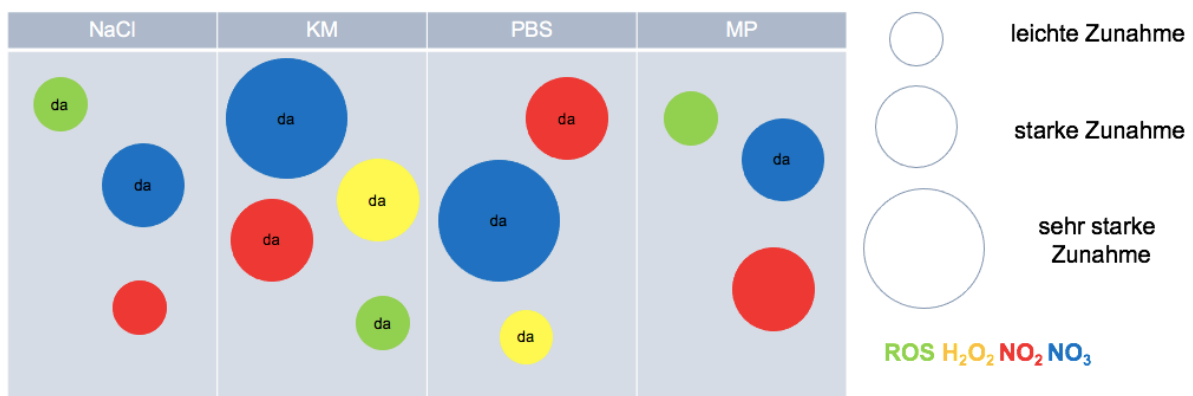


Abbildung 18: Grafische Darstellung der Zunahme der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl), Kontaktlinsenmittel (KM), einer phosphatgepufferten Lösung (PBS) und Millipore Wasser (MP) nach durchgeführter KAP-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Lösung im Kurzzeitversuch. Bemerkung: Konzentration hängt von der KAP-Dosis ab (da), reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Nitrit (NO_2^-), Nitrat (NO_3^-)

4.2.1 Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

Bei H_2O_2 handelt es sich um die wichtigste und stabilste langlebige reaktive Sauerstoffspezies in plasmabehandeltem Wasser [151]. H_2O_2 ist vollständig wasserlöslich [146] und unabhängig von der benutzten Plasmaquelle konnte bereits in der Vergangenheit durch eine KAP-Behandlung eine Konzentrationssteigerung in deionisiertem Wasser beobachtet werden [152]. Andere Untersuchungen konzentrierten sich auf die Auswirkungen der Plasmabehandlung auf die H_2O_2 -Konzentration in der gepufferten Lösung PBS. Auch hierbei konnte eine gesteigerte Menge an H_2O_2 gemessen werden [153]. Zu den beiden weiteren von uns verwendeten Lösungen gab es in Bezug auf die Veränderung der H_2O_2 -Konzentration nach KAP-Behandlung noch keine vergleichbaren Veröffentlichungen.

Die H_2O_2 -Messungen in den beiden ungepufferten Lösungen MP und NaCl brachten sowohl im Kurzzeit- als auch im Langzeitversuch bei den Versuchswiederholungen heterogene Messergebnisse hervor, weswegen eine Auswertung unmöglich war. Bei der später durchgeführten Messung des pH-Wertes stellte sich heraus, dass die stark schwankenden Messergebnisse mit einem pH-Wert-Abfall in MP und NaCl während der Plasmabehandlung in Verbindung stehen könnten, für den der verwendete Assay laut Herstellerangaben nicht ausgelegt ist. Der pH-Wert von PBS und KM verhielt sich hingegen auch nach durchgeführter KAP-Behandlung recht stabil, weswegen die Ermittlung der H_2O_2 -Konzentration nach Plasmabehandlung möglich war. Bei beiden Lösungen konnte direkt nach der KAP-Behandlung ein behandlungsdauerabhängiger H_2O_2 -Anstieg im Vergleich zur unbehandelten Lösung ermittelt werden, was mit den

bereits vorliegenden Daten im Einklang steht [153]. Bei PBS fiel diese gegenüber dem KM geringer aus, was mit dem enthaltenen Puffersystem zu tun haben könnte. Anstelle eines Phosphatpuffers wurden in der *Biotrue All-in-One* Kontaktlinsenlösung von Bausch + Lomb Borverbindungen in Form von Borsäure und Natriumborat verwendet, um den pH-Wert zu stabilisieren. Dies könnte der ausschlaggebende Grund dafür sein, dass bei KM eine größere H_2O_2 -Zunahme nach Plasmabehandlung messbar war. Im Verlauf von vier Wochen nahm diese wieder ab, sie lag jedoch weiterhin über den Werten der unbehandelten Probe. Diese Beobachtung wurde bereits in den vorliegenden Veröffentlichungen bei PAW gemacht. Die Ursache für den Rückgang der H_2O_2 -Konzentration stellt dort die Reaktion von H_2O_2 mit NO_2^- zu Peroxynitrit (ONOO^-) dar [154]. Beim plasmabehandelten PBS konnten im Verlauf von vier Wochen kaum Schwankungen der H_2O_2 -Werte beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass sich H_2O_2 in plasmabehandeltem PBS stabiler verhält. Der enthaltene Phosphatpuffer in PBS könnte sich auf die Reaktion von H_2O_2 mit NO_2^- auswirken, was schlussendlich die Umwandlung von H_2O_2 zu ONOO^- hemmt. H_2O_2 bleibt also erhalten und Schwankungen im Bereich der H_2O_2 -Konzentration bleiben aus. Da sich H_2O_2 über vier Wochen hinweg in den beiden gepufferten Lösungen unterschiedlich verhält, kann davon ausgegangen werden, dass der stabile pH-Wert keinen erheblichen Einfluss auf die H_2O_2 -Konzentration und die Entstehungsreaktion von ONOO^- hat.

4.2.2 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Die reaktiven Sauerstoffspezies werden in kurzlebig und langlebig unterteilt [143]. Zu den Kurzlebigen gehören neben Singulett-Sauerstoff auch Superoxidanionen, wohingegen sich H_2O_2 deutlich stabiler in Lösungen verhält [151] und demnach auch länger und besser nachgewiesen werden kann. Aufgrund dieses Sachverhalts kann davon ausgegangen werden, dass ein Anstieg der ROS-Konzentration auch mit einem Anstieg der H_2O_2 -Konzentration in Verbindung steht.

Im KAP-behandelten MP und NaCl konnte sowohl im Kurzzeit- als auch im Langzeitversuch ein ROS-Anstieg beobachtet werden. Anhand dieser ROS-Zunahme kann davon ausgegangen werden, dass es auch zu einem Anstieg der H_2O_2 -Menge in MP und NaCl kam, welcher mit dem uns vorliegenden Assay jedoch aufgrund der plasmabedingten pH-Wert-Schwankungen nicht messbar war. Diese Beobachtungen würden mit bereits vorliegenden Veröffentlichungen übereinstimmen, bei denen es zu einer gesteigerten H_2O_2 -Konzentration nach KAP-Behandlung kommt [153] [155] [152]. Die

Steigerung der reaktiven Sauerstoffspezies war bei MP im Kurz- und Langzeitversuch unabhängig von der Behandlungsdauer. Bei NaCl hingegen fiel bei beiden Versuchsdurchführungen eine Abhängigkeit zwischen Behandlungsdauer und ROS-Zunahme auf (vgl. Abbildung 18). Bei beiden behandelten Lösungen kam es im Verlauf von vier Wochen zu einem leichten Abfall der ROS-Menge, was mit den Ergebnissen aus der Studie von Tsoukou et al. übereinstimmt [147].

Im KM konnte während des Kurzzeitversuchs ein leichter, behandlungsdauerabhängiger ROS-Anstieg beobachtet werden, welcher im Verlauf von vier Wochen jedoch wieder abnahm. Bei PBS kam es durch die KAP-Behandlung zu keiner ROS-Steigerung. Da in bereits vorliegenden Publikationen der Konzentrationsanstieg von ROS von der Art der Entladung und dem Luftspalt zwischen Plasmaquelle und Flüssigkeit abhing [152] [151], wäre es zu überlegen diese beiden Modifikatoren in zukünftigen Versuchen abzuändern, um auch in PBS einen Anstieg der ROS-Konzentration generieren zu können.

4.2.3 Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-)

Neben H_2O_2 wurden in der Vergangenheit vor allem die beiden reaktiven Stickstoffspezies Nitrat (NO_3^-) und Nitrit (NO_2^-) in PAL nachgewiesen, welche jedoch nur entstehen können, wenn im Trägergas Stickstoff enthalten ist [151]. Aufgrund dessen konzentrierten sich die von uns durchgeführten Untersuchungen auf die Menge dieser beiden RNS in den vier Lösungen nach durchgeführter KAP-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Lösung sowohl im Kurz- als auch im Langzeitversuch. Nach der KAP-Behandlung mit dielektrischer Oberflächenentladung kann in bereits vorliegenden Publikationen in deionisiertem Wasser ein Anstieg der NO_2^- - und NO_3^- -Konzentration verzeichnet werden [156]. Der Ort der Entladung hat hierbei einen immensen Einfluss auf die jeweilige RNS-Konzentration. So können bei einer Entladung direkt im Wasser höhere RNS-Konzentrationen generiert werden als bei der Entladung außerhalb [154]. Da mögliche Interferenzen zwischen der Nachweisreaktion und der in der Lösung enthaltenen Salzkomponenten nicht ausgeschlossen werden können, wurde in den vorliegenden Veröffentlichungen vor allem die Auswirkung der Plasmabehandlung auf die RNS in deionisiertem Wasser untersucht [156].

Die von uns direkt nach der KAP-Behandlung ermittelten NO_2^- - und NO_3^- -Werte in MP stimmen mit diesen bereits bestehenden Erkenntnissen überein. Bei NO_2^- konnte ein starker, dosisunabhängiger Anstieg beobachtet werden. Im Vergleich dazu fiel jedoch

die behandlungsdauerabhängige NO_3^- -Steigerung stärker aus, was damit zusammenhängen könnte, dass NO_2^- über das Zwischenprodukt Peroxynitrit teilweise in NO_3^- umgewandelt wird [155]. Bei NaCl konnte gegenüber dem plasmabehandelten MP nur ein leichter dosisunabhängiger NO_2^- -Anstieg beobachtet werden. Dies könnte mit den enthaltenen Natrium- (Na^+) und Chloridionen (Cl^-) zusammenhängen, die entweder mit dem entstandenen NO_2^- interagieren oder sich auf das kolorimetrische Nitrit-Nitrat-Assay-Kit auswirken. In Bezug auf die NO_3^- -Menge konnte im plasmabehandelten NaCl eine starke dosisabhängige Steigerung beobachtet werden, welche jedoch geringer ausfiel als die in MP. Bei den beiden ungepufferten Lösungen NaCl und MP konnte im Verlauf von vier Wochen ein Abfall der NO_2^- -Menge verzeichnet werden. Bei Oehmingen et al. kommt es bereits eine Woche nach der KAP-Behandlung von deionisiertem Wasser mithilfe einer dielektrischen Oberflächenentladung zu einem Abfall der anfänglich angestiegenen NO_2^- -Konzentration. Als Ursache wurde hier die Umwandlung von NO_2^- zu NO_3^- unter sauren Bedingungen genannt [156]. Durch die KAP-Behandlung kommt es zu einem Abfall des pH-Werts, welcher die Umwandlung von NO_2^- zu salpetriger Säure begünstigt [157]. Dieser Sachverhalt würde auch bei MP und NaCl zutreffen, denn auch bei diesen Lösungen konnte nach der KAP-Behandlung ein saurer pH-Wert gemessen werden. Shen et al. fanden heraus, dass die Stabilisierung der NO_2^- -Konzentration in plasmabehandeltem Wasser durch eine Reduktion der Lagertemperatur möglich ist. So konnte durch eine Reduktion der Lagertemperatur auf -80 °C ein Absinken der NO_2^- -Konzentration im Verlauf von 30 Tagen verhindert werden [150]. Aufgrund dieser Beobachtung könnte man bei zukünftigen Versuchen die Lagertemperatur reduzieren und so versuchen die NO_2^- -Konzentration zu stabilisieren. Bei den beiden gepufferten Lösungen KM und PBS konnte nach der Plasmabehandlung jeweils eine starke dosisabhängige NO_2^- -Steigerung verzeichnet werden, welche mit den Messwerten von MP vergleichbar ist. Dies würde bedeuten, dass die in den beiden gepufferten Lösungen enthaltenen Inhaltsstoffe keine ausschlaggebende Wirkung auf NO_2^- haben. Der NO_3^- -Anstieg im plasmabehandelten PBS war mit dem von NO_2^- vergleichbar. Deshalb kann darauf geschlossen werden, dass die bereits beschriebene Umwandlung von NO_2^- zu NO_3^- in PBS gehemmt wird und sich deswegen NO_2^- stabiler verhält. Während des Langzeitversuchs verhielt sich die NO_2^- -Steigerung in PBS und KM stabil, was mit dem beständigen pH-Wert in Verbindung steht [156].

4.3 Auswirkung der KAP-Behandlung auf die bakterizide Wirkung verschiedener Lösungen am Beispiel von *Escherichia coli*

In der Vergangenheit konnten bei den All-in-One Kontaktlinsenlösungen keine zufriedenstellenden mikrobioziden Wirkungen beobachtet werden [44]. Sie wiesen entweder Wirklücken auf [58] oder waren im schlimmsten Fall selbst die Ursache für die Entstehung von Keratitiden. So kam es beispielsweise im Jahr 2006, in Singapur, Hongkong und den Vereinigten Staaten durch die Nutzung der *ReNUMoistureLoc*-Lösung von Bausch + Lomb zu dem vermehrten Auftreten von mykotischen Hornhautentzündungen [55]. Diese Beobachtungen bezüglich der schlechten antimikrobiellen Wirkung konnten auch bei den von uns durchgeführten Versuchen bestätigt werden. Während der Etablierungsversuche wurde die bakterizide Wirkung von insgesamt neun Kontaktlinsenreinigungsmitteln gegenüber *Escherichia coli* (*E. coli*) getestet. Die beste Wirkung gegenüber den gramnegativen Bakterien konnten durch die *Biotrue All-in-One Lösung* von Bausch + Lomb (BT), die *Boston® Ein-Flaschen-Kombi-Lösung* von Bausch + Lomb (BL) und die *Eyemax24 Kontaktlinsenlösung* von der MPG&E Handel und Service GmbH (EM) generiert werden. Aufgrund dessen erfolgten die nachfolgenden Versuche mit diesen drei Lösungen, bei denen jedoch nur BL nach einer 24-stündigen Einwirkzeit eine desinfizierende Wirkung aufwies. Bei der vom Hersteller angegebenen Einwirkzeit von mindestens vier Stunden lag die Reduktion von *E. coli* bei allen drei Lösungen unter 99,9%. Diesen Kontaktlinsenlösungen können demnach keine desinfizierenden Eigenschaften zugesprochen werden, für die eine Reduktion der Bakterien von 99,999% nötig wäre. Auch durch eine KAP-Behandlung konnte die desinfizierende Wirkung der von uns verwendeten Kontaktlinsenreinigungsmittel nicht verbessert werden. Beim KAP-behandelten MP und NaCl hingegen wurden beeindruckende bakterizide Wirkungen gegenüber *E. coli* verzeichnet. So lag bei den beiden zehnminütig behandelten Lösungen bereits nach einer vierstündigen Einwirkzeit eine desinfizierende Wirkung vor. In der Vergangenheit konnte bereits beobachtet werden, dass durch plasmaaktiviertes Wasser (PAW) eine Inaktivierung von *E. coli* möglich ist [136]. Die Verlängerung der Kontaktzeit mit den Bakterien oder die Steigerung der Plasmabehandlungszeit verbesserte die bakterizide Wirkung der plasmaaktivierten Lösung, was auch bei den von uns durchgeführten Versuchen ersichtlich war [152]. Laut Perinban et al. lassen sich die antimikrobiellen Eigenschaften von PAW auf den

synergistischen Effekt aus dem sauren pH-Wert, dem hohen positiven Oxidations-Reduktionspotential und der Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies zurückführen [151]. Wodurch es zu oxidativen Schäden im Bereich der Zellmembran, dem Abbau der Zellwand, einer Zellschrumpfung, dem Austritt von Cytoplasma oder einem Abbau der DNA kommen kann, was eine bakterizide Wirkung mit sich bringt [147]. In BT kam es zwar zu einem Anstieg der RONS-Konzentration, der pH-Wert-Abfall blieb jedoch aus. Dieses fehlende Zusammenwirken aus saurem pH-Wert und dem Konzentrationsanstieg der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies könnte die Ursache dafür sein, dass die KAP-Behandlung sich nicht auf die bakterizide Wirkung von Kontaktlinsenmitteln auswirkt. Der alleinige Anstieg an RONS in KM reicht demnach nicht aus, um die bakterizide Wirkung gegenüber *E. coli* zu verbessern.

Die von uns generierten Ergebnisse beziehen sich auf Bakterien, die sich in einem planktonischen Zustand befinden. Da die Bakterien auf der Kontaktlinsenoberfläche hingegen adhären und es zu der Ausbildung von Biofilmen kommen kann, wäre es interessant zu überprüfen, ob die Wirkung der plasmabehandelten Lösungen auf planktonische Bakterien mit den von uns ermittelten Ergebnissen übereinstimmt. In vorliegenden Publikationen wurde diesbezüglich erwähnt, dass die Wirkung von plasmaaktiviertem Wasser gegenüber Bakterien im planktonischen Zustand besser ist, da es in der adhären Phase zu der Ausbildung einer Schutzschicht kommt [151]. Neben dem Zustand der Bakterien spielen auch deren Eigenschaften eine immense Rolle, was die Anfälligkeit gegenüber plasmabehandelten Lösungen angeht. Bei *E. coli* handelt es sich beispielsweise um gramnegative Stäbchen, welche Bestandteil der physiologischen Darmflora sind [158]. Pathogenetisch gelangen diese durch kontaminierte Finger auf die Kontaktlinsenoberfläche und somit zwangsweise ins Auge, wo sie folglich Entzündungen verursachen können. Durch *E. coli* hervorgerufene Infektionen des Auges sind jedoch eher selten, da sie direkt von Phagozyten eliminiert werden [159]. Als häufigste infektionsbedingte Kontaktlinsenkomplikation kann die Keratitis angeführt werden, welche in 90% der Fälle bakterieller Genese ist [160] [161]. Als häufigste Erreger in Bezug auf die kontaktlinsenassoziierte Keratitis können *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) und *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) genannt werden [162]. Da die von uns durchgeführten Versuche ausschließlich die antibakterielle Wirkung der verschiedenen plasmabehandelten Lösungen gegenüber *E. coli* untersucht haben, wäre es außerdem von großem Interesse zu untersuchen, ob die Wirkung auf *S. aureus* und *P. aeruginosa* vergleichbar ist. Bei *P. aeruginosa* handelt es

sich wie bei *E. coli* um ein gramnegatives Stäbchen [163], wohingegen *S. aureus* als grampositives, kugelförmiges Bakterium vorliegt [164]. Gegenüber KAP konnte bei gramnegativen Bakterien eine höhere Sensitivität beobachtet werden als bei grampositiven Bakterien [165]. Im direkten Vergleich zu *E. coli* war *S. aureus* gegenüber plasmabehandeltem Wasser weniger anfällig. Jedoch konnten beide Bakterienstämme durch eine 24-stündige Einwirkzeit bis unter die Nachweisgrenze reduziert werden [152]. Neben *E. coli* und *S. aureus* konnte bei PAW auch gegenüber *P. aeruginosa* eine bakterizide Wirkung beobachtet werden [166]. Da die von uns verwendeten Kontaktlinsenlösungen laut Hersteller bis zu drei Monate nach Anbruch benutzt werden können, ist es von großer Bedeutung, dass die gute antibakterielle Wirkung über diesen Zeitraum hinweg erhalten bleibt. Die von uns durchgeführten Versuche berücksichtigen ausschließlich die antibakterielle Wirkung direkt nach der KAP-Behandlung, weswegen an dieser Stelle Bezug auf bereits vorliegende Ergebnisse genommen werden muss. Im Bereich der bakteriellen Langzeitwirkung unterscheiden sich diese jedoch deutlich. Laut Tsoukou et al. hängt die bakterizide Wirkung von PAW stark von der Lagertemperatur ab. Wird PAW demnach bei Raumtemperatur oder 4 °C gelagert, geht die bakterizide Wirkung gegenüber *E. coli* und *S. aureus* vollständig verloren. Bei einer Lagertemperatur von – 80 °C oder – 150 °C hingegen ist auch nach 6 Monaten noch eine bakterizide Wirkung ersichtlich, die keinesfalls dem direkt behandelten PAW etwas nachsteht [147]. Demgegenüber sind die Beobachtungen von Lee et al. zu nennen, gemäß deren Studien die bakterizide Wirkung von PAW unabhängig von der Lagertemperatur über 6 Monate auf *S. aureus*, *E. coli* und *P. aeruginosa* aufrechterhalten werden konnten [166]. In Bezug auf die tägliche Reinigung von Kontaktlinsen mit plasmabehandelter Lösung, wäre es von großer Bedeutung, dass die bakterizide Wirkung auch bei Raumtemperatur aufrecht erhalten bleiben kann. Denn kaum ein Linsenträger hat die Möglichkeit die Reinigungslösung bei – 80 °C oder – 150 °C zu lagern.

4.4 Auswirkung der KAP-Behandlung auf die Reinigungswirkung verschiedener Lösungen gegenüber lipidbeschichteter Kontaktlinsen

Eine mögliche Kontamination der Kontaktlinse mit Bakterien, Viren und Pilzen kann durch Ablagerungen auf der Linsenoberfläche begünstigt werden [33]. Allem Voran sind an dieser Stelle neben den Proteinablagerungen die Lipidablagerungen zu nennen, welche vor allem auf Monats- und Jahreslinsen zu beobachten sind. Diese Lipidablagerungen können entweder exogener oder endogener Genese sein. Wobei die exogenen Lipide vor allem auf Kosmetikprodukte zurückzuführen sind und die endogenen Lipide aus dem Tränenfilm stammen [18]. Die endogenen Lipide bilden den Hauptbestandteil der äußeren Tränenfilmschicht und sollen dem Verdunsten entgegenwirken. Die Lipide werden von der Meibomdrüse sezerniert und beinhalten Cholesterin, Cholesterinester, Triglyceride und Phospholipide [31]. Da während der Etابلierungsversuche keine gleichmäßige Lipidbeschichtung der Silikon-Hydrogel-Tageslinsen mithilfe von Cholesterol möglich war, wurde alternativ natives Olivenöl verwendet. An den lipidbeschichteten Kontaktlinsen wurde im Anschluss die Reinigungswirkung von KAP-behandelten MP, BT, EM und B&L im Vergleich zur jeweils unbehandelten Probe getestet. Bei allen behandelten Kontaktlinsenmitteln konnte gegenüber der unbehandelten Probe eine bessere Reinigungswirkung auf die Lipidbeschichtung verzeichnet werden. Bei MP kam es hingegen zu einer schlechteren Lipidreinigung. In den Kontaktlinsenlösungen konnte eine Konzentrationssteigerung der reaktiven Spezies beobachtet werden, genau wie im MP. Der Anstieg der reaktiven Spezies in den behandelten Lösungen begünstigt eine Lipidoxidation [167]. Bei dieser greifen Radikale die ungesättigten Fettsäuren im Bereich der Doppelbindung an und spalten ein Wasserstoffatom ab. Auf diese Weise entsteht folglich ein Lipidradikal, welches mit Sauerstoff weiter zu einem Peroxylradikal reagiert. Das entstandene Peroxylradikal ist dann in der Lage, eine weitere Doppelbindung anzugreifen. Diese Reaktion geht so lange weiter, bis kein Wasserstoff mehr vorliegt [168]. Bei Olivenöl handelt es sich um ein pflanzliches Öl, welches einen hohen Gehalt an einfach ungesättigten Fettsäuren aufweist [169]. Deshalb ist Olivenöl sehr anfällig für die Oxidation durch Radikale [170]. Aber nicht nur in den Fettsäuren vom Olivenöl sind Doppelbindungen enthalten, sondern auch im Cholesterin, den Cholesterinestern, den Triglyceriden und den Phospholipiden des Tränenfilms [171-173]. Aufgrund dessen kann davon ausgegangen

werden, dass es auch bei diesen Lipiden bei Kontakt mit plasmabehandelten Lösungen zu einer Lipidoxidation kommt. Inwieweit diese Oxidation aber eine Folge auf die Reinigung und den Tragekomfort der Kontaktlinse hat, muss noch geklärt werden.

Der einzige Unterschied, der zwischen den gepufferten Kontaktlinsenlösungen und dem ungepufferten MP beobachtet werden konnte, war der pH-Wert. Durch die Plasmabehandlung nimmt der pH-Wert von MP ab und liegt letztendlich im sauren Bereich, wohingegen sich der pH-Wert der Kontaktlinsenlösung recht stabil verhält. Bei einem Abfall des pH-Wertes kommt es in der Lösung zu einem Konzentrationsanstieg der Wasserstoffionen [174]. Diese Ionen sind einfach positiv geladen. Das Kontaktlinsenmaterial von Silikon-Hydrogel-Linsen besteht hingegen aus einem negativ geladenen Material [19]. Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden, dass sich die positiv geladenen Wasserstoffionen an die Linse lagern. Das hat zur Folge, dass das Linsenmaterial in einen ungeladenen Zustand übergeht, was den Lipiden wiederum die Anlagerung erleichtert. Bei Lipiden handelt es sich um hydrophobe Reagenzien, die sich nicht in polaren Lösungsmitteln lösen lassen [175] und sich deswegen schlecht auf der geladene Linsenoberfläche ablagern. Aufgrund dessen nimmt mit der KAP-Behandlung und dem daraus resultierenden pH-Wert-Abfall die Reinigungswirkung von MP gegenüber lipidbeschichteter Silikon-Hydrogel-Kontaktlinsen ab. In den Kontaktlinsenlösungen sind anders als bei MP noch viele weitere Wirkstoffe enthalten, die zu einer Lipidreinigung führen. Da bei allen Kontaktlinsenlösungen nach der KAP-Behandlung eine bessere Lipidreinigung ersichtlich war, kann davon ausgegangen werden, dass das Plasma einen unterstützenden Effekt auf diese reinigenden Inhaltsstoffe hat. In den von uns durchgeführten Versuchen wurden ausschließlich Tageslinsen verwendet, welche in der Regel nicht gereinigt, sondern direkt nach dem Gebrauch verworfen werden. Es wäre demnach von großem Interesse, ob auch bei Monats- oder Jahreslinsen eine verbesserte Lipidreinigung durch die KAP-Behandlung der Linsenlösung erzielt werden kann.

4.5 Auswirkung der KAP-Behandlung auf den pH-Wert von verschiedenen Lösungen

Wie in bereits vielen vorliegenden Publikationen beschrieben, konnten auch wir einen Abfall des pH-Wertes in den beiden ungepufferten Lösungen MP und NaCl beobachten [152, 155, 176]. Mit zunehmender Plasmaexposition sank der pH-Wert immer weiter ab und lag letztendlich im sauren Bereich. Für den Abfall des pH-Wertes sind die reaktiven Spezies verantwortlich, die bei der Plasmabehandlung entstehen. Sie reagieren mit der Lösung und bilden saure Komponenten, wie salpetrige Säure, Salpetersäure und Wasserstoffperoxid. Diese sind dann die Ursache für das Absinken des pH-Wertes [151]. Da die reaktiven Spezies je nach verwendetem Trägergas variieren können, hängt schlussendlich auch der pH-Wert der Lösung von diesem ab. Fungiert die Umgebungsluft beispielsweise als Trägergas, oder ist Stickstoff in ihr enthalten, kommt es zur Ausbildung von Stickoxiden. Diese führen konsekutiv zu einem Absinken des pH-Wertes, wenn sie in Lösung gehen [151]. Der saure pH-Wert begünstigt dann wiederum die Ausbildung neuer chemischer Spezies [154]. Laut Thirumdas et al. verhält sich der pH-Wert-Abfall über 30 Tage hinweg bei verschiedenen Temperaturen stabil [154]. Aufgrund der Tatsache, dass durch die Plasmabehandlung von MP und NaCl eine Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich erfolgt, ist der Einsatz dieser Lösungen bei der Kontaktlinsenreinigung eher kritisch zu bewerten, da es pH-Wert-empfindliche Linsen gibt, welche bei pH-Wert-Schwankungen ihre Form verändern. Durch die Verschiebung des pH-Werts in den sauren Bereich, kommt es zu einer Reduktion des Durchmessers sowie des hinteren optischen Radius [39]. Außerdem können die sauren Lösungen nach dem Reinigungsprozess in das Auge gelangen, was Irritationen begünstigt. Um dies zu verhindern, könnten Kontaktlinsenträger eine neutralisierende Lösung auf die Linse geben, bevor sie diese auf das Auge setzen. Ein vergleichbarer Neutralisationsprozess findet bereits bei den sehr gut wirkenden Peroxidsystemen Verwendung [1]. Nach der Reinigung mit H_2O_2 kommen Katalase- oder Natriumpyruvatlösungen zum Einsatz, um den sauren pH-Wert zu neutralisieren [41]. Man muss jedoch bedenken, dass ein weiterer Schritt bei der Reinigung mehr Aufwand für den Kontaktlinsenträger bedeuten würde. Bei KM und PBS wurde durch die KAP-Behandlung der pH-Wert kaum beeinflusst. Er lag auch nach der fünfminütigen Behandlung noch im neutralen Bereich, was sich auf das Puffersystem zurückführen lässt, das in beiden Lösungen enthalten ist. Puffersysteme sind in der Lage bei Zugabe

einer Säure oder einer Base eine Veränderung des pH-Wertes zu verhindern. Hierfür enthalten sie ein konjugiertes Säure-Base-Paar. Die Aufgabe der Säure besteht darin die anfallenden OH⁻-Ionen abzufangen, wohingegen die Base die H⁺-Ionen neutralisiert [177]. In Kontaktlinsenlösungen fungiert neben Phosphat auch Borat als Puffersystem, damit der pH-Wert der Lösung möglichst dem der physiologischen Tränenflüssigkeit entspricht [39]. In denen von uns getesteten Kontaktlinsenmitteln wurde Natriumborat als Puffersystem verwendet. Aufgrund des stabilen pH-Wertes ist daher nichts gegen die Plasmabehandlung von Kontaktlinsenlösungen einzuwenden.

Abschließend soll noch einmal ein Bezug zur ursprünglichen Fragestellung genommen werden. Kann durch eine KAP-Behandlung die Wirkung von Kontaktlinsenmitteln verbessert und so das Risiko für mögliche Kontaktlinsenkomplikationen, wie die infektiöse Keratitis reduziert werden?

Eine positive Auswirkung der KAP-Behandlung war vor allem bei der Reinigung der Kontaktlinsen von Lipidablagerungen ersichtlich. Diese verbesserte Reinigung der Linsenoberfläche von Lipiden wirkt sich letztendlich auf die Adhäsion von Mikroorganismen aus. Die Lipidablagerungen werden also stark vermindert, was folglich die Kontamination durch Bakterien, Viren und Pilze reduziert. Aufgrund der verminderten Mikroorganismenadhäsion sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass der Linsenträger eine infektionsbedingte Kontaktlinsenkomplikation erleidet. In Bezug auf die bakterizide Wirkung von Kontaktlinsenmittel gegenüber *E. coli* konnten durch die KAP-Behandlung keine erheblichen Veränderungen im Vergleich zur unbehandelten Kontaktlinsenlösung festgestellt werden. Diese Beobachtung unterstützt die bereits bestehende Vermutung, dass die bakterizide Wirkung von plasmabehandelten Lösungen nicht ausschließlich vom Anstieg der RONS abhängt. Sie lässt sich auf den synergetischen Effekt zwischen den RONS und dem pH-Wert-Abfall zurückführen [176]. Im plasmabehandelten Kontaktlinsenmittel konnte zwar ein Anstieg aller RONS beobachtet werden, jedoch verhielt sich der pH-Wert sehr stabil und lag auch nach durchgeführter KAP-Behandlung noch im neutralen Bereich. Anders war dies beim plasmabehandelten MP, wo neben der gesteigerten RONS-Menge auch ein Abfall des pH-Wertes beobachtet wurde. In Bezug auf die bakterizide Wirkung gegenüber *E. coli* konnte das behandelte MP faszinierende Ergebnisse erzielen, welche sogar mit einer 3%igen H₂O₂ Lösung vergleichbar waren. Würde man aufgrund der guten bakteriziden Wirkung ausschließ-

lich plasmabehandeltes MP zur Kontaktlinsenreinigung verwenden, würde es im Bereich des Auges zu Irritationen kommen, da der pH-Wert der Lösung nicht dem der physiologischen Tränenflüssigkeit entspricht. Aufgrund dessen liegt die Überlegung nahe, ob plasmabehandeltes MP in Kombination mit plasmabehandeltem Kontaktlinsenmittel Anwendung finden soll. In einem ersten Schritt würde man mittels KAP-behandeltem MP die Linse von Bakterien befreien, bevor in einem zweiten Schritt die Linse mit plasmabehandeltem KM in Kontakt kommt. In dem zweiten Schritt würde dann eine Neutralisation des pH-Wertes und eine intensiviertere Reinigung der Linse von Lipidablagerungen erfolgen. Auf diese Weise ließen sich die Vorteile beider behandelten Lösungen kombinieren, was die Kontaktlinsenreinigung effizienter gestalten und das Auftreten von Kontaktlinsenkomplikationen mindern würde. Da Kontaktlinsenreinigungsmittel laut Hersteller bis zu 90 Tage nach Anbruch verwendet werden können, müsste außerdem getestet werden, ob die gesteigerte Lipidreinigung auch noch nach dieser Zeit bei den plasmabehandelten Lösungen vorliegt. Während der Langzeitversuche ist aufgefallen, dass es im Verlauf von vier Wochen zu einem Abfall aller reaktiven Spezies im behandelten MP kommt. Da die bakterizide Wirkung vor allem von diesen reaktiven Spezies abhängt, gilt es außerdem abzuklären ob und wie weit diese im Verlauf von 90 Tagen noch absinken und ob dies eine Auswirkung auf die bakterizide Wirkung der Lösung hat. In bereits vorliegenden Publikationen wurde herausgefunden, dass durch ein Absenken der Lagertemperatur die Stabilisierung der reaktiven Spezies möglich ist [150], was sich mit großer Wahrscheinlichkeit auch auf MP übertragen ließe.

5. Zusammenfassung

Das Auftreten von Kontaktlinsenkomplikationen, hervorgerufen durch eine mangelhafte Reinigung der Linsen mithilfe von sogenannten „All-in-One-Kontaktlinsenreinigungslösungen“ stellt global gesehen ein medizinisch relevantes Problem dar. Daher liegt ein Hauptfokus klinischer Forschungsbemühungen in diesem Bereich auf der Identifikation und der Etablierung neuartiger sowie potenter Substanzen zur Reinigung von Kontaktlinsen. Durch kaltes atmosphärisches Plasma (KAP) konnten in der Vergangenheit in diversen medizinischen Bereichen hervorragende antibakterielle Effekte erzielt werden, welche sich auch auf Lösungen übertragen ließen. Aufgrund dieses Sachverhalts sollte in dieser Dissertation geklärt werden, ob durch die KAP-Behandlung von Kontaktlinsenlösungen eine bessere Reinigungswirkung von Kontaktlinsen erzielt werden kann. Neben den Kontaktlinsenlösungen wurden drei zusätzlichen Lösungen in die Versuche mit einbezogen. Es handelt sich um Millipore Wasser (MP), physiologische Kochsalzlösung (NaCl) und eine phosphatgepufferte Lösung (PBS). Da vor allem die Konzentration der reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffspezies (RONS) eine Schlüsselrolle bei der antibakteriellen Wirkung der Lösungen einnimmt, wurde zuerst die Konzentration der RONS in KM, NaCl, PBS und MP nach durchgeführter KAP-Behandlung (4 kHz; 1, 2, 5 min) bestimmt. Die Messung von den reaktiven Sauerstoffspezies, Wasserstoff, Nitrit und Nitrat erfolgte dazu direkt nach der KAP-Behandlung (Kurzzeitversuch) und im Verlauf von vier Wochen (Langzeitversuch). Auf diese Weise wurde die Stabilität der RONS in den Lösungen evaluiert. Des Weiteren wurde die antibakterielle Wirkung der plasmabehandelten Lösungen auf *Escherichia coli* getestet. Hierzu wurden die *Biotrue All-in-One Lösung* von Bausch + Lomb (BT), die *Boston® Ein-Flaschen-Kombi-Lösung* von Bausch + Lomb (BL) sowie die *Eyemax24 Kontaktlinsenlösung* von der MPG&E Handel und Service GmbH (EM) verwendet. Neben dem Einsatz unterschiedlicher Kontaktlinsenreinigungsmittel wurde die Einwirkzeit der Lösungen auf die Bakterien von einer Stunde auf bis zu 24 Stunden verlängert. Ein weiteres Augenmerk wurde auf die Reinigungswirkung der KAP-behandelten Lösungen gegenüber lipidbeschichteten Silikon-Hydrogel-Tageslinsen gelegt, bevor abschließend die Messung des pH-Wertes der KAP-behandelten Lösungen erfolgte. Letztendlich konnte direkt nach der KAP-Behandlung ein Anstieg der RONS-Konzentration in den Lösungen verzeichnet werden, welcher sich im Verlauf von vier

Wochen als stabil erwies bzw. leicht absank. Bezüglich der antibakteriellen Wirkung gegenüber *E. coli* konnten bei den plasmabehandelten Kontaktlinsenlösungen keine fundamentalen Einflüsse verzeichnet werden, wohingegen bei MP und NaCl durch die KAP-Behandlung desinfizierende Eigenschaften mit einer Keimreduktion um 99,999% generiert wurden. Die Reinigungswirkung der Kontaktlinsenmittel auf lipidbeschichtete Silikon-Hydrogel-Tageslinsen konnte jedoch durch die Plasmabehandlung deutlich verbessert werden, während sich die Reinigungswirkung von MP nach erfolgter Plasmabehandlung verschlechterte. Bei der abschließenden Messung des pH-Wertes fiel auf, dass es bei MP und NaCl nach der KAP-Behandlung zu einem deutlichen Abfall des pH-Wertes kam, wohingegen in den gepufferten Lösungen KM und PBS kaum Schwankungen verzeichnet werden konnten.

Schlussendlich kann durch die vorliegenden Ergebnisse die Hypothese propagiert werden, dass durch die KAP-Behandlung von Kontaktlinsenlösungen keine Verbesserung der antibakteriellen Wirkung gegenüber *E. coli* generiert werden kann. Jenseits der alleinigen KAP-Behandlung, ist sicherlich eine perspektivisch interessante Fragestellung, ob sich die bisherige Kontaktlinsenreinigung nicht durch plasmabehandelte Medien, wie beispielsweise MP oder NaCl, ergänzen ließe. Gerade gegenüber *E. coli* entfalteten diese beiden plasmabehandelten Lösungen eine beeindruckende antibakterielle Wirkung, welche einem Desinfektionsmittel in keiner Weise etwas nachsteht. In zukünftig durchgeführten Versuchen gilt es noch zu klären, ob sich diese Wirkung ausschließlich auf *E. coli* bezieht, oder ob die Haupterreger für die kontaktlinsenassoziierte Keratitis, *S. aureus* und *P. aeruginosa*, genauso effizient eliminiert werden können. Der immense Vorteil der beiden plasmabehandelten Medien gegenüber den standardmäßigen Desinfektionsmitteln besteht darin, dass sie keine potentiell allergenen Stoffe beinhalten und bisher keine Resistenzen von Bakterien nachgewiesen werden konnten. Während der Plasmabehandlung von MP und NaCl wurde zwar ein Abfall des pH-Wertes in den sauren Bereich verzeichnet, welcher das Auge beim Einsetzen der Linse reizen könnte, jedoch könnte man diesen verhindern, indem man die Linse vor dem Einsetzen mit einer plasmabehandelten Kontaktlinsenlösung abspült. Dadurch würde der pH-Wert wieder im Bereich des physiologischen Tränenfilms liegen. Außerdem könnte man sich so die pflegenden Eigenschaften des Linsenmittels zunutze machen, was den Tragkomfort deutlich steigern würde. Des Weiteren haben

unsere Versuche gezeigt, dass durch die KAP-behandelte Kontaktlinsenlösung die Lipidablagerungen auf den Linsen deutlich reduziert werden konnten, was eine zukünftige Bakterienadhäsion immens verringert und somit auch das Risiko für den Kontaktlinsenträger an einer kontaktlinsenassoziierten Keratitis zu erkranken, deutlich reduziert. Anhand dieser Überlegungen wird klar, dass weitere experimentelle wie auch translationale klinische Forschungsarbeit nötig ist, bevor abschließend geklärt werden kann, ob sich KAP als Bereicherung in der Kontaktlinsenreinigung erweist. Gerade das, in der vorliegenden Arbeit gezeigte, antibakterielle Potential von KAP-behandelten Lösungen könnte zukünftig schwerwiegende okuläre Infektionen bei Kontaktlinsenträgern reduzieren und damit eine neuartige Säule der Primärprophylaxe in der Medizin beschreiben.

6. Anhang

6.1 Tabellen

Tabelle 1	Übersicht über die Auswirkung der KAP-Behandlung verschiedener Lösungen auf die Konzentration der reaktiven Spezies im Kurz- (KZV) und Langzeitversuch (LZV), die bakterizide Wirkung gegenüber <i>Escherichia coli</i> , den pH-Wert und die Lipidreinigungsfunktion
-----------	---

6.2 Abbildungen

Abbildung 1	Vereinfachte grafische Darstellung des Funktionsprinzips von a) Volumen-DBEs, b) Oberflächen-DBEs und c) Plasmajets
Abbildung 2	Aufbau des <i>plasma care</i> ® Geräts von Terraplasma
Abbildung 3	Übersicht der verschiedenen Wirkkomponenten von KAP
Abbildung 4	ROS-Intensität im Kurzzeitversuch von NaCl, KM, PBS und MP im unbehandelten Zustand sowie nach 1-, 2- und 5-minütiger Plasmabehandlung (4 kHz)
Abbildung 5	H ₂ O ₂ -Intensität im Kurzzeitversuch von NaCl, KM, PBS und MP im unbehandelten Zustand sowie nach 1-, 2- und 5-minütiger Plasmabehandlung (4 kHz)
Abbildung 6	NO ₂ ⁻ -Intensität im Kurzzeitversuch von NaCl, KM, PBS und MP im unbehandelten Zustand sowie nach 1-, 2- und 5-minütiger Plasmabehandlung (4 kHz)
Abbildung 7	NO ₃ ⁻ -Intensität im Kurzzeitversuch von NaCl, KM, PBS und MP im unbehandelten Zustand sowie nach 1-, 2- und 5-minütiger Plasmabehandlung (4 kHz)

- Abbildung 8 ROS- Intensität im Langzeitversuch von a) NaCl, b) KM, c) PBS und d) MP im unbehandelten Zustand sowie nach 1-, 2- und 5-minütiger Plasmabehandlung (4 kHz) im Verlauf von vier Wochen
- Abbildung 9 H₂O₂- Intensität im Langzeitversuch von a) KM und b) PBS im unbehandelten Zustand sowie nach 1-, 2- und 5-minütiger Plasmabehandlung (4 kHz) im Verlauf von vier Wochen
- Abbildung 10 NO₂⁻- Intensität im Langzeitversuch von a) NaCl, b) KM, c) PBS und d) MP im unbehandelten Zustand sowie nach 1-, 2- und 5-minütiger Plasmabehandlung (4 kHz) im Verlauf von vier Wochen
- Abbildung 11 NO₃⁻- Intensität im Langzeitversuch von a) NaCl, b) KM, c) PBS und d) MP im unbehandelten Zustand sowie nach 1-, 2- und 5-minütiger Plasmabehandlung (4 kHz) im Verlauf von vier Wochen
- Abbildung 12 Bakterizide Wirkung von KAP-behandelten Millipore Wasser (MP) auf *Escherichia coli* (*E. coli*) nach einer Stunde Einwirkzeit. Dargestellt werden die koloniebildenden Einheiten (KBE) in MP nach zwei-, fünf- und zehnminütiger KAP-Behandlung (4 kHz)
- Abbildung 13 Bakterizide Wirkung von KAP-behandelten Kontaktlinsenmittel (KM) auf *Escherichia coli* nach einer Stunde Einwirkzeit
- Abbildung 14 Bakterizide Wirkung von unterschiedlichen KAP-behandelten Lösungen auf *Escherichia coli* nach a) einer, b) vier und c) 24 Stunden Einwirkzeit
- Abbildung 15 Vergleich der Reinigungswirkung von unbehandeltem Millipore Wasser (MP), der *Biotrue All-in-One-Lösung* von Bausch + Lomb (BT), der *Eyemax24 Kontaktlinsenlösung* von der MPG&E Handel und Service GmbH (EM) und der *Boston® Ein-Flaschen-Kombi-Lösung* von Bausch + Lomb (B&L) mit der jeweils plasmabehandelten Lösung (4 kHz) auf lipidbeschichtete Kontaktlinsen
- Abbildung 16 Exemplarische Darstellung der Reinigungswirkung von Millipore Wasser (MP), der *Biotrue All-in-One-Lösung* von Bausch + Lomb (BT), der *Eyemax24 Kontaktlinsenlösung* von der MPG&E Handel und Service GmbH (EM) und der *Boston® Ein-Flaschen-Kombi-*

Lösung von Bausch + Lomb (B&L) nach Plasmabehandlung (4 kHz) und im unbehandelten Zustand auf lipidbeschichtete Silikon-Hydrogel-Tageslinsen unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 5-facher Vergrößerung

Abbildung 17 Auswirkung der KAP-Behandlung (4 kHz) auf den pH-Wert von Kontaktlinsenmittel (KM), phosphatgepufferte Lösung (PBS), Millipore Wasser (MP) und physiologische Kochsalzlösung (NaCl)

Abbildung 18 Grafische Darstellung der Zunahme der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl), Kontaktlinsenmittel (KM), einer phosphatgepufferten Lösung (PBS) und Millipore Wasser (MP) nach durchgeführter KAP-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Lösung im Kurzzeitversuch

6.3 Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
B&L	<i>Boston® Ein-Flaschen-Kombi-Lösung</i>
BT	<i>Biotrue All-in-One-Lösung</i>
CHX	Chlorhexamed
DBE	dielektrisch behinderte Entladungen
DK-Wert	Sauerstoffdurchlässigkeit von Kontaktlinsenmaterialien
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRH 123	Dihydrorhodamin 123
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Em	Emission
EM	<i>Eyemax24 Kontaktlinsenlösung</i>
Ex	Extinktion
HEMA	Hydroxyethylmethacrylat
HEMA/DMA – Polymer	Hydroxyethylmethacrylat – Vinylpyrrolidon – Polymer
HEMA/NVP – Polymer	Hydroxyethylmethacrylat – Glycerolmethocrylat – Polymer
HEMA/PC – Polymer	Hydroxyethylmethacrylat – Phospharylcholin – Polymer
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HSV	Herpes-Simplex-Virus
IL-6/8	<i>Interleukin-6/8</i>
KAP	kaltes atmosphärisches Plasma
KBE	koloniebildende Einheiten
KM	Kontaktlinsenmittel (<i>Biotrue All-in-One-Lösung</i>)
LZV	Langzeitversuch
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MMA	Methylmetacrylat
MP	Millipore Wasser

MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	physiologische Kochsalzlösung
NaNO ₂	Natriumnitrit
NaNO ₃	Natriumnitrat
NK	Negativkontrolle
•NO	Stickstoffmonoxid
•NO ₂	Stickstoffdioxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
O ₂ ⁻	Superoxid
¹ O ₂	Singulett Sauerstoff
•OH	Hydroxylradikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAL	plasmaaktivierte Lösung
PAW	plasmaaktiviertes Wasser
pHEMA	Poly(2-Hydroxyethylmethacrylat)
PK	Positivkontrolle
PMMA	Polymethylmethacrylat
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
R 123	Rhodamin 123
RNS	reaktive Stickstoffspezies
RONs	reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SMD	Oberflächenmikroentladung
TGF-β1/β2	<i>Transforming Growth Factor β1/β2</i>
vT-Linsen	weiche Kontaktlinsen mit einer verlängerten Tragedauer
UV	ultraviolette Strahlung

7. Literaturverzeichnis

1. Kuhn, D. and O. Hoppe, *Anpassung weicher Kontaktlinsen*. Klin Monbl Augenheilkd, 2006. **223**(06): p. R47-R71.
2. Pearson, R.M. and N. Efron, *Hundredth anniversary of August Müller's inaugural dissertation on contact lenses*. Surv Ophthalmol, 1989. **34**(2): p. 133-41.
3. Scholtz, S., *Geschichte der Entwicklung von Sehhilfen unter besonderer Berücksichtigung der Verfahren der letzten 50 Jahre*. . 2005, Heidelberg University: Heidelberg.
4. Jack Schaeffer, J.B., *The Early History of Contact Lenses*. 2012.
5. Hänisch, K.T., B. Neppert, and G. Geerling, *[Gas permeable scleral lenses as a conservative treatment option for extreme corneal ectasias and severe dry eye]*. Ophthalmologe, 2005. **102**(4): p. 387-92.
6. Birgit Hartmann, W.G., *Arbeitsplatz Augenpraxis*. Vol. 2. 2019: Springer Berlin Heidelberg.
7. *Formstabile Kontaktlinsen*. 03.10.2022]; Available from: <https://www.kontaktlinseninfo.de/kontaktlinsenarten/formstabile-kontaktlinsen/>
8. Bischoff, G., *Medizinische Kontaktologie: formstabile Kontaktlinsen*. Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde, 2006.
9. Schoetz, U., et al., *Early senescence and production of senescence-associated cytokines are major determinants of radioresistance in head-and-neck squamous cell carcinoma*. Cell Death Dis, 2021. **12**(12): p. 1162.
10. Lang, G.K., *Augenheilkunde*. 2019, Stuttgart: Thieme. 333-335, 98-103.
11. Augustin, A.J., *Augenheilkunde*. 2019, Heidelberg: Kaden, R. 621-629.
12. Kiefer, F.W., et al., *Retinaldehyde dehydrogenase 1 regulates a thermogenic program in white adipose tissue*. Nat Med, 2012. **18**(6): p. 918-25.
13. Schuderer, J.G., et al., *Surgical and remote site infections after reconstructive surgery of the head and neck: A risk factor analysis*. J Craniomaxillofac Surg, 2022. **50**(2): p. 178-187.
14. Mamilos, A., et al., *The first quantitative histomorphological analyses of bone vitality and inflammation in surgical specimens of patients with medication-related osteonecrosis of the jaw*. J Oral Pathol Med, 2021. **50**(1): p. 76-84.
15. Bischoff, G. and U. Brocks, *Kontaktlinsen und Keratitis*. Klin Monbl Augenheilkd, 2012. **229**(05): p. 514-520.
16. Pult, H. and R. Khairuddin, *Praktische Tipps und Vorgehensweise bei der Anpassung weicher Kontaktlinsen*. Der Ophthalmologe, 2013. **110**.
17. Sindt, C.W. and R.A. Longmuir, *Contact lens strategies for the patient with dry eye*. Ocul Surf, 2007. **5**(4): p. 294-307.
18. Sturm, D., *die KONTAKTLINSE*, 2020: p. 22-27.
19. Lomb, B. *Boston Materialien und Lösungen - Produktleitfaden*. 2013; Available from: <https://www.fit-boston.eu/downloads/pdf/ProductGuideDE.pdf>.
20. Kyle, R.A., D.P. Steensma, and M.A. Shampo, *Otto Wichterle--Inventor of the First Soft Contact Lenses*. Mayo Clin Proc, 2016. **91**(3): p. e45-6.

21. Janiak, C., *Proteinentfernung von Kontaktlinsen: Damit der Durchblick erhalten bleibt*. Chemie in unserer Zeit, 2001. **35**(6): p. 348-354.
22. *Hydrogel*.
23. Childs, A., et al., *Fabricating customized hydrogel contact lens*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 34905.
24. Müller-Treiber, A., *Kontaktlinsen – Materialien • Hygiene • Pflegemittel*. 2007, Leinfelden-Echterdingen Konradin Verlag R Kohlhammer GmbH. 7-36.
25. *Weiche Kontaktlinsen*. 05.10.2022]; Available from: <https://www.kontaktlinseninfo.de/kontaktlinsenarten/weiche-kontaktlinsen/>.
26. Livonius, B., R. Emminger, and T. Ring-Mangold, *Grundlagen der praktischen Kontaktlinsenanpassung. Teil I: Materialien, Einsatzbereiche und Unterschiede in der Optik im Vergleich zur Brille*. Augenheilkunde up2date, 2021. **11**: p. 63-75.
27. Long, B., et al., *Expanding your use of silicone hydrogel contact lenses: using lotrafilcon A for daily wear*. Eye Contact Lens, 2009. **35**(2): p. 59-64.
28. 05.10.2022]; Available from: <https://www.lensvision.ch/ratgeber/kontaktlinsen-material/>.
29. Bischoff, G., *Moderne Hightech-Kontaktlinsen 2018 – mehr als nur ein Refraktionsausgleich*. Augenheilkunde up2date, 2018. **8**: p. 187-202.
30. *Tränenfilm*.
31. Eule, C., *Der Tränenfilm - Überlebensfaktor für das Auge*. kleintier konkret, 2007. **10**(01): p. 14-18.
32. Jones, L., et al., *Lysozyme and lipid deposition on silicone hydrogel contact lens materials*. Eye Contact Lens, 2003. **29**(1 Suppl): p. S75-9; discussion S83-4, S192-4.
33. *Qualifizierung und Ursachen von Kontaktlinsen Ablagerungen*. 2005 05.10.2022]; Available from: <https://www.optikum.at/qualifizierung-und-ursachen-von-kontaktlinsen-ablagerungen/>.
34. Roth, H.-W., *Kontaktlinsenkomplikationen*. 2002, Stuttgart: Thieme.
35. Blümle, S., T. Kaercher, and R. Khairuddin, *Richtige Kontaktlinsenhygiene*. Der Ophthalmologe, 2013. **110**.
36. Moreddu, R., D. Vigolo, and A.K. Yetisen, *Contact Lens Technology: From Fundamentals to Applications*. Adv Healthc Mater, 2019. **8**(15): p. e1900368.
37. Schelle, H., *Kontaktlinsen - Neues Sehen - selbst erleben*. 2000: Trias. 126-35, 61-63, 75-80, 123-135.
38. *Kontaktlinsen reinigen - so funktioniert's*. 05.10.2022]; Available from: <https://www.meinelinse.de/magazin/pflege-kontaktlinsen>.
39. Veys, J., M. J., and D. I., *Contact Lens Care*. The Vision Care Institute, 2008.
40. Kilvington, S. and J. Lonnen, *A comparison of regimen methods for the removal and inactivation of bacteria, fungi and Acanthamoeba from two types of silicone hydrogel lenses*. Cont Lens Anterior Eye, 2009. **32**(2): p. 73-7.
41. Hughes, R. and S. Kilvington, *Comparison of hydrogen peroxide contact lens disinfection systems and solutions against Acanthamoeba polyphaga*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(7): p. 2038-43.
42. Wagner, D., *Testung von 6 Kontaktlinsenpflegemitteln nach DIN EN ISO 14729 auf deren mikrobiozide Wirkung nach Zugabe einer tränenflüssigkeitähnlichen Lösung in Form von menschlichem Serum*. 2012, Greifswald.
43. Butcko, V., et al., *Microbial keratitis and the role of rub and rinsing*. Eye Contact Lens, 2007. **33**(6 Pt 2): p. 421-3; discussion 424-5.
44. Kramer, A., P. Rudolph, and H.P. Werner, *Antimicrobial efficacy of contact lens care products and critical comment on ISO/FDIS 14729*. Dev Ophthalmol, 2002. **33**: p. 343-61.

45. Schneider, A., *In-vitro-Prüfung der mikrobioziden Wirksamkeit von 17 Kontaktlinsenpflegesystemen für weiche Linsen auf Basis der DIN ISO 14729*. 2008, Greifswald.
46. *DIN EN ISO 14729 Augenoptik - Kontaktlinsenpflegemittel - Mikrobiologische Anforderungen und Prüfverfahren für Produkte und Systeme zum Hygienemanagement von Kontaktlinsen*. 2001 08.10.2022]; Available from: <https://www.din.de/de/mitwirken/normenausschuesse/nafo/veroeffentlichungen/wdc-beuth:din21:132686543>.
47. Arndt, E., *Antimikrobielle Reinigung weicher Kontaktlinsen mit UV-Strahlung*. 2016, Greifswald.
48. Lemp, M.A. and J.B. Gold, *Tränenfilmdagnostik bei Kontaktlinsenträgern**. Klin Monbl Augenheilkd, 1990. **197**(09): p. 202-206.
49. Bialasiewicz, A., et al., *Mikrobielle Keratitis*. Der Ophthalmologe, 2006. **103**(8): p. 682-687.
50. Grus, F.H., et al., *Analysis of tear protein patterns for the diagnosis of dry eye*. Adv Exp Med Biol, 2002. **506**(Pt B): p. 1213-6.
51. Berke, A. and W. Cagnolati, *Contact lens hygiene*. Dev Ophthalmol, 2002. **33**: p. 328-42.
52. Sweeney, D.F., et al., *Microbial colonization of soft contact lenses over time*. Optom Vis Sci, 2001. **78**(2): p. 100-5.
53. Ladage, P.M., et al., *Effects of rigid and soft contact lens daily wear on corneal epithelium, tear lactate dehydrogenase, and bacterial binding to exfoliated epithelial cells*. Ophthalmology, 2001. **108**(7): p. 1279-88.
54. Kramer, A., et al., *Incidence, causes and prevention of contact-lens-associated infectious keratitis*. Hygiene + Medizin, 2002. **27**: p. 438-449.
55. Patel, A. and K. Hammersmith, *Contact lens-related microbial keratitis: recent outbreaks*. Curr Opin Ophthalmol, 2008. **19**(4): p. 302-6.
56. Lang, G.K., *Augenheilkunde: Verstehen - Lernen- Anwenden*. 2004: Thieme. 17-22, 30-40, 45, 51-53, 64-69, 77-107.
57. Brewitt, H., *[Contact lenses. Infections and hygiene]*. Ophthalmologe, 1997. **94**(5): p. 311-6.
58. Donzis, P.B., et al., *Microbial contamination of contact lens care systems*. Am J Ophthalmol, 1987. **104**(4): p. 325-33.
59. Alipour, F., et al., *Contact Lens-related Complications: A Review*. J Ophthalmic Vis Res, 2017. **12**(2): p. 193-204.
60. *Vaskularisation am Auge: Wenn Äderchen den Blick trüben*. 08.10.2022]; Available from: <https://www.blickcheck.de/sehhilfen/kontaktlinsen/herausforderungen/vaskularisation/>.
61. Imre, G. and J. Bögi, *Kausale Therapie bei Hornhautvaskularisation*. Klin Monbl Augenheilkd, 1980. **177**(12): p. 798-801.
62. Vardarli, D.m.M.C., et al. *Konjunktivitis*. 2006 08.10.2022]; Available from: https://flexikon.doccheck.com/de/Konjunktivitis?utm_source=www.doccheck.flexikon&utm_medium=web&utm_campaign=DC%2BSearch.
63. *Allergische Konjunktivitis*. 2022 08.10.2022]; Available from: https://www.amboss.com/de/wissen/Allergische_Konjunktivitis/.
64. Teo, L., et al., *A survey of contact lens complications in Singapore*. Eye Contact Lens, 2011. **37**(1): p. 16-9.
65. Horn, K., *Atmosphärische Plasmen: Anwendungen - Entwicklungen - Anlagen*. Jena: MEOX Projektmanagement GbR. 25-29, 236-250.

66. *Aggregatzustände*. 08.10.2022]; Available from: <https://uol.de/chemiedidaktik/arbeitsgebiete-und-projekte/ehemalige-projekte/chemoekol/kontext-wattenmeer/labortag-material/aggregatzustaende>.
67. Gerling, T. and K. Weltmann, *Einführung in Atmosphärendruck-Plasmaquellen für plasmamedizinische Anwendungen*. 2016. p. 3-15.
68. *UV-Strahlung*. 08.10.2022]; Available from: <https://www.plasma.com/plasmatechnik-lexikon/uv-strahlung/>.
69. von Woedtke, T., et al., *Plasmas for medicine*. Physics Reports, 2013. **530**: p. 291-320.
70. Wiegand, C. and P. Elsner, *Plasmamedizin – Kaltes Plasma zur Behandlung von Hautinfektionen*. Aktuelle Dermatologie, 2017. **43**(08/09): p. 339-345.
71. *Plasma - der 4. Aggregatzustand*. 2010 08.10.2022]; Available from: <https://www.lernhelfer.de/schuelerlexikon/physik-abitur/artikel/plasma-der-4-aggregatzustand>.
72. Yan, D., J.H. Sherman, and M. Keidar, *Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality*. Oncotarget, 2017. **8**(9): p. 15977-15995.
73. von Woedtke, T., et al., *Plasma medicine: A field of applied redox biology*. In Vivo, 2019. **33**(4): p. 1011-1026.
74. Weltmann, K.D., et al., *Atmospheric-pressure plasma sources: Prospective tools for plasma medicine*. Pure and Applied Chemistry, 2010. **82**(6): p. 1223-1237.
75. *Plasmatechnologie – Sie bringt Blitze auf Zimmertemperatur*. 12.10.2022]; Available from: <https://www.terraplasma-medical.com/technik/>.
76. Kupke, L.S., et al., *Cold Atmospheric Plasma Promotes the Immunoreactivity of Granulocytes In Vitro*. Biomolecules, 2021. **11**(6).
77. Arndt, S., et al., *Cold Atmospheric Plasma Changes the Amino Acid Composition of Solutions and Influences the Anti-Tumor Effect on Melanoma Cells*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(15).
78. Woedtke, T., et al., *Plasmas for medicine*. Physics Reports, 2013. **530**: p. 291-320.
79. Metelmann, H.-R., et al., *Textbook of Good Clinical Practice in Cold Plasma Therapy*. 2022: Springer.
80. Gaetan, W., M. Yousfi, and N. Merbahi, *Optical emission spectroscopy for quantification of ultraviolet radiations and biocide active species in microwave argon plasma jet at atmospheric pressure*. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 2013. **89**: p. 66–76.
81. von Woedtke, T., et al., *Antimicrobial efficacy and potential application of a newly developed plasma-based ultraviolet irradiation facility*. J Hosp Infect, 2003. **55**(3): p. 204-11.
82. Nuccitelli, R., *Application of Pulsed Electric Fields to Cancer Therapy*. Bioelectricity, 2018. **1**: p. 24-28.
83. Azan, A., et al., *Cell Membrane Electropulsation: Chemical Analysis of Cell Membrane Modifications and Associated Transport Mechanisms*. Adv Anat Embryol Cell Biol, 2017. **227**: p. 59-71.
84. Yusupov, M., et al., *Synergistic effect of electric field and lipid oxidation on the permeability of cell membranes*. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2017. **1861**(4): p. 839-847.
85. *Neue Schätzung zur Krankheitslast durch Krankenhaus-Infektionen Pressemitteilung des Robert Koch-Instituts*. 2019 08.10.2022]; Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Service/Presse/Pressemitteilungen/2019/14_2019.html?jsessionid=B1B05242ACEF171E2B2B46A48FFD52D5.internet091.
86. *Antworten auf häufig gestellte Fragen zu Krankenhausinfektionen und Antibiotikaresistenz*. 2019 08.10.2022]; Available from:

https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Krankenhausinfektionen-und-Antibiotikaresistenz/FAQ_Liste.html.

87. Schmidt, N., et al., *[Healthcare-associated infections and antimicrobial use in long-term care facilities. German results of the third European point prevalence survey HALT-3]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2022. **65**(9): p. 863-871.
88. O'Connor, N., et al., *Cold atmospheric pressure plasma and decontamination. Can it contribute to preventing hospital-acquired infections?* J Hosp Infect, 2014. **88**(2): p. 59-65.
89. Antwerpes, D.F., H. Rezaie, and J. Bienefeld. *Desinfektion*. 2021 08.10.2022]; Available from: <https://flexikon.doccheck.com/de/Desinfektion>.
90. *Reinigung, Desinfektion, Sterilisation*. 08.10.2022]; Available from: <https://viamedici.thieme.de/lernmodul/5098089/4915496/reinigung+desinfektion+sterilisation>.
91. Moreau, M., N. Orange, and M.G. Feuilleux, *Non-thermal plasma technologies: new tools for bio-decontamination*. Biotechnol Adv, 2008. **26**(6): p. 610-7.
92. Laroussi, M., *Nonthermal Decontamination of Biological Media by Atmospheric-pressure Plasmas: Review, Analysis, and Prospects*. Plasma Science, IEEE Transactions on, 2002. **30**: p. 1409-1415.
93. Kong, M., et al., *Plasma medicine: An introductory review*. New Journal of Physics, 2009. **11**.
94. Mendis, D., M. Rosenberg, and F. Azam, *A note on the possible electrostatic disruption of bacteria*. Plasma Science, IEEE Transactions on, 2000. **28**: p. 1304-1306.
95. Singer, A.J. and R.A. Clark, *Cutaneous wound healing*. N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 738-46.
96. Arndt, S., 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): p. e79325.
97. Gurtner, G.C., et al., *Wound repair and regeneration*. Nature, 2008. **453**(7193): p. 314-21.
98. Yu, Y., et al., *Non-thermal plasma suppresses bacterial colonization on skin wound and promotes wound healing in mice*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2011. **31**(3): p. 390-394.
99. Diegelmann, R.F. and M.C. Evans, *Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing*. Front Biosci, 2004. **9**: p. 283-9.
100. Deshmane, S.L., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview*. J Interferon Cytokine Res, 2009. **29**(6): p. 313-26.
101. Römer, G., et al. *Interleukin-6*. 2022 08.10.2022]; Available from: <https://flexikon.doccheck.com/de/Interleukin-6>.
102. Saemann, A. *Interleukin-8*. 2021 08.10.2022]; Available from: <https://flexikon.doccheck.com/de/IL-8>.
103. Emmert, S., et al., *Cold Plasma Treatment for Chronic Wounds*. 2022. p. 141-160.
104. Heinlin, J., et al., *Plasma medicine: possible applications in dermatology*. J Dtsch Dermatol Ges, 2010. **8**(12): p. 968-76.
105. Helmke, A., et al., *The acidification of lipid film surfaces by non-thermal DBD at atmospheric pressure in air*. New Journal of Physics, 2009. **11**: p. 115025.
106. *pH 5,5 – warum dieser Wert für die Haut so wichtig ist*. 08.10.2022]; Available from: <https://www.hartmann.info/de-de/wissen-und-news/e/7/warum-phwert-wichtig-ist>.
107. Schneider, L.A., et al., *Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy?* Arch Dermatol Res, 2007. **298**(9): p. 413-20.

108. Volotskova, O., et al., *Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma*. Sci Rep, 2012. **2**: p. 636.
109. Yan, D., et al., *Toward understanding the selective anticancer capacity of cold atmospheric plasma--a model based on aquaporins (Review)*. Biointerphases, 2015. **10**(4): p. 040801.
110. Bienert, G.P., J.K. Schjoerring, and T.P. Jahn, *Membrane transport of hydrogen peroxide*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1758**(8): p. 994-1003.
111. Siu, A., et al., *Differential Effects of Cold Atmospheric Plasma in the Treatment of Malignant Glioma*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0126313.
112. Schneider, C., et al., *Cold atmospheric plasma causes a calcium influx in melanoma cells triggering CAP-induced senescence*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 10048.
113. Yan, D., et al., *The Strong Cell-based Hydrogen Peroxide Generation Triggered by Cold Atmospheric Plasma*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 10831.
114. Yan, D., et al., *The Cell Activation Phenomena in the Cold Atmospheric Plasma Cancer Treatment*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 15418.
115. Seebauer, C., et al., *Palliative Plasmabehandlung von Kopf-Hals-Tumoren und kurative Konzepte*. 2016. p. 99-109.
116. Saadati, F., et al., *Comparison of Direct and Indirect cold atmospheric-pressure plasma methods in the B(16)F(10) melanoma cancer cells treatment*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 7689.
117. Brullé, L., et al., *Effects of a non thermal plasma treatment alone or in combination with gemcitabine in a MIA PaCa2-luc orthotopic pancreatic carcinoma model*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e52653.
118. Partecke, L. and K. Liedtke, *Kaltes Atmosphärendruckplasma im Einsatz in der Chirurgie*. 2016. p. 91-98.
119. Jablonowski, L., et al., *Plasmaanwendungen in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde*. 2016. p. 121-136.
120. Rupf, S., et al., *Perspektiven für Prävention und Therapie der Zahnkaries*. 2016. p. 159-165.
121. Brun, P., et al., *Disinfection of ocular cells and tissues by atmospheric-pressure cold plasma*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33245.
122. Hammann, A., et al., *Antiseptic efficacy and tolerance of tissue-tolerable plasma compared with two wound antiseptics on artificially bacterially contaminated eyes from commercially slaughtered pigs*. Skin Pharmacol Physiol, 2010. **23**(6): p. 328-32.
123. Witte, F. *Risikofaktor Sonne*. 2006 08.10.2022]; Available from: <https://m.thieme.de/viamedici/klinik-faecher-augeheilkunde-1530/a/sonnenlicht-4272.htm>.
124. Alekseev, O., et al., *Nonthermal Dielectric Barrier Discharge (DBD) Plasma Suppresses Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Replication in Corneal Epithelium*. Transl Vis Sci Technol, 2014. **3**(2): p. 2.
125. Antwerpes, D.F. *Bakterielle Keratitis*. 2019 08.10.2022]; Available from: https://flexikon.doccheck.com/de/Bakterielle_Keratitis.
126. Grundmann, H., et al., *Emergence and resurgence of meticillin-resistant Staphylococcus aureus as a public-health threat*. Lancet, 2006. **368**(9538): p. 874-85.
127. Lingenfelder, C., et al., *Tiefenwirkung von kaltem Atmosphärendruckplasma in der Keratitistherapie: ein Hornhautstromagewebemodell*. Klin Monbl Augenheilkd, 2020. **237**(09): p. 1087-1092.
128. Charrad, E., et al. *Akanthamöbenkeratitis*. 2014 08.10.2022]; Available from: <https://flexikon.doccheck.com/de/Akanthamöbenkeratitis>.

129. Heaselgrave, W., et al., *Inactivation of Acanthamoeba spp. and Other Ocular Pathogens by Application of Cold Atmospheric Gas Plasma*. Appl Environ Microbiol, 2016. **82**(10): p. 3143-3148.
130. De Jonckheere, J. and H. van de Voorde, *Differences in destruction of cysts of pathogenic and nonpathogenic Naegleria and Acanthamoeba by chlorine*. Appl Environ Microbiol, 1976. **31**(2): p. 294-7.
131. Storsberg, D.J. *Antibiotikafreies Therapiekonzept bei mikrobieller Keratitis*. 2018 08.10.2022]; Available from: https://www.iap.fraunhofer.de/content/dam/iap/de/documents/FB4/AUGENSPIEGEL_Fraunhofer-IAP.pdf.
132. Müller, D.M. *Hydrophilierung für verbesserte Gaspermeabilität formstabiler Kontaktlinsen*. 08.10.2022]; Available from: <https://www.igb.fraunhofer.de/de/forschung/funktionale-oberflaechen-und-materialien/beschichtungen/oberflaechenveredelung-fuer-verbesserten-tragekomfort-formstabil.html>.
133. Ramli, N.A.H., et al., *Review on prevention of bacterial adhesion on contact lens using plasma treatment*. AIP Conference Proceedings, 2017. **1824**(1): p. 030014.
134. Paradiso, P., et al., *Effect of plasma treatment on the performance of two drug-loaded hydrogel formulations for therapeutic contact lenses*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2015. **103**(5): p. 1059-68.
135. Chrysostomou, D.D. *Gas plasma treatment adds patient comfort to contact lenses*. 08.10.2022]; Available from: <https://iestechsales.com/wp-content/uploads/2017/08/ContactLenses4-28-10.pdf>.
136. Mošovská, S., et al., *Decontamination of Escherichia coli on the surface of soybean seeds using plasma activated water*. LWT, 2021. **154**: p. 112720.
137. van den Höfel, N.A., Dr. Frank; Nolte, Dr. rer. nat. Janica, *Dihydrorhodamin 123*. 2022.
138. Merck. 21.01.2023]; Technisches Datenblatt]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sial/d1054>.
139. Aldrich, S. *Product Information Fluorimetric Hydrogen Peroxide Assay Kit*. 2014 21.01.2023]; Technisches Datenblatt]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/402/077/mak166bul.pdf>.
140. Aldrich, S., *23479 Nitrite/ Nitrate Assay Kit, colorimetric used for detection of nitric oxide metabolites*. 2018.
141. Pucker, A.D. and J.J. Nichols, *A method of imaging lipids on silicone hydrogel contact lenses*. Optom Vis Sci, 2012. **89**(5): p. E777-87.
142. Perinban, S., V. Orsat, and V. Raghavan, *Nonthermal Plasma–Liquid Interactions in Food Processing: A Review*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2019. **18**(6): p. 1985-2008.
143. Gunes, S., et al., *Cell death induced in glioblastoma cells by Plasma-Activated-Liquids (PAL) is primarily mediated by membrane lipid peroxidation and not ROS influx*. PLoS One, 2022. **17**(9): p. e0274524.
144. Schneider, C., et al., *Acidification is an Essential Process of Cold Atmospheric Plasma and Promotes the Anti-Cancer Effect on Malignant Melanoma Cells*. Cancers (Basel), 2019. **11**(5).
145. Zimmermann, T., et al., *Acidified Nitrite Contributes to the Antitumor Effect of Cold Atmospheric Plasma on Melanoma Cells*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(7).
146. Brisset, J.-L. and J. Pawlat, *Chemical Effects of Air Plasma Species on Aqueous Solutes in Direct and Delayed Exposure Modes: Discharge, Post-discharge and Plasma Activated Water*. Plasma Chemistry and Plasma Processing, 2016. **36**.

147. Tsoukou, E., P. Bourke, and D. Boehm, *Temperature Stability and Effectiveness of Plasma-Activated Liquids over an 18 Months Period*. Water, 2020. **12**.
148. Traylor, M., et al., *Long-term antibacterial efficacy of air plasma-activated water*. Journal of Physics D-applied Physics - J PHYS-D-APPL PHYS, 2011. **44**.
149. Vlad, I. and S. Anghel, *Time stability of water activated by different on-liquid atmospheric pressure plasmas*. Journal of Electrostatics, 2017. **87**.
150. Shen, J., et al., *Bactericidal Effects against S. aureus and Physicochemical Properties of Plasma Activated Water stored at different temperatures*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 28505.
151. Perinban, S., V. Orsat, and V. Raghavan, *Nonthermal Plasma–Liquid Interactions in Food Processing: A Review*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2019. **18**.
152. Tsoukou, E., et al., *Distinct Chemistries Define the Diverse Biological Effects of Plasma Activated Water Generated with Spark and Glow Plasma Discharges*. Applied Sciences, 2021. **11**: p. 1178.
153. Boehm, D., et al., *Cytotoxic and mutagenic potential of solutions exposed to cold atmospheric plasma*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 21464.
154. Thirumdas, R., et al., *Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture*. Trends in Food Science & Technology, 2018. **77**.
155. Lu, P., et al., *Controlled cytotoxicity of plasma treated water formulated by open-air hybrid mode discharge*. Applied Physics Letters, 2017. **110**: p. 264102.
156. Oehmigen, K., et al., *The Role of Acidification for Antimicrobial Activity of Atmospheric Pressure Plasma in Liquids*. Plasma Processes and Polymers, 2010. **7**: p. 250-257.
157. Naïtali, M., et al., *Combined Effects of Long-Living Chemical Species during Microbial Inactivation Using Atmospheric Plasma-Treated Water*. Applied and environmental microbiology, 2010. **76**: p. 7662-4.
158. Antwerpes, D.F.W., Fiona; Schuster, Maxx; Messner, Mag. med. vet. Patrick; Christof, Anton-Martin; Hertler, Christopher; Bröse, Stud. med. dent. Sascha; von Westphalen, Georg; Prinz, Dominic. *Escherichia coli*. 2021 23.5.2023]; Available from: https://flexikon.doccheck.com/de/Spezial:Artikel_Autoren/Escherichia_coli.
159. *Keratitis: Multi-resistenter E. coli greift Augen an*. 2016 25.5.2023]; Available from: <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/70575/Keratitis-Multi-resistenter-E-coli-greift-Augen-an%20Stand%2025.5.2023>.
160. Haas, I.R., Hoda; Antwerpes, Dr. Frank; Stempel, Viktor; Kropf, Eric; Hircin, Emrah. *Keratitis*. 2021 6.4.2023]; Available from: <https://flexikon.doccheck.com/de/Keratitis>.
161. *Keratitis*. 2023 6.4.2023]; Available from: <https://www.amboss.com/de/wissen/Keratitis/>.
162. Rachwalik, D. and U. Pleyer, *[Bacterial Keratitis]*. Klin Monbl Augenheilkd, 2015. **232**(6): p. 738-44.
163. Schuster, M.H., Inga; Messner, Mag. med. vet. Patrick; Köhn, Falko; Antwerpes, Dr. Frank; Rezaie, Hoda; Güler, Dr. Ibrahim; Fink, Bijan; Kremer, Phillip; Reschke, Daniel. *Pseudomonas aeruginosa*. 2021 25.5.2023]; Available from: https://flexikon.doccheck.com/de/Pseudomonas_aeruginosa.
164. Antwerpes, D.F.N., Dr. rer. nat. Janica; Lobmeyer, Dr. Fabian; Güler, Dr. Ibrahim; Rezaie, Hoda; Kremer, Phillip; Christof, Anton-Martin; Ostendorf, Dr. med. Norbert. *Staphylococcus aureus*. 2023 25.5.2023]; Available from: https://flexikon.doccheck.com/de/Staphylococcus_aureus.
165. Liao, X., *Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review*. Food Control, 2017. **75**: p. 83-91.

166. Lee, H., et al., *Antimicrobial effects of microwave plasma-activated water with skin protective effect for novel disinfectants in pandemic era*. Scientific Reports, 2022. **12**: p. 5968.
167. Sruthi, N.U., et al., *Impacts of cold plasma treatment on physicochemical, functional, bioactive, textural, and sensory attributes of food: A comprehensive review*. Food Chem, 2022. **368**: p. 130809.
168. Shahidi, F. and Y. Zhong, *Lipid oxidation and improving the oxidative stability*. Chem Soc Rev, 2010. **39**(11): p. 4067-79.
169. Van Durme, J. and J. Vandamme, *Non-thermal plasma as preparative technique to evaluate olive oil adulteration*. Food Chem, 2016. **208**: p. 185-91.
170. Gavahian, M., et al., *A critical analysis of the cold plasma induced lipid oxidation in foods*. Trends in Food Science & Technology, 2018.
171. Antwerpes, D.F.S., Dr. med. Daniel Olivier; Römer, Gunnar. *Cholesterinester*. 2015 27.5.2023]; Available from: <https://flexikon.doccheck.com/de/Cholesterinester>.
172. Nolte, D.r.n.J.H., Dr. med. Helmut; Güler, Dr. med. Ibrahim; Antwerpes, Dr. Frank; Schuster, Maxx; Arzberger, Martin; Benignus, Christian; Rosenbusch, Silke. *Cholesterin*. 2023 27.5.2023]; Available from: <https://flexikon.doccheck.com/de/Cholesterin>.
173. van den Höfel, N.N., Gevine; Hulin, Martin; Antwerpes, Dr. Frank; Mathies, Dr. med. Linnea; Offe, Julia; Merz, Sebastian; Hircin, Emrah. *Phospholipid*. 2022 27.5.2023]; Available from: https://flexikon.doccheck.com/de/Phospholipid?utm_source=www.doccheck.com&utm_medium=DC%2520Search&utm_campaign=DC%2520Search%2520content_type%253Aall&utm_content=DC%2520Search%2520phospholipid.
174. *Der pH-Wert - chemische Grundlagen*. 28.5.2023]; Available from: <https://klassewasser.de/content/language1/html/3696.php>.
175. *Fette*. 28.5.2023]; Available from: <https://www.studysmarter.de/schule/chemie/biochemie/fette-chemie/#:~:text=Fette%20sind%20hydrophob.,eine%20geringere%20Dichte%20als%20Wasser>.
176. Lukes, P., et al., *Aqueous-phase chemistry and bactericidal effects from an air discharge plasma in contact with water: Evidence for the formation of peroxyxynitrite through a pseudo-second-order post-discharge reaction of H₂O₂ and HNO₂*. Plasma Sources Science and Technology, 2014. **23**: p. 015019.
177. Gasteiger, P.D.J.S., S. *Pufferlösungen*. 2001 28.5.2023]; Available from: <https://www2.chemie.uni-erlangen.de/projects/vsc/chemie-mediziner-neu/saeuren/pufferloesungen.html>.

8. Danksagung

Ganz besonderen Dank darf ich nun allen sagen, die mich immer wieder ermutigt und unterstützt haben, mir bei den Experimenten und auch bei der Dissertation eine große Hilfe waren. Einige wenige darf ich nun namentlich erwähnen:

Zu Beginn möchte ich mich bei Prof. Dr. Mark Berneburg für die Bereitstellung des herausragenden wissenschaftlichen Umfelds bedanken, ohne das die Durchführung der Experimente in keiner Weise möglich gewesen wäre.

Ein weiterer Dank geht an meine Doktormutter Frau Prof. Dr. Sigrid Karrer, die mit vielen konstruktiven Anregungen und Ihrem Fachwissen den Blickwinkel auf mein Dissertationsthema immens erweitert hat.

Daneben möchte ich mich vor allem bei meinen beiden Betreuerinnen Frau PD Dr. rer. nat. Stephanie Arndt und Frau Petra Unger für die thematische Konzeption der Arbeit und die exzellente Betreuung bedanken. Vielen Dank für die Unterstützung im Labor sowie bei der Ausarbeitung dieser Dissertation. Neben der fachlichen Expertise trug jedoch auch der außerordentlich gemeinschaftliche Umgang mit allen Mitarbeitern zu einer sehr guten Arbeitsatmosphäre im Labor bei.

Abschließend darf ich mich noch bei meinem Mann, meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht bedanken.