Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie

Direktor: Prof. Dr. Steffen Emmert

Untersuchung von kaltem Atmosphärendruckplasma als innovative Therapie zur Behandlung einer Radiodermatitis in einem Nacktmausmodell

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum humanarum (Dr. rer. hum.)

der Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von

Thoralf Bernhardt, geb. am 14.12.1988 in Greifswald

aus Rostock

Rostock, Januar 2025

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005458

Gutachter: **Prof. Dr. med. Steffen Emmert**

Universitätsmedizin Rostock

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie

Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Universitätsmedizin Rostock

Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie

Prof. Apl. Prof. Dr. Wolfgang Viöl

Hochschule für angewandte Wissenschaft und Kunst Hildesheim/Holzminden/Göttingen

Jahr der Einreichung: 2025

Jahr der Verteidigung: 2025

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis III
II. Abbildungsverzeichnis V
III. Tabellenverzeichnis VII
1. Einleitung 1
1.1. Radiodermatitis 1
1.2. Kaltes Atmosphärendruckplasma (KAP) 4
1.3. Klinische Anwendungen von KAP 5
1.4. Radiodermatitis im Modellorganismus Maus 9
1.5. Ziel dieser Arbeit 11
2. Material und Methoden 12
2.1. Materialien 12
2.1.1. Verwendete Tiere 12
2.1.2. Geräte und Chemikalien 13
2.2. Methoden 14
2.2.1. Gammabestrahlung 14
2.2.2. Bau einer Strahlenschutzkammer 15
2.2.3. Dosimetrie 17
2.2.4. Anästhesie 18
2.2.5. Radiodermatitis-*Scoring* 19
2.2.6. Durchführung der Dosisfindungsstudie 19
2.2.7. Durchführung der KAP-Behandlungsstudie 21
2.2.7.1. Hyperspektrale Bildgebung (HSI) 24
2.2.7.2. Optische Kohärenztomographie 25
2.2.7.3. Konfokale Laserscanmikroskopie 27
2.2.7.4. Gewebeentnahme 29
2.2.7.5. Histologische Untersuchungen der Gewebeproben 29
2.2.8. Statistische Auswertung 30
3. Ergebnisse 31
3.1. Dosimetrie 31
3.2. Dosisfindung 34
3.3. KAP-Behandlungsstudie 37
3.3.1. Bestimmung des Schweregrads der Radiodermatitis mittels Scoring-System 37

3.3.2. Untersuchung nichtinvasiver bildgebender Methoden für die objektive Verlaufskontrolle ... 39
3.3.2.1 Hyperspektrale Bildgebung (HSI) ... 39
3.3.2.1.1 Durchblutung (THI) ... 40
3.3.2.1.2 Gewebewassergehalt (TWI) ... 42
3.3.2.1.3 Gewebesauerstoffsättigung (NIR) ... 43
3.3.2.1.4 Hämoglobin Index (StO_2) ... 45
3.3.2.2 Optische Kohärenztomographie (OCT) ... 46
3.3.2.3 Konfokale Laserscanmikroskopie (KLSM) ... 51
3.3.3 Histologische Untersuchungen von Hautgewebeproben mit induzierter Radiodermatitis ... 52
4. Diskussion ... 55
5. Schlussfolgerung ... 65
6. Zusammenfassung ... 66
7. Eidesstattliche Erklärung ... 68
8. Literaturverzeichnis ... 69
9. Lebenslauf ... 77
10. Danksagung ... 79
11. Anhang ... i

I. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
ANOVA	Varianzanalyse
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CE	*Conformité Européenne*
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
Co^{60}	Cobalt 60
Cs^{137}	Cäsium 137 (Isotop)
d	Tag/e
D1-D4	Dosimeter 1-4
DBE/DBD	dielektrisch behinderte Entladung/*dielectric barrier discharge*
d.h.	das heißt
engl.	englisch
eV	Elektronenvolt
γ	Gamma
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Gy	Gray
H1-H12	Schlauchdosimeter 1-12
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HSI	hyperspektrale Bildgebung (*hyperspectral imaging*)
IEC	Institut für experimentelle Chirurgie
KAP	kaltes Atmosphärendruckplasma
keV	Kiloelektronenvolt
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
KLSM	Konfokale Laserscanmikroskopie

mA	Milliampere
MCP96	Roses Metall
mg	Milligramm
min	Minute/n
ml	Milliliter
MRSA	Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*
µm	Mikrometer
NIR	Gewebesauerstoffsättigung (*near-infrared*)
nm	Nanometer
Nrf2	*nuclear factor erythroid-derived 2-like 2*
OCT	optische Kohärenztomographie (*optical coherence tomography*)
PAS	Perjodsäure-Schiff Reaktion (*periodic acid-Schiff reaction*)
PUSH	*Pressure Ulcer Scale for Healing*
RNS	reaktive Stickstoffspezies (*reactive nitrogen species*)
RONS	reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (*reactive oxygen and nitrogen species*)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*)
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (*standard deviation*)
slm	Standard-Liter pro Minute
StO_2	Hämoglobinindex (in oberflächlichen Gewebeschichten)
THI	Hämoglobinindex (*tissue hemoglobin index*)
TierSchG	Tierschutzgesetz
TWI	Wassergehalt (*tissue water index)*
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Radiodermatitis. a) akute Inflammation; b): feuchte Abschuppung 1
Abbildung 2 Beispiele für Plasmaquellen 5
Abbildung 3 Cs^{137}-γ-Strahlengerät IBL-637 15
Abbildung 4 Schematische Darstellung der Strahlenschutzkammer. 16
Abbildung 5 Darstellung der Dosimetrien mit der Strahlenschutzkammer 18
Abbildung 6 Schema zum Ablauf der zweiten Dosisfindung 20
Abbildung 7 Schema zum Ablauf der KAP-Behandlungsstudie 22
Abbildung 8 Behandlung der rechten Hinterbeine der Mäuse mit KAP 24
Abbildung 9 Beispiel für Darstellung von Unterschieden der hyperspektralen Bildgebung anhand des Hämoglobingehalts 25
Abbildung 10 Schematische Darstellung des Aufbaus und der Funktion einer Optischen Kohärenztomographie 26
Abbildung 11 Schematische Darstellung des Aufbaus und der Funktion eines Laserscanmikroskops 28
Abbildung 12 Dosimetrie 32
Abbildung 13 Repräsentatives Bild des rechten Hinterlaufs einer Maus nach Bestrahlung in der ersten Dosisfindungsstudie 35
Abbildung 14 Repräsentatives Bild der rechten Hinterläufe von Mäusen jeder Gruppe (50-80 Gy) nach Bestrahlung in der zweiten Dosisfindungsstudie 36
Abbildung 15 Verlauf der Radidoermatitis nach einer Gammabestrahlung mit 50-80 Gy 37
Abbildung 16 Verlauf der Radiodermatitis mit KAP-Behandlung und ohne KAP-Behandlung 39
Abbildung 17 Ergebnisse der hyperspektralen Bildgebung des Hämoglobingehalts 41
Abbildung 18 Ergebnisse der hyperspektralen Bildgebung des Wassergehalts 42
Abbildung 19 Ergebnisse der hyperspektralen Bildgebung der Gewebesauerstoff-sättigung 44
Abbildung 20 Ergebnisse der hyperspektralen Bildgebung des Hämoglobin Index .. 45
Abbildung 21 Auswertung der optischen Kohärenztomographie 47
Abbildung 22 Auswertung der optischen Kohärenztomographie 48
Abbildung 23 Auswertung der optischen Kohärenztomographie 49

Abbildung 24 Auswertung der optischen Kohärenztomographie aller Tiere zu dem Zeitpunkt t2 49
Abbildung 25 Auswertung der optischen Kohärenztomographie aller Tiere zu dem Zeitpunkt t3 50
Abbildung 26 Konfokale Laserscanmikroskopie 52
Abbildung 27 Repräsentative Bilder der HE-Färbungen und der Giemsa-Färbungen der rechten Hinterbeine verschiedener Mäuse 54

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Therapeutische und präventive Maßnahmen bei einer Strahlendermatitis.[5] 3
Tabelle 2 Geschlechtsverteilung verwendetet Tiere 12
Tabelle 3 Geräte und Chemikalien 13
Tabelle 4 Score für die Schwere einer Radiodermatitis, modifiziert nach Holler et al. 2009.[77] 19
Tabelle 5 Bestrahlungszeiten für die Gammabestrahlung mit 50-80 Gy. 21
Tabelle 6 Detektierte Strahlenwerte für die Thermolumineszenzdosimeter D1-D4. . 32
Tabelle 7 Detektierte Strahlenwerte für das Schlauchdosimeter H1-H12. 33

1. Einleitung

1.1. Radiodermatitis

Der Großteil aller Krebspatienten, die eine Strahlentherapie erhalten, entwickeln innerhalb von ca. 90 Tagen nach der Bestrahlung eine durch Strahlen induzierte Entzündung der Haut.[1–3]

Diese Entzündung als eine Nebenwirkung von ionisierender Strahlung ist schon sehr lange bekannt, fast so lange wie die Röntgenstrahlung selbst, welche 1895 von Wilhelm Roentgen entdeckt wurde. Bereits 1896 wurden erstmals Nebenwirkungen in Form von schweren Haut-Reaktionen bei der Verwendung von Röntgenstrahlen beobachtet.[4,5]

Die Haut ist als sich ständig erneuerndes Organ besonders anfällig für strahlenbedingte Schäden.[6]

Eine Entzündung derselben resultiert in Gewebeschäden, welche sich in Form von Erythemen, Ödemen, Erosion und in schweren Fällen auch Ulzerationen äußern (Abbildung 1) und wird als Radiodermatitis oder Strahlendermatitis bezeichnet.

Abbildung 1

Radiodermatitis. a) akute Inflammation (Breast Cancer: Targets and Therapy 2017 9 551-557' Originally published by and used with permission from Dove Medical Press Ltd)[6]; b): feuchte Abschuppung (original veröffentlicht in Annals of oncology, official journal of the European Society for Medical Oncology).[7]

Unter einer Radiodermatitis versteht man alle reversiblen und permanenten Änderungen der Haut, die auf Grund von ionisierender Strahlung auftreten.[5,8]

Sie wird begleitet von starkem Juckreiz und Schmerzen und kann entweder kurzzeitig während der Strahlentherapie, bis zu drei Monate danach oder sogar langfristig für mehr als drei Monate nach der Strahlentherapie bestehen, sodass es durch das Auftreten der Radiodermatitis zu einer Unterbrechung oder, in schweren Fällen, sogar zum Abbruch der Krebstherapie kommen kann.[8,9]

Zu den reversiblen Effekten zählt die, bereits vor der klinischen Manifestation einer Radiodermatitis, auftretende Störung der epidermalen Barrierefunktion, wodurch es zu einem erhöhten transepidermalen Wasserverlust kommt.[10] Darüber hinaus bildet sich, auf Grund von Vasodilatation, als erste sichtbare Hautreaktion ein Erythem, welches zunächst in Form eines Früherythems für zwei bis drei Tage auftritt. Nach ca. sieben Tagen tritt dann auf Grund der Freisetzung von proteolytischen Enzymen das verzögerte Erythem auf, gefolgt von dem Späterythem, welches ca. sechs bis sieben Wochen nach der Bestrahlung entsteht und wahrscheinlich auf die Freisetzung von Zytokinen zurückzuführen ist.[11]

Um eine möglichst geringe Belastung für die Haut zu erreichen, empfiehlt es sich die Bestrahlung fraktioniert zu verabreichen.

Eine besondere Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung zeigen Haarfollikel in der anagenen Wachstumsphase. Bereits nach Einzeldosen von drei bis vier Gray (Gy) wird die Telogenphase induziert und somit ein temporärer Haarausfall ausgelöst. Nach Einzelbestrahlungen von über 12 Gy kommt es darüber hinaus zu einem permanenten Haarausfall. Eine ebenfalls erhöhte Strahlenempfindlichkeit konnte bei Talgdrüsen beobachtet werden, wodurch es in der Regel zu einer vermehrten Desquamation der Epidermis kommt.

Durch sequentielle Applikation von verschiedenen Chemotherapeutika, oder auch durch Hochdosis-Interferon-alpha kann ein Wiederaufflammen der Hauterscheinungen (Recall-Dermatitis) auftreten, welches sich jedoch durch eine zeitgleiche Applikation der Medikamente und der Strahlentherapie verhindern lässt.[12]

Im Gegensatz zu der akuten Radiodermatitis, welche sowohl nach Einzeldosen als auch nach Mehrfachexpositionen in Form einer lokalen Entzündung entsteht (engl.: *radiation burn*), welche wiederum sehr häufig bei kurativer Tumorbestrahlung mit Dosen ab 60 Gy (bei einer Einzeldosis von 2 Gy) auftritt, entsteht die chronische Radiodermatitis durch Überschreitung der Toleranzgrenze der Haut. Diese kann durch tägliche, fraktionierte Strahlung über einen begrenzten Zeitraum oder durch geringe wiederholte Dosen über lange Expositionszeiten mit hoher Gesamtdosis ausgelöst werden. Die chronische Radiodermatitis manifestiert sich in Teleangiektasien, Pigmentverschiebungen, Atrophie, Fibrose, Alopezie und Ulzeration und äußert sich außerdem in trockener und vulnerabler Haut.[5]

Eine einheitliche und standardisierte Therapie ist derzeit nicht vorhanden, jedoch gibt es verschiedene therapeutische und präventive Maßnahmen bei einer Strahlendermatitis (Tabelle 1).

Sowohl die Behandlung, als auch die Prävention einer Radiodermatitis stellen auch aktuell immer noch eine Herausforderung dar, da Untersuchungen von Wundauflagen und topischen Wirkstoffen sehr unterschiedliche und teilweise widersprüchliche Ergebnisse zeigten.[13] Die Behandlung mit Dexpanthenol zeigt einige Vorteile im Vergleich zu anderen Behandlungen. Dexpanthenol erlaubt z.B. eine verbesserte Strahlentoleranz der Patienten im Vergleich zu der häufig verwendeten Puderung. Weiterhin zeigte sich eine Reduktion von allergischen Reaktionen, Superinfektionen, Epidermolysen und der Xerosis cutis (trockene Haut), welche ein Leitsymptom der Radiodermatitis ist.[14]

Tabelle 1 Therapeutische und präventive Maßnahmen bei einer Strahlendermatitis.[5]

Grad	Therapie
0	Hautreinigung mit Wasser, Pflege mit Feuchtigkeitscreme, UV-Schutz
1	Siehe Grad 0, dexpanthenolhaltige Creme
2	Siehe Grad 1, evtl. zusätzlich topisches Steroid
3	Schwarzteeumschläge, Eosinlösung, Steroidhaltiger Schaum
4	Operative Therapie und Schmerzbehandlung erforderlich, ggfs. auch Antibiotikaprophylaxe
Strahlenfibrose	Vitamin E plus Pentoxyfillin oral, bei ausgeprägtem Befund initial Interferon-gamma subkutan

Die Verwendung von Wundauflagen spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Behandlung einer Radiodermatitis. Wundauflagen sollen durch ein feuchtes Milieu der Wunde dazu beitragen, eine optimale Heilung und Reepithelialisierung zu gewährleisten. Dies ermöglichen z.B. Hydrogelverbände oder hydrokolloide Wundauflagen. Letztere eignen sich z.B. gut für die Behandlung einer im Zuge der Radiodermatitis auftretenden feuchten Desquamation.[13]

Folien- und Schaumverbände eignen sich gut für die Prävention und Behandlung einer akuten Radiodermatitis, während Hydrogelverbände eher ineffektiv für die Behandlung

einer Radiodermatitis zu sein scheinen. Bislang gibt es darüber hinaus wenig Berichte und Daten zu Wundauflagen bei einer chronischen Radiodermatitis.[3]

1.2. Kaltes Atmosphärendruckplasma (KAP)

Physikalisches Plasma ist natürlicher Weise ein heißes, ionisiertes Gasgemisch und besteht aus verschiedenen aktiven Komponenten wie geladenen Teilchen, elektrischen Feldern, UV-Strahlung und reaktiven Gasspezies. Mehr als 99 % des sichtbaren Universums besteht aus Plasma, so z.B. auch die Sonne, Sterne oder auch Blitze.[15]

Kaltes Atmosphärendruckplasma (KAP) ist ein nur teilweise ionisiertes, kaltes Plasma (maximal 40 °C) und kann daher auch auf humanen und tierischen Geweben appliziert werden, ohne diese zu beschädigen.[16]

Plasma emittiert UV-Strahlung, elektromagnetische Felder und Wärme und entsteht durch die Zufuhr von Energie (Wärme oder elektromagnetische Felder) zu einem neutralen Gas.[17] Auf Grund der unterschiedlichen Charakteristika im Vergleich zu nicht ionisierten Gasen, wird es auch als der vierte Aggregatzustand angesehen. Führt man Wärme zu einem Stoff hinzu, so geht dieser Stoff für gewöhnlich von dem festen in den flüssigen und weiter in den gasförmigen Zustand über. Bei weiterer Erhöhung der Temperatur entsteht dann Plasma, wobei die Atome des Gases Elektronen abspalten, welche dann als geladene Teilchen frei vorliegen (https://www.mpg.de/plasmaphysik#:~:text=Ein%20Plasma%20nennt%20man%20deshalb,alle%20Sterne%20bestehen%20aus%20Plasma, 26.07.2024).

In diversen *In-vivo*- und *In-vitro*-Studien konnte bereits gezeigt werden, dass KAP positiv gegen Juckreiz und Entzündungen, sowie antimikrobiell und fördernd auf die Geweberegeneration und Durchblutung wirkt und sich daher generell positiv auf die Wundheilung auswirkt.[18–22]

Für die medizinische Applikation von KAP gibt es verschiedene Möglichkeiten, die sich v.a. in indirekte und direkte Plasmaquellen unterteilen lassen. Zu den indirekten Quellen gehört z.B. der Plasmajet (Abbildung 2) und zu den direkten Quellen gehören Quellen basierend auf dielektrisch behinderter Entladung (DBE, oder auch DBD [engl.: *dielectric barrier discharge*]).

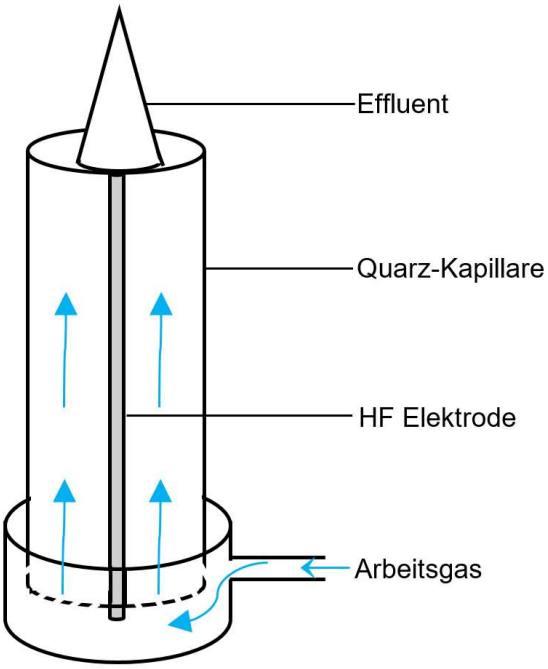


Abbildung 2

Grundlegender Aufbau eines Plasmajets.

Auch wenn die genauen Wirkmechanismen von KAP noch nicht vollständig bekannt sind, so konnte z.B. durch Einsatz von Radikalfängern gezeigt werden, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS) maßgeblich an der Wirkung beteiligt sind.[23] Zu den dadurch am häufigsten gebildeten reaktiven Spezies zählen z.B. Wasserstoffperoxid, Ozon, Superoxid, Singulett-Sauerstoff, Hydroxylradikale, Stickstoffradikale, Stickstoffmonoxid- und Stickstoffdioxidradikale und Peroxinitrationen. Diese entstehen durch die KAP-bedingte Energetisierung der Umgebungsluft.[24] Wasserstoffperoxid gilt als einer der Haupteffektoren für die Auslösung einer stressbedingten Immunantwort, aber grundlegend führen all diese reaktiven Spezies auf Grund ihrer hohen Reaktivität zu Redoxstress von Zellen.[25]

1.3. Klinische Anwendungen von KAP

Kaltes Atmosphärendruckplasma stand im Mittelpunkt vieler Untersuchungen und zeigte vielversprechende Eigenschaften die schlussendlich auch zu dem klinischen Gebrauch führten. So zeigten einige Studien positive Effekte von KAP bei Anwendung auf atopische Ekzeme, Juckreiz und Schmerz.[26–28] Des Weiteren konnte in diversen Studien eine antimikrobielle Wirkung auf klinisch relevante Bakterien, Pilze und Viren nachgewiesen werden, sodass KAP z.B. zur Desinfektion von klinischen Materialien,

als auch zur Desinfektion der Haut Verwendung findet.[29–34] Auch in Bereichen der Narbenbehandlung, Krebstherapie und Behandlung von aktinischen Keratosen konnten teilweise positive Effekte festgestellt werden, welche es jedoch weiter zu untersuchen gilt.[18,35–44] V.a. zur Behandlung von (Haut-)krebs ist KAP ein vielversprechender und innovativer Therapieansatz der intensiv beforscht wird.[18,36,37]
Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt jedoch in dem Potenzial von KAP bei der Wundbehandlung. In vielen verschiedenen klinischen Studien und Fallberichten zeigte sich vermehrt eine positive Wirkung von KAP auf die Wundheilung.[45]
So wurden z.B. in einer Studie von Chuangsuwanich et al. 2016 50 Patienten mit Druckulcera behandelt. Dazu wurden die Patienten in Gruppen eingeteilt, eine Kontrollgruppe, welche eine Standard-Wunderversorgung erhielt und eine Plasmagruppe, welche über die Standardtherapie hinaus mit einem Plasmajet mit kaltem Plasma behandelt wurde. Die Behandlungen erfolgten einmal wöchentlich für acht Wochen. Dabei zeigten sich für die Plasmagruppe bereits nach einer Woche signifikant bessere PUSH (*Pressure Ulcer Scale for Healing*) *Scores* und Exudatgehalte. Auffällig war unter anderem ein 73 jähriger Patient in dieser Studie, bei welchem sich eine sehr deutliche Verkleinerungen des Ulcus innerhalb von 8 Wochen zeigte.[46]

In einer randomisiert, kontrollierten Studie von Stratmann et al. 2020 wurden diabetische Fußulzera mit KAP bzw. mit einem Placebo behandelt. Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte Wundheilung bei den Patienten mit KAP-Behandlung im Vergleich zu der Placebo-Behandlung, in Form von einer stärkeren Reduktion des Wundbereiches, sowie auch einer schnelleren Reduktion des Wundbereiches.[47]
In einer weiteren randomisiert, kontrollierten Studie von Mirpour et al. 2020 konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Auch in dieser Studie wurden Patienten mit diabetischen Fußulzera behandelt. Die Behandlung erfolgte mit einer Standardtherapie und vergleichend dazu mit einer Standardtherapie gepaart mit einer KAP-Behandlung. In dieser Studie zeigte sich ebenfalls ein stärker reduzierter Wundbereich, sowie eine schnellere Reduktion des Wundbereichs in der KAP-behandelten Gruppe im Vergleich zu der Standardtherapie-Gruppe. Darüber hinaus konnte in dieser Studie auch eine geringere Belastung durch Mikroorgansimen in der KAP-behandelten Gruppe festgestellt werden.[48]
Weitere Studien konnten ebenfalls signifikante Reduktionen von Mikroorganismen in chronischen Wunden durch die Behandlung mit KAP nachweisen.[49,50]

Auch in akuten Wunden wurden, wenn auch weniger als bei chronischen Wunden, Studien durchgeführt. Auch hier scheint KAP zunächst insofern positiv auf die Wundheilung zu wirken, dass diese schneller von Statten geht und auch die Narbenbildung geringer ist.[51–53]

Eine durch KAP beschleunigte Wundheilung konnte auch in Mäusen bereits nachgewiesen werden und darüber hinaus zeigte sich auch bei einer Studie mit Keratinozyten und Fibroblasten eine erhöhte Beweglichkeit der Zellen unter KAP-Einfluss.[54] Diese Ergebnisse deuten ebenfalls auf eine durch KAP beschleunigte Wundheilung in chronischen und langsam heilenden Wunden hin.

Für die Behandlung einer Radiodermatitis wurde KAP ebenfalls getestet. Dabei stellte sich heraus, dass KAP eine sichere Behandlung für die Pateinten darstellt, da keine dosislimitierenden toxischen Effekte oder sonstige Nebenwirkungen aufgetreten sind. Obwohl sich in dieser Studie eine mildere Ausprägung der Radiodermatitis bei KAP-behandelten Patienten im Vergleich zu Patienten mit Standardtherapie zeigte, bleibt dennoch abzuwarten ob diese Effekte tatsächlich durch KAP hervorgerufen werden. Eine weitere Studie mit einer größeren Patientenkohorte ist daher bereits in Planung und soll dazu beitragen die Wirksamkeit von KAP bei einer Radiodermatitis genauer zu bestimmen.[55]

Der Effekt von KAP in der Wundheilung wurde zudem bereits in verschiedenen Tiermodellen mit unterschiedlichen Plasmatechnologien untersucht und es zeigte sich auch in vielen dieser Studien ein wundheilungsfördernder Effekt von KAP. Es gibt eine Vielzahl verschiedener Aspekte von KAP, die zu einer Förderung der Wundheilung beitragen können. Dazu gehören UV-Strahlung und reaktive Gasspezies zur Wunddesinfektion, reaktive Stickstoffspezies zur Anregung der Geweberegeneration, elektrischer Strom zur Anregung der Angiogenese und auch eine Verminderung des pH-Wertes der Wunde.[19,29,56–60]

Studien weisen darauf hin, dass dieser wundheilungsfördernde Effekt von KAP unabhängig von der antimikrobiellen Wirkung ist. KAP scheint die einzelnen Phasen der Wundheilung zu beschleunigen, wodurch die Vermutung nahe liegt, dass es sich bei den wundheilungsfördernden Effekten um einen Redoxprozess handelt, in welchen durch die in dem Plasma gebildeten reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffspezies eingegriffen werden kann.[61]

Zudem zeigte sich, dass KAP die Angiogenese anregt, was zu einer verbesserten Wundheilung führt.[62]

Die Haut besteht aus drei verschiedenen Schichten, der Epidermis (Oberhaut), der Dermis (Corium/Lederhaut) und der Subkutis (Unterhaut).[63] Da die Epidermis die äußerste Schicht der Haut bildet, ist diese auch primär bei einer Wunde der Haut betroffen. Sie lässt sich unterteilen in die Basalzellschicht (*Stratum basale*), die Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*), die Körnerschicht (*Stratum granuslosum*), die Glanzschicht (Stratum lucidum) und in die Hornschicht (*Stratum corneum*). Die Basalzellschicht ist dabei die unterste (tiefste) Schicht der Epidermis in welcher die Zellteilung für die Regeneration der Haut stattfindet.[63] In dieser Schicht befinden sich zudem Melanozyten, also pigmentbildende Zellen welche die Haut vor UV-Strahlung von z.B. der Sonne schützen.[63,64] Diese Zellschicht wird innerhalb von 30 Tagen erneuert, während die älteren Zellen in die oberen Schichten transportiert und abgestoßen werden. In der Stachelzellschicht beginnt die Verhornung (Keratinisierung) der Haut, in welcher Epithelzellen in hornbildende Zellen (Keratinozyten) und weiter in Hornzellen (Korneozyten) umgewandelt werden.[63,65] In der darüber liegenden Körnerschicht werden die Keratinozyten in kernlose Korneozyten umgewandelt und wandern weiter bis in die Hornschicht. Die dazwischenliegende Glanzschicht ist v.a. für die Wärmeregulation verantwortlich und enthält entsprechend vermehrt Fettzellen. Die Hornschicht bildet dann die äußerste Schicht der Epidermis und dient mit Hilfe der Korneozyten als Schutzschicht gegen äußere Einflüsse. Sie ist zudem von einem Hydrolipidfilm überzogen, welcher größtenteils aus Schweiß, Talg und Wasser besteht und somit ebenfalls eine Barrierefunktion erfüllt und wird ca. alle 30 Tage erneuert.[63,66]

Die Dermis ist deutlich elastischer als die Epidermis, da sie v.a. aus bindegewebigen Fasern besteht. Außerdem sind in dieser Schicht auch Blutgefäße und Tastkörperchen angesiedelt und die Dermis ist zudem der Ausgangspunkt für Schweiß- und Talgdrüsen.

Die Subkutis wiederum besteht v.a. aus Fettgewebe, Bindegewebe, größeren Blutgefäßen und Nerven und ist für die Wahrnehmung von Reizen zuständig, sowie auch für die Speicherung von Wärme.

Die Wundheilung lässt sich generell in drei Phasen unterteilen, der Exsudationsphase, der Granulationsphase (proliferative Phase) und der Epithelisierungsphase (Raparationsphase).

Die Exsudationsphase erfolgt direkt nach Auftreten einer Wunde und dient der Reinigung der Wunde. Durch Blutung der Wunde werden Bakterien und Viren aus der

Wunde entfernt und die Blutung wird anschließend gestillt. Des Weiteren wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst, durch welche Blutplasma (Exsudat) austritt, um die Wunde durch Ausspülen von toten Zellen, Mikroorganismen oder Fremdkörpern weiter zu reinigen. Anschließend setzt mit der Granulationsphase der Wundverschluss ein, wobei sich zunächst neue Zellen an den Wundrand anlagern und in die Wunde hinein wachsen, sodass diese letztlich in der Epithelisierungsphase vollständig verschlossen wird. Der vollständige Verschluss der Wunde erfolgt durch Ausbilden von Kollagenfasern, welche sich vernetzen und so für Stabilität in der Haut sorgen.[67,68]
Studien mit einer Plasmajetquelle in einem Mausmodell zeigten erhöhte Gewebeoxygenierung und Mikrozirkulation. Weiterhin zeigten sich veränderte Lipidzusammensetzungen in der *Stratum corneum*. Eine weitere Studie zeigte darüber hinaus einen erhöhten Gehalt von Nrf2 (englisch *nuclear factor erythroid-derived 2-like 2*), welches den Gehalt von antioxidativen Proteinen regelt, welche vor oxidativem Schaden schützen. Auch der Gehalt an Katalase in der Haut, einem Enzym das für die Spaltung von zellgiftigem H_2O_2 (Wasserstoffperoxid) in Wasser und Sauerstoff verantwortlich ist, war nachweislich erhöht nach einer Behandlung mit einem Plasmajet.[61]
Neben den unter 1.2 aufgeführten reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS), welche sich positiv auf die Wundheilung auswirken, konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch die Proliferation von Keratinozyten durch KAP angeregt wird, was sich wiederum positiv auf die Wundheilung auswirkt.[69]
Für die wundheilungsfördernden Effekte von KAP ist die Dosis essentiell wichtig. Geringe Dosen können für die Wundheilung durch Anregung der Proliferation und Migration von Zellen zuträglich sein, während große Dosen zu Zellschädigungen bis hin zur Apoptose führen können.[16]

1.4. Radiodermatitis im Modellorganismus Maus

Der Modellorganismus Maus wird schon seit mehr als 100 Jahren untersucht und verwendet. Im Laufe dieser Forschungen hat sich unter anderem auch herausgestellt, dass Mäuse zu 95 % die gleichen Gene wie Menschen besitzen. Neben anderen Vorteilen wie einer schnellen Reproduktion der Tiere und einer kostengünstigen Haltung, ist diese Ähnlichkeit zu dem Menschen ausschlaggebend für die verbreitete Nutzung von Mäusen als Modellorganismus in der Forschung (https://www.leibniz-

fli.de/de/forschung/tierversuche/tierhaltung-maus/die-maus-als-modellorganismus-1; 24.07.2024). In der hier vorliegenden Arbeit wurden für die Untersuchung einer Radiodermatitis nackte SKH1-Hr^{hr} Mäuse (*strain code*: 477) verwendet. Diese sind immunkompetent und bilden durch das Fehlen der Körperbehaarung einen idealen Modellorganismus für die Untersuchung von Veränderungen an der Haut. Die Radiodermatitis ist bei diesen Tieren leichter identifizierbar als bei behaarten Vertretern dieser Art, ohne dass die Tiere zunächst rasiert werden müssen. Da das Fell ein Erkennen der Radiodermatitis erschweren würde, wäre eine Rasur unerlässlich, allerdings stellt eben diese auch einen Stressfaktor für die Tiere dar. Durch die Verwendung eines Nacktmausmodells konnte dieser Stressfaktor umgangen werden.

In diversen Studien wurden unterschiedliche Geräte für die Induktion einer Radiodermatitis in einem Mausmodell verwendet. Ein Großteil dieser Studien beschreibt die Verwendung von Röntgenstrahlen, welche die lokale Induktion einer Radiodermatitis ohne Beeinträchtigung der inneren Organe der Tiere ermöglicht. Wenige Studien beschreiben aber auch die Induktion einer Radiodermatitis durch Gammastrahlung. Diese Studien unterscheiden sich in dem verwendeten Modellorganismus und der eingesetzten Strahlendosis.[70] Moriyasu et al. 2007 verwendeten z.B. 7 Wochen alte C57BL/6, WBB6F1-W/Wv, und WBB6F1-+/+ Mäuse, welche mit einer Einzeldosis von 40 Gy einer Kobalt-60 Strahlenquelle bestrahlt wurden. Dies resultierte in Erythemen, Ödemen und trockenen Desquamationen in 9-15 Tagen nach der Bestrahlung.[71] Ertekin et al. haben Ratten mit einer Kobalt-60 Strahlenquelle und einer Einzeldosis von 30 Gy bestrahlt und haben trotz geringerer Strahlendosis eine schnellere Entwicklung der Radiodermatitis als bei Moriyasu et al. 2007 beobachtet.[72] Die Entwicklung einer Radiodermatitis ist also nicht nur abhängig von dem Modellorganismus, sondern auch von dem verwendeten Strahlengerät.

In dieser Arbeit wurde ein Gammastrahler IBL 637 verwendet, welcher nach dem derzeitigen Stand in dieser Arbeit erstmalig für die Induktion einer Radiodermatitis in einem Nacktmausmodell (SKH1-Hr^{Hr}) verwendet wurde.

1.5. Ziel dieser Arbeit

Auf Grund der antiinflammatorischen und antiseptischen Wirkung von kaltem Atmosphärendruckplasma (KAP), sowie der Förderung der Geweberegeneration, soll in dieser Arbeit der Einsatz von KAP zur Linderung einer Radiodermatitis untersucht werden. Da für KAP in verschiedenen Studien bereits wundheilungsfördernde Effekte beobachtet werden konnten, sollte untersucht werden, ob KAP auch bei einer Radiodermatitis zu einer schnelleren Wundheilung führt. Dies könnte v.a. Krebspatienten, die eine Strahlentherapie erhalten, Linderung verschaffen und das Risiko einer möglichen Unterbrechung der Strahlentherapie reduzieren.

Zu diesem Zweck soll zunächst ein Mausmodell etabliert werden, in dem eine mittelschwere Radiodermatitis induziert werden kann. Mit Hilfe dieses Mausmodells soll anschließend die Wirkung von KAP auf die Heilung der Radiodermatitis untersucht werden. Ein weiteres Ziel ist es nichtinvasive innovative bildgebende Verfahren für die objektive Verlaufsdokumentation einer Radiodermatitis zu testen und zu evaluieren. Als bildgebende Verfahren sollen die hyperspektrale Bildgebung, die optische Kohärenztomographie und die Laserscanmikroskopie mit einem *Scoring*-System zur Bestimmung des Schweregrads der Radiodermatitis verglichen werden. Für potentiell künftige histologische und molekularbiologische Untersuchungen zum Pathomechanismus der Radiodermatitis, sowie dessen mögliche Modulation durch eine KAP-Behandlung, sollen Hautgewebeproben zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt und asserviert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Verwendete Tiere

Verwendet wurde der SKH1-Hr^{hr} Mäusestamm *strain code*: 477 – Core Facility Zentrale Versuchstierhaltung des Rudolf Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie (IEC) der Universitätsmedizin Rostock. Es handelt sich bei diesen Tieren um immunkompetente Nacktmäuse. Nacktmäuse haben für dermatologische Untersuchungen den Vorteil, dass sie nicht rasiert werden müssen und somit keinem Stress ausgesetzt werden, um Hauterkrankungen visuell besser wahrnehmen zu können. Die Mäuse wurden bei einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus und einer Umgebungstemperatur von 21 ± 2 °C mit 60 ± 20 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Futter in Form von Standardfutter und Wasser wurden den Tieren *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden 49 weibliche und 55 männliche Tiere verwendet, von denen je 16 Tiere (32 Tiere mit Radiodermatitis) in insgesamt zwei Dosisfindungsstudien verwendet wurden (Tabelle 2). Alle Mäuse wurden in der Zentralen Versuchstierhaltung gehalten und für die Versuche in einem Alter von 10 – 12 Wochen zur Verfügung gestellt.

Die Tierversuche wurden von dem Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Fischerei in Mecklenburg-Vorpommern genehmigt (Aktenzeichen: 7221.3-1.1-047/18) und in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG) und der EU-Richtlinie 2010/63/EU durchgeführt.

Tabelle 2 Geschlechtsverteilung verwendetet Tiere

Gruppe	Anzahl weiblicher Tiere	Anzahl männlicher Tiere
Kontrolle	9	12
Kontrolle + KAP	8	7
Radiodermatitis	22	31
Radiodermatitis + KAP	10	5
Gesamt	49	55

Die Tiere wurden täglich auf ihr Befinden anhand einer *Scoring*-Tabelle untersucht und bewertet. Da Mäuse unter Stress und Schmerzen dazu neigen keine Flüssigkeit und

demnach Nahrung aufzunehmen, konnte so anhand von Ausschlusskriterien sichergestellt werden, dass die Tiere nicht unnötig leiden.

2.1.2. Geräte und Chemikalien

Tabelle 3 Geräte und Chemikalien

Gerät/Chemikalien	Herkunft
Argongas	Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Augengel	Vidisic Augengel, Dr. Gerhard Mann chem.-pharm. Fabrik GmbH, Berlin, Deutschland
Cs^{137}-γ-Strahlengerät IBL-637	Gamma Service Medical GmbH, Deutschland
Heizplatten	Klaus Effenberger Med.-Techn. Gerätebau, Pfaffing, Deutschland
Hyperspektralkamera	Tivita, Diaspective Vision GmbH, Am Salzhaff, Deutschland
Isofluranananlage (+ Sauerstoffflasche)	CPPharma, Burgdorf, Deutschland (1,5-2,5 % Isofluran in Sauerstoff)
Kanülen	Insulinkanülen, B. Braun, Melsungen, Deutschland
Ketamin	(Ketaminhydrochlorid (PHARMANAOVO GmbH, Hannover, Deutschland) 98 mg/kg
kINPen MED	Neoplas GmbH, Greifswald, Deutschland
Konfokales Laserscanmikroskop	Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Deutschland (bereitgestellt von der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Universitätsmedizin Rostock unter Prof. Stachs
Kryoröhrchen	CryoPure Röhre, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Novaminsulfon	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Optische Kohärenztomographie	Bereitgestellt von der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Universitätsmedizin Rostock unter Prof. Stachs

Plastiktisch für Mäuse	Eigenbau in Zusammenarbeit mit der Forschungswerkstatt der Universitätsmedizin Rostock
Skalpelle	Aesculap Einwegskalpelle, B. Braun, Melsungen, Deutschland
Stickstoff	Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Strahlenschutzkammer	Eigenbau in Zusammenarbeit mit der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock unter Prof. Hildebrandt
Xylazin	Xylazinhydrochlorid (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) 6,5 mg/kg)

2.2. Methoden

2.2.1. Gammabestrahlung

Die γ-Bestrahlung wurde mit einem Cs^{137}-γ-Strahlengerät IBL-637 (Gamma Service Medical GmbH, Deutschland) durchgeführt. Auf Grund des exponentiellen Caesium-Zerfalls (Halbwertszeit Cs^{137} von 30 Jahren)[73] verringert sich die Strahlendosis des Gerätes über die Zeit. Daher wurde vor jeder Testreihe die benötigte Bestrahlungszeit, um eine definierte Strahlendosis zu gewährleisten, berechnet und durch Veränderung der Bestrahlungszeit variiert. Darüber hinaus gibt es innerhalb der Bestrahlungskammer, welche sich oberhalb des Caesiumkerns befindet, vier verschiedene Ebenen und zudem auf jeder Ebene unterschiedliche Positionen (Abbildung 3) auf denen die Tiere bestrahlt werden können. Dabei ist zu beachten, dass die Strahlendosis zwischen den Positionen variiert. Je weiter eine Position von dem Caesiumkern entfernt ist, desto geringer wird die Strahlendosis. Somit ist die Strahlendosis auf der untersten Ebene am höchsten und nimmt auf den höheren Ebenen ab. Weiterhin nimmt die Strahlendosis auf jeder Ebene ab, je randständiger die Position ist. Demnach ist die Position mit der höchsten Strahlendosis unten mittig (Position 5).

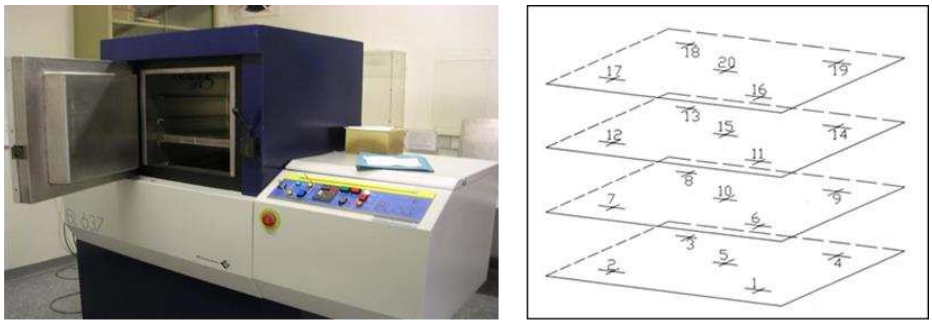


Abbildung 3

Cs^{137}-γ-Strahlengerät IBL-637. a) γ-Strahlengerät mit offener Bestrahlungskammer; b) Darstellung der verschiedenen Ebenen und Bestrahlungspunkte innerhalb der Bestrahlungskammer. Abbildung 3b übernommen aus Bernhardt et al. 2022 nach Creative Commons Attribution 4.0 International License.[70]

2.2.2. Bau einer Strahlenschutzkammer

Der Bau der Strahlenschutzkammer erfolgte in Zusammenarbeit mit der Klinik für Strahlentherapie unter Prof. Hildebrandt (Abbildung 4). Sie diente der gezielten Induktion einer mittelschweren Radiodermatitis am hinteren rechten Bein der Tiere, ohne den gesamten Körper der Tiere zu bestrahlen. Die Kammer und der Deckel wurden jeweils aus MCP96 (Roses Metall) hergestellt, welches eine Legierung aus 50 % Bismut, 25 % Blei und 25 % Zinn ist. Diese Legierung findet in der Strahlentherapie u.a. Anwendung in der Herstellung von individuellen Abschirmblöcken. Die für die Herstellung der Strahlenschutzkammer notwendige Gussform, besteht aus Holz und Polystyrol. Nach dem Prozess der Abkühlung konnte durch das Schleifen der Oberflächen eine gleichmäßige Dicke der einzelnen Wände erzielt werden.[70]

Der Boden der Strahlenschutzkammer hat eine Dicke von 4 cm und schützt die Tiere vor Gammastrahlung, die von einem unterhalb der Strahlenschutzkammer befindlichem Caesiumkern (^{137}Cs) ausgeht. Die linke, die vordere und die hintere Wand der Strahlenschutzkammer hingegen weisen eine Dicke von 1 cm auf, da diese Seiten lediglich ausreichend Schutz vor der Streustrahlung bieten müssen. Die rechte Seite der Strahlenschutzkammer ist mit 0,5 cm wiederum dünner um zu ermöglichen, dass sich das gesamte hintere rechte Bein der Maus außerhalb der Strahlenschutzkammer befindet und somit auch die gesamte Fläche des Beins bestrahlt wird.

Für die γ-Bestrahlung wurde das hintere rechte Bein in eine Plexiglasröhre geführt, welche durch ein Loch an der Außenwand der Strahlenschutzkammer befestigt wurde. Das Loch wurde ca. 3,5 cm von der Rückwand in die rechte Seitenwand gebohrt. In diesem Loch (Durchmesser von 1,2 cm) wurde die Plexiglasröhre (äußerer Durchmesser: 1,2 cm, innerer Durchmesser: 0,8 cm, Länge 5,4 cm) durch ein, Schraubgewinde befestigt. Um das Bein der Tiere durch die Plexiglasröhre zu führen, wurde an diesem ein Band befestigt, welches anschließend mit Pflasterband an der Außenseite der Plexiglasröhre fixiert wurde. Zusätzlich wurde der Deckel (Länge: 13,8 cm, Breite: 5,1 cm, Höhe 1,1 cm) auf den Korpus der Strahlenschutzkammer gesetzt und durch drei Stifte mit dem Korpus fest verbunden, um die Tiere während der Bestrahlung auch vor Streustrahlung von oben zu schützen (Abbildung 4). Bei längerer Bestrahlungszeit (> 5 min) wurde der Deckel während der γ-Bestrahlung leicht offen gelassen, in dem ein Stück Zellstoff zwischen Deckel und Korpus der Strahlenschutzkammer geklemmt wurde, sodass die Mäuse während der Bestrahlung mit ausreichend Sauerstoff versorgt wurden. Der Schutz der Mäuse vor eingehender Strahlung bestand trotz dieser Öffnung weiterhin.[70]

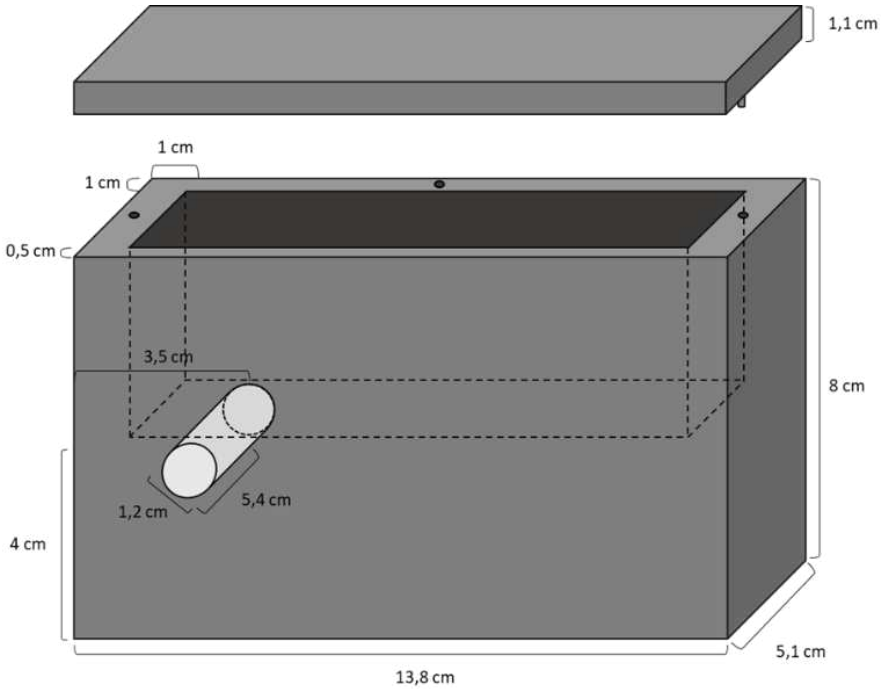


Abbildung 4

Schematische Darstellung der Strahlenschutzkammer. Abbildung übernommen aus Bernhardt et al. 2022 nach Creative Commons Attribution 4.0 International License.[70]

2.2.3. Dosimetrie

Bevor die Mäuse tatsächlich in der Strahlenschutzkammer mit γ-Strahlen bestrahlt werden, sollte überprüft werden, ob die Tiere in der Strahlenschutzkammer wirklich gegen die γ-Strahlen geschützt sind. Dafür wurden insgesamt drei voneinander unabhängige Dosimetrien mit Thermolumineszenzdosimetern durchgeführt. Bei den ersten beiden Dosimetrien wurden drei Thermolumineszenzdosimeter verwendet, um die tatsächliche Strahlung an und in der Strahlenschutzkammer zu messen, wohingegen bei der dritten Dosimetrie vier Thermolumineszenzdosimeter und darüber hinaus ein Schlauchdosimeter, welches 12 Thermolumineszenzdosimeter (H1-H12) enthielt, verwendet wurden.

Anfangs wurde ein Thermolumineszenzdosimeter (D1 in Abbildung 5 a) an Position 5 des Strahlengerätes befestigt und ohne die Strahlenschutzkammer bestrahlt. Position 5 entspricht dabei der Position an der sich auch die Strahlenschutzkammer während der Bestrahlung der Tiere befinden sollte und ist darüber hinaus die Position die sich am dichtesten zu der Strahlenquelle befindet und daher die höchste Strahlendosis aufweisen sollte. Anschließend wurde die Strahlenschutzkammer so auf Position 5 des Gammastrahlers IBL-637 positioniert, dass sich die Plexiglasröhre genau mittig über Position 5 befand (Abbildung 5 b). Das in der dritten Dosimetrie verwendete Schlauchdosimeter wurde durch die Strahlenschutzkammer und die Plexiglasröhre geführt (Abbildung 5 b), während die übrigen Thermolumineszenzdosimeter in jeder Dosimetrie an Position 5 (D2 in Abbildung 5 b), an der Seite der Plexiglasröhre direkt über Position 5 (D3 in Abbildung 5 b) und an der Strahlenschutzkammer neben der Plexiglasröhre (D4 in Abbildung 5 b) angebracht wurden. Die Bestrahlungszeit wurde so gewählt, dass auf Position 5 eine Strahlendosis von 8 Gy zu erwarten war. Die dafür benötigte Bestrahlungsdauer wurde über eine Tabelle ermittelt, welche den Zerfall des Caesiumkerns (Halbwertszeit 30 Jahre) berücksichtigt und so stets aktuelle Bestrahlungszeiten für das Erreichen einer bestimmten Strahlendosis an einer bestimmten Position in dem Gammastrahler errechnet.

Abbildung 5

Darstellung der Dosimetrien mit der Strahlenschutzkammer im Gammastrahler IBL-637. a) Thermolumineszenzdosimeter an Position 5 des Gammastrahlers. b) verschiedene Dosimeter und deren Positionen: D2: an Position 5, D3: an der Plexiglasröhre über Position 5, D4: außerhalb der Strahlenschutzkammer neben der Plexiglasröhre. Innerhalb der Plexiglasröhre ist das Schlauchdosimeter (blau) erkennbar. Abbildung übernommen aus Bernhardt et al. 2022 nach Creative Commons Attribution 4.0 International License.[70]

2.2.4. Anästhesie

Die Anästhesie der Tiere erfolgte je nach gewünschter Dauer der Narkose entweder mit Ketamin/Xylazin oder Isofluran.

Für längere Narkosen oder auch finale Untersuchungen, wurde den Tieren Ketamin/Xylazin (98 mg/kg Ketamin und 6,5 mg/kg Xylazin) intraperitoneal (in die Bauchhöhle) gespritzt. Da Mäuse unter Narkose keinen Lidschlussreflex besitzen, wurden die Augen der Tiere mit einer Salbe (Vidisic Augengel, Dr. Gerhard Mann chem.-pharm. Fabrik GmbH, Berlin, Deutschland) benetzt, um diese vor dem Austrocknen zu schützen.

Die Applikation des Anästhetikums erfolgte auf der rechten Bauchseite der Tiere nahe der Körpermitte, da der größte Teil des Ceacums der Maus auf der linken Seite liegt und die Gefahr diesen zu treffen so minimiert wird.

Bei kürzerer Betäubungsdauer wurden die Tiere mit Isofluran in einer dafür vorgesehen Isoflurankammer (CPPharma, Burgdorf, Deutschland) narkotisiert. Auf Grund der kurzen Betäubungsdauer von Isofluran (wenige Minuten) wurde dieses den Tieren während der Plasmabehandlung über eine Maske weiter zugeführt. Dabei war eine stetige Kontrolle der Atmung der Tiere und gegebenenfalls eine Anpassung der Durchflussrate (z.B. geringere Durchflussrate bei Auftreten von Schnappatmung) unerlässlich. Die Isofluranlage bestand aus mehreren Komponenten. Zunächst

musste der Aktivkohlefilter eingeschaltet und die Sauerstoffzufuhr (durch Aufdrehen der Sauerstoffgasflasche) gewährleistet sein. Über einen Schalter konnte festgelegt werden, ob das Isofluran in die Kammer, in welcher die Tiere initial betäubt wurden, oder in die Maske (zur fortlaufenden Betäubung während der Behandlung mit kaltem Atmosphärendruckplasma (KAP)) geführt wird. Während der Betäubung über die Maske, wurden die Tiere stets auf einer Heizplatte bei 37 °C warm gehalten.

2.2.5. Radiodermatitis-*Scoring*

Das *Scoring* der Tiere zur Bewertung der Schwere der Radiodermatitis erfolgte nach einer modifizierten Tabelle nach Holler et al. 2009 (Tabelle 4).[74] Die Tabelle ermöglichte ein einheitliches *Scoring* der Tiere, da sich dieses nach der Symptomatik der Tiere richtet. Sobald Hautirritationen sichtbar waren, konnte kein *Score* von 0 mehr vorliegen. Das Ziel war es durch die Gammabestrahlung eine mittelschwere Radiodermatitis bei den Mäusen auszulösen, welche sich in einem *Score* von 2,5 widerspiegelt und in einem mäßigen Erythem und feuchten Desquamationen von bis zu 50 % der bestrahlten Haut äußert.

Tabelle 4
Score für die Schwere einer Radiodermatitis, modifiziert nach Holler et al. 2009.[74]

Grad	Symptom
0	Keine Hautirritation sichtbar
1	Leichtes Erythem oder trockene Desquamation
1,25	Deutliches Erythem
2	Mäßiges Erythem oder fleckige feuchte Desquamation (25 % der bestrahlten Haut)
2,5	Feuchte Desquamation in größeren Arealen (50 % der bestrahlten Haut)
3	Konfluierende feuchte Desquamation
4	Hautnekrose oder Ulzeration aller Hautschichten

2.2.6. Durchführung der Dosisfindungsstudie

Die Dosisfindungsstudie diente dem Zweck die optimale Dosis für die Induktion einer mittelschweren Radiodermatitis zu bestimmen. Für die erfolgreiche Bestimmung der

optimalen Dosis zur Induktion einer mittelschweren Radiodermatitis, waren zwei Dosisfindungsstudien erforderlich, welche unter den gleichen Rahmenbedingungen, aber mit verschiedenen Strahlendosen, durchgeführt wurden.

Die Tiere wurden zu diesem Zweck in vier Gruppen eingeteilt. Die einzelnen Gruppen beinhalteten je vier Tiere die jeweils mit insgesamt 25, 30, 35 oder 40 Gy in der ersten und 50, 60, 70 oder 80 Gy in der zweiten Dosisfindungsstudie, fraktioniert über fünf aufeinanderfolgende Tage mit γ-Strahlen bestrahlt wurden (Abbildung 6).

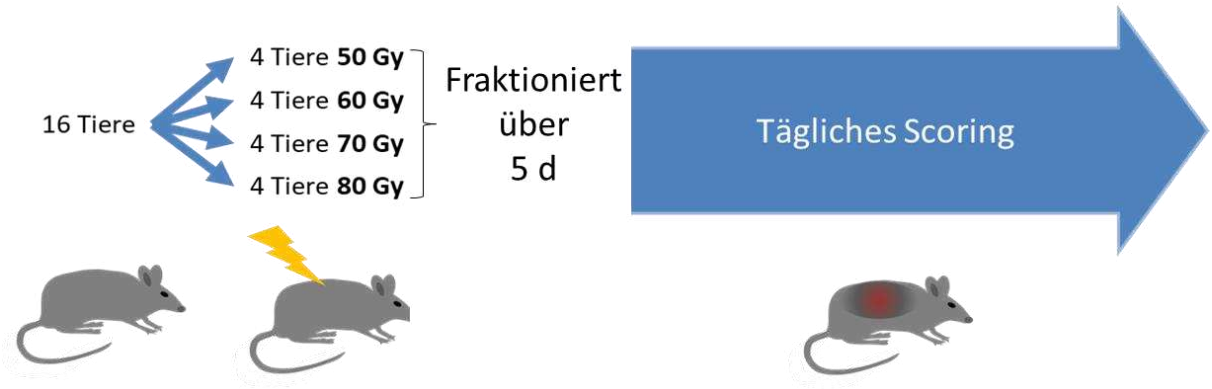


Abbildung 6

Schema zum Ablauf der zweiten Dosisfindung. Die Tiere wurden in 4 Gruppen eingeteilt und mit 50, 60, 70 bzw. 80 Gy γ-Strahlung fraktioniert über 5 Tage bestrahlt und anschließend täglich auf ihren Zustand und die Entwicklung der Radiodermatitis untersucht. d = Tage.

Die Tiere wurden zuvor mit Ketamin/Xylazin (98 mg/kg Ketamin und 6,5 mg/kg Xylazin), durch intraperitoneale Injektion, narkotisiert. Anschließend wurden die Tiere dann in die Strahlenschutzkammer gelegt und das rechte hintere Bein in der Plexiglasröhre mit einem Faden und Pflasterband an der Röhre fixiert.

Der Deckel der Strahlenschutzkammer wurde geschlossen und die Strahlenschutzkammer in den Gammastrahler (Position 5) gestellt. Anschließend wurde der Bestrahlungsvorgang nach Einstellen der benötigten Bestrahlungszeit (Tabelle 5) gestartet. Nach der Bestrahlung wurden die Tiere bis zu deren Aufwachen unter einer Rotlichtlampe gewärmt.

Mit Beginn des ersten Bestrahlungstages wurden die Tiere täglich entsprechend eines Datenblattes für die gesundheitliche Bewertung der Tiere und einer *Scoring*-Tabelle zum Bewerten der Radiodermatitis begutachtet, um deren Gesundheitszustand wie auch die Entwicklung und das Fortschreiten der Radiodermatitis zu überprüfen.

Den Tieren wurde über das Trinkwasser Novaminsulfon (5 Tropfen auf 100 ml Wasser) verabreicht, um auftretende Schmerzen zu lindern. Des Weiteren wurde den Tieren leicht zugängliches, feuchtes Futter bereitgestellt, um eine unnötige Belastung der

bestrahlten Beine zu vermeiden, da sich die Tiere normalerweise aufrichten müssen, um das in einer Einlassung des Käfiggitters befindliche Futter zu erreichen.
Nach Erreichen der maximalen Ausprägung der Radiodermatitis, wurden die Tiere tierschutzgerecht unter Narkose (98 mg/kg Ketamin und 6,5 mg/kg Xylazin) mittels zervikaler Dislokation getötet und entsprechend den Vorgaben des Rudolf-Zenker-Instituts für experimentelle Chirurgie bis zur fachgerechten Entsorgung aufbewahrt.

Tabelle 5 Bestrahlungszeiten für die Gammabestrahlung mit 50-80 Gy.

Dosis [Gy]	Zeit [s]
50	435
60	523
70	609
80	697

2.2.7. Durchführung der KAP-Behandlungsstudie

Nachdem die notwendige Dosis für die Induktion einer mittelschweren Radiodermatitis (*Score* 2,5) erfolgreich ermittelt wurde, konnte darauffolgend die Plasma-Behandlungsstudie beginnen. Dafür wurden 72 Tiere verwendet, die in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt wurden. Eine Gruppe wurde wie unter 2.2.4 und 2.2.6 beschrieben narkotisiert und mit 65 Gy γ-Strahlen bestrahlt, um eine mittelschwere Radiodermatitis zu induzieren, während die andere Gruppe als unbestrahlte Kontrollgruppe diente. Anschließend wurden die Tiere täglich auf ihr Wohlbefinden (nach einer *Scoring*-Tabelle) wie auch ihren Radiodermatitis-*Score* (nach Holler et al. 2009) untersucht. Aus diesen beiden Gruppen wiederum, wurde jeweils eine Hälfte mit KAP behandelt und die andere Hälfte diente abermals als unbehandelte Kontrollgruppe (Abbildung 7).

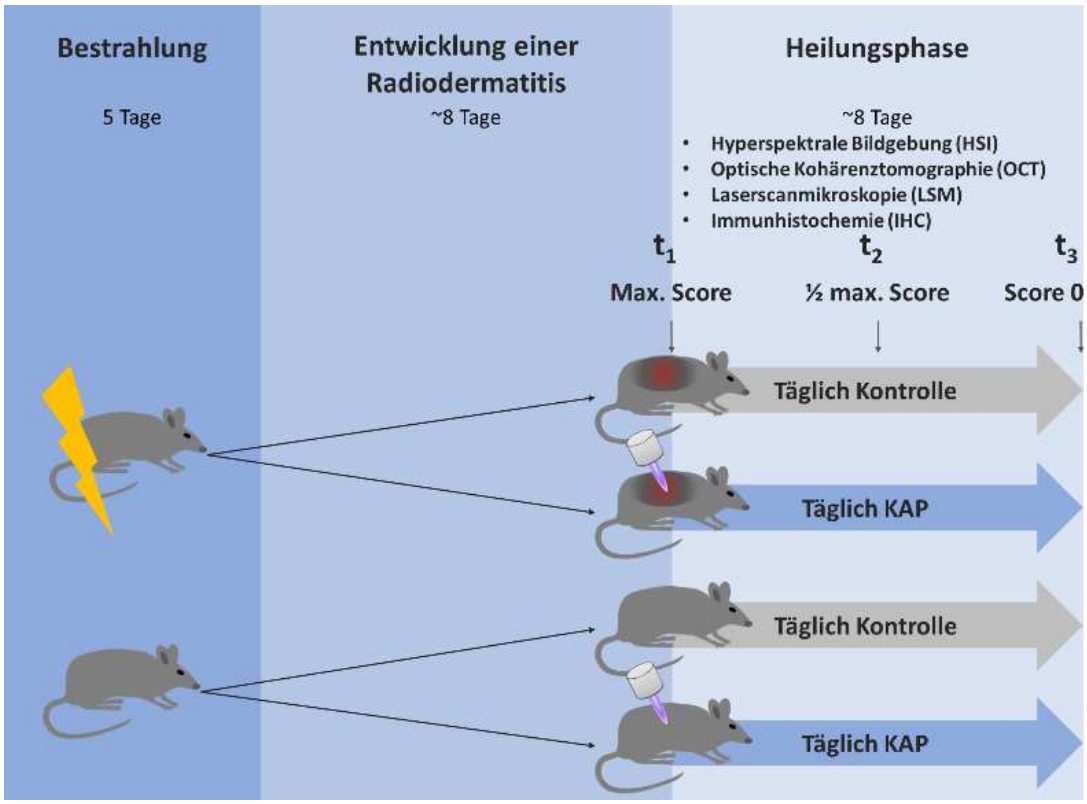


Abbildung 7

Schema zum Ablauf der KAP-Behandlungsstudie. 72 Tiere wurden in vier Gruppen unterteilt, 2 Radiodermatitis- und 2 Kontrollgruppen von denen jeweils eine Gruppe täglich mit KAP behandelt wurde. Die Radiodermatitisgruppen wurden unter Narkose mit 65 Gy γ-Strahlung bestrahlt und daraufhin täglich auf ihren Zustand und die Ausprägung der Radiodermatitis hin untersucht. Zu den Zeitpunkten t1 (maximale Ausprägung der Radiodermatitis), t2 (Heilungsphase mit halbiertem Radiodermatitis-Score) und t3 (vollständige Genesung) wurden Unterschungen mit nichtinvasiven bildgebenen Verfahren getätigt, sowie Hautproben von einer definierten Anzahl von Tieren aus jeder Gruppe entnommen.

Die maximale Ausprägung der Radiodermatitis der bestrahlten Tiere markierte dabei den Start der Plasmabehandlung unter Verwendung des kINPen Med (Neoplas GmbH, Greifswald, Deutschland) und wurde als Zeitpunkt t1 definiert. Von diesem Zeitpunkt an, wurden die Tiere der KAP-Gruppe täglich mit Plasma behandelt, bis sie wieder vollständig genesen waren. Das Erreichen des halben *Scores* der Radiodermatitis wurde als Zeitpunkt t2 und der Zeitpunkt der vollständigen Genesung der Tiere als t3 bezeichnet. Mit dem Zeitpunkt t3 endete außerdem die KAP-Behandlungsstudie. Die Plasmabehandlung erfolgte unter Narkose mit Isofluran (CPPharma, Burgdorf, Deutschland), während die Tiere zu den drei benannten Zeitpunkten, wie unter 2.2.4 beschrieben, durch intraperitoneale Verabreichung von Ketamin/Xylazin (98 mg/kg Ketamin und 6,5 mg/kg Xylazin) narkotisiert wurden.

Für die eigentliche Plasmabehandlung wurden die Tiere auf eine Heizplatte (Klaus Effenberger Med.-Techn. Gerätebau, Pfaffing, Deutschland) bei 37 °C gelegt, damit

die Mäuse nicht auskühlen. Die Verwendung von der Augensalbe war, außer bei den drei Zeitpunkten t1, t2 und t3, nicht nötig, da die reine Plasmabehandlung lediglich zwei Minuten dauerte.

Die Generierung von Plasma erfolgte unter Verwendung des Arbeitsgases Argon, welches sich in einer externen Gasflasche befand, die vor Verwendung aufgedreht werden musste. Bevor das Plasmagerät kINPen Med für die Behandlung der Tiere verwendet wurde, wurde es für mindestens 10 min angestellt, um jegliche Flüssigkeit aus dem Schlauch, durch welches das Argongas fließt, zu entfernen. Anschließend wurden die Tiere bei einer Durchflussrate von 4 slm in kreisförmigen Bewegungen behandelt. Die Behandlungszeit wurde auf 2 min (eine Minute pro Seite) festgelegt (1 min pro cm^2) und die Behandlung erfolgte in einem Abstand des Plasmastifts zu der Hautoberfläche von etwa 10 mm, sodass der Effluent direkt auf die Hautoberfläche trifft (Abbildung 8). Nach der Behandlung wurden die Tiere wieder in deren Käfig gelegt, wo sie kurze Zeit später (maximal 1 min) wieder wach wurden.

Zu den Zeitpunkten t1 - t3 erfolgten nichtinvasive bildgebende Verfahren, um den Heilungsverlauf und die Wirkung von KAP objektiv beurteilen zu können. Dafür war eine Narkose unter Ketamin/Xylazin erforderlich, da während dieser Verfahren eine kontinuierliche Betäubung mit Isofluran nicht praktikabel war. Zusätzlich wurden zu jedem Zeitpunkt eine definierte Anzahl an Tieren aus jeder Gruppe geopfert, um Hautproben entnehmen zu können, welche für die Untersuchung des Einflusses von KAP sowie des Pathomechanismus einer Radiodermatitis unter Verwendung von immunhistochemischen Analysen und späteren Transkriptomanalysen asserviert wurden. Die zu opfernden Tiere wurden unter Narkose (Ketamin/Xylazin) tierschutzgerecht mittels zervikaler Dislokation getötet. Über die Zeit der KAP-Behandlungsstudie wurden die Tiere wie zuvor in der Dosisfindungsstudie täglich auf ihren gesundheitlichen Zustand (nach einer *Scoring*-Tabelle und auf ihren Radiodermatitis *Score* (nach Holler et al. 2009)) untersucht. Mit Beginn des ersten Tages der Bestrahlung wurde den Tieren leicht zugängliches, nasses Futter bereitgestellt, sowie Novaminsulfon über das Trinkwasser (5 Tropfen Novaminsulfon auf 100 ml Wasser) zur Schmerzreduktion verabreicht.

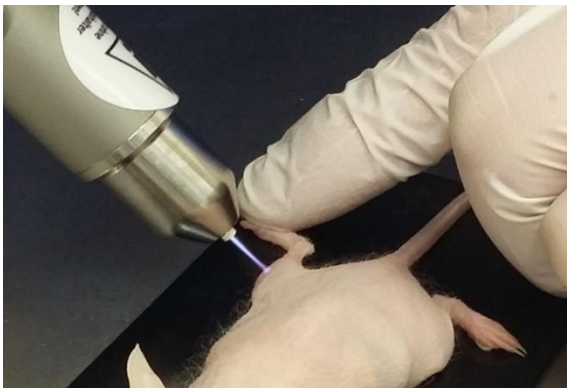


Abbildung 8
Behandlung der rechten Hinterbeine der Mäuse mit KAP. Verwendetet wurde der kINPen Med (neoplas GmbH) mit dem Arbeitsgas Argon und 4 slm.

2.2.7.1. Hyperspektrale Bildgebung (HSI)

Die hyperspektrale Bildgebung (*engl.: hyperspectral imaging*, HSI) ist das erste von drei bildgebenden Verfahren, das für die Untersuchungen des Schweregrades der Radiodermatitis und der Wirkung von KAP verwendet wurde. Die Hyperspektralkamera (Tivita, Diaspective Vision GmbH) war ein Leihgerät von Diaspective Vision. Die HSI dient der Aufnahme und Visualisierung von chemischen Eigenschaften mit einer hohen spektralen Auflösung und ermöglicht die Darstellung von vier verschiedenen Parametern der Haut. Dazu zählen der Hämoglobingehalt (engl.: *tissue haemoglobin index*, THI), der Gewebewassergehalt (engl.: *tissue water index*, TWI), die Perfusion in tieferen Gewebeschichten (engl.: *near-infrared*, NIR) und die Sauerstoffsättigung in oberflächlichen Gewebeschichten (engl.: *skeletal muscle oxygen saturation*, StO_2). Möglich ist dies, da Hyperspektralkameras Wellenlängen erfassen, die über den normalen Sichtbereich eines Auges (lange Wellenlängen Rot, mittellange Wellenlängen Grün und kurzwellige Wellenlängen Blau) hinaus gehen und Wellenlängen im ultravioletten Bereich bis hin zu dem Infrarot Bereich messen können. Die Tivita nutzt 100 Wellenlängen in einem Bereich von 500 bis 1000 nm durch Verwendung einer breitbandigen Lichtquelle.[75] Eine unterschiedliche Färbung äußert sich dabei in höheren bzw. niedrigeren Werten des jeweiligen Parameters (Abbildung 9).

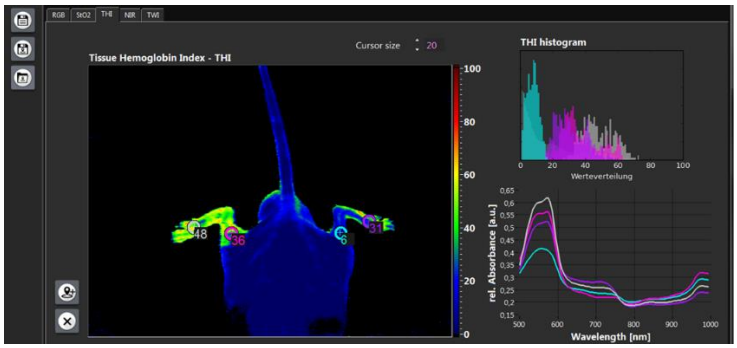


Abbildung 9

Beispiel für Darstellung von Unterschieden der hyperspektralen Bildgebung anhand des Hämoglobingehalts (THI). Bei allen Tieren wurde sowohl an den Beinen als auch an den Füßen Punkte markiert. Die Färbungen an den entsprechenden Positionen der Markierungen werden in Zahlenwerte umgewandelt um so einen Vergleich zwischen den Markierungen und zwischen verschiedenen Tieren zu ermöglichen.

Die Aufnahmen erfolgten zu den drei beschriebenen Zeitpunkten t1, t2 und t3 unter Narkose (Ketamin/Xylazin) der Tiere. Die Tiere wurden in einen zuvor markierten Bereich auf den Bauch gelegt und die Hinterläufe dabei möglichst lang ausgestreckt. Der Raum wurde verdunkelt, um die Kameraaufnahmen nicht durch äußere Lichteinflüsse zu beeinflussen. Anschließend wurde die Aufnahme über die dazugehörige Software gestartet. Die Bilder wurden für eine später folgende Auswertung gespeichert und die Tiere anschließend mit den übrigen bildgebenden Verfahren weiter untersucht. Die Auswertung erfolgte, indem verschiedene Punkte markiert wurden, um somit Werte der Falschfarbendarstellung zu erhalten, welche anschließend verglichen werden konnten. Dafür wurden jeweils am linken und am rechten Bein, wie auch am linken und rechten Fuß Marker gesetzt (Abbildung 9).
Die statistische Auswertung erfolge mit einer Einweg-ANOVA für den Vergleich von jeweils zwei Parametern. So konnten die Mittelwerte aller gesunden/kranken und KAP-behandelten/-unbehandelten Tiere innerhalb jedes Parameters untereinander verglichen und auf Signifikanzen geprüft werden.

2.2.7.2. Optische Kohärenztomographie

Die optische Kohärenztomographie (engl.: *optical coherence tomography,* OCT) ist ein nichtinvasives bildgebendes Verfahren, welches Querschnitte einer Probe mit einer Tiefenschärfe von 1-10 µm ermöglicht. Abhängig von der Beschaffenheit der Probenoberfläche verändert sich die Messung mittels OCT. Das Gerät wurde von Prof. Stachs aus der Klinik für Augenheilkunde der Universitätsmedizin Rostock

bereitgestellt. Die OCT nutz Infrarotlicht, welches aus einer Lichtquelle durch einen Strahlenteiler geteilt und zum Teil auf die Probe und zum Teil auf eine Referenzstrecke gelenkt wird. Die Referenzstrecke endet in einem Spiegel, welcher die Lichtstrahlen zurück zu einem Detektor leitet. Das auf die Probe gelenkte Infrarotlicht wandert durch eine Linse und dringt in unterschiedliche Tiefen des Gewebes der Tiere ein, wird durch Streukörper (z.B. die Epidermis) gestreut/reflektiert und die auf den Detektor treffenden Lichtstrahlen werden anschließend mit den Infrarotlichtwellen der Referenzstrecke zur Interferenz gebracht. Dadurch entsteht ein Signal, welches Aufschluss über z.B. die Tiefenposition der Streukörper gibt und durch die Aneinanderreihung verschieden tiefer Scans, kann ein Querschnittsbild der Probe erstellt werden (Abbildung 10).[76]

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe eines t-Tests, sodass die Mittelwerte von kranken und gesunden bzw. von KAP-behandelten und –unbehandelten Tieren verglichen und auf Signifikanzen geprüft werden konnten.

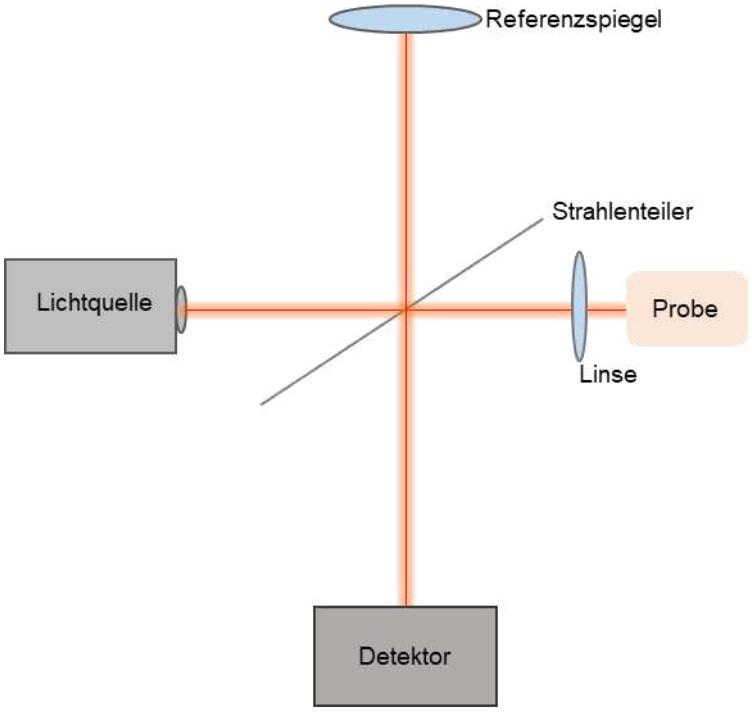


Abbildung 10

Schematische Darstellung des Aufbaus und der Funktion einer Optischen Kohärenztomographie. Ein Lichstrahl wird durch einen Strahlenteiler sowohl durch eine Linse auf eine Probe, als auch über eine Referenzstrecke zu einem Spiegel geleitet. Anschließend werden die Strahlen jeweils reflektiert und zu einem Detektor geführt und zur Interferenz gebracht, um Aufschluss über die Tiefenposition von Streukörper in der Probe zu geben.

Die Aufnahmen erfolgten im Rahmen der drei Zeitpunkte, sodass die Tiere bereits narkotisiert (Ketamin/Xylazin) auf einem, aus Plexiglas angefertigten,

Behandlungstisch positioniert wurden. Dann wurden über eine dazugehörige Software Aufnahmen von beiden hinteren Füßen und Beinen getätigt, wobei zuvor über den Zoom des Gerätes ein gut erkennbares Signal der Probe auf dem Bildschirm des Geräts gesucht wurde.

2.2.7.3. Konfokale Laserscanmikroskopie

Die konfokale Laserscanmikroskopie (KLSM) erfolgte ebenfalls in Zusammenarbeit mit Prof. Stachs aus der Klinik für Augenheilkunde. Sie wird vorrangig in der Augenheilkunde, für z.B. die Untersuchung der Cornea genutzt, findet aber auch in der Dermatologie Anwendung. Bei der KLSM wird das zu scannende Material, in diesem Fall die Haut, von oben fokussiert und mit einem Punktstrahllaser beleuchtet. Das erzeugte Licht wird anschließend von Chromophoren (z.B. Melanin, Keratin und Zellorganellen) reflektiert und zu einem Detektor geleitet.[77] Der Brechungsindex beschreibt dabei die Menge an, von einem Körper, reflektiertem Licht. Strukturen die einen hohen Brechungsindex besitzen, wie z.B. Keratinozyten, leuchten auf den mikroskopischen Aufnahmen heller als Strukturen mit einem niedrigen Brechungsindex.[78] Die KLSM weist eine hohe Auflösung auf, was jedoch die Eindringtiefe auf ca. 250 µm beschränkt. Dies resultiert aus der Verwendung einer Lochblende, um sicherzustellen das nur Signale aus einer definierten horizontalen Ebene auf dem Detektor abgebildet werden und für die Bildgebung weiter verwendet werden.[77] Eine Software sorgt dann für die Visualisierung in Form von helleren und dunkleren, klar definierten, Strukturen.
Abbildung 11 zeigt vereinfacht den Aufbau eines Laserscanmikroskops.

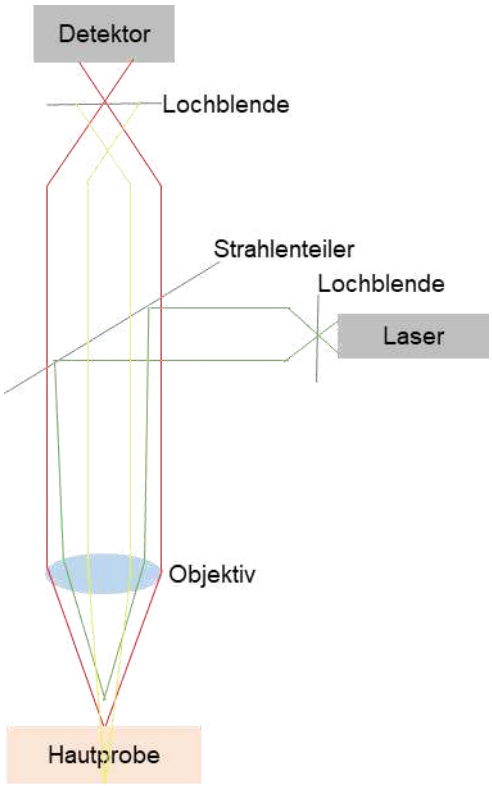


Abbildung 11

Schematische Darstellung des Aufbaus und der Funktion eines Laserscanmikroskops. Eine Lichtquelle strahlt Licht durch eine Lochblende weiter auf einen Strahlenteiler und schließlich durch das Objektiv auf das zu untersuchende Gewebe. Von dort aus wird das Licht reflektiert und durch eine weitere Lochblende zu einem Detektor geleitet, welcher nur das vom Gewebe reflektierte Licht aus der Fokusebene (rote Linie) auffängt, während das Licht aus Ebenen oberhalb oder unterhalb der Fokusebene blockiert wird (gelbe Linie).[79]

Für die KLSM wurden die Tiere, welche bereits unter Narkose (Ketamin/Xylazin) lagen, zu den drei Zeitpunkten t1, t2 und t3 auf einen kleinen Behandlungstisch gelegt und unter dem Objektiv des Laserscanmikroskops positioniert. Anschließend wurde eine Schutzkappe, welche aus Hygienegründen bei Patienten verwendet wird, mit Augensalbe benetzt und auf den Laser gesteckt. Die hinteren Beine und Füße der Mäuse wurden dann ebenfalls mit der Augensalbe eingerieben, um zu gewährleisten, dass die Schutzkappe trotz Kontakt zur Hautoberfläche ohne Probleme gleitender Weise über die Haut bewegt werden kann. Mit Hilfe des Fokus des Mikroskops wurden dann die hinteren Beine und Füße der Tiere gescannt, um Z-Stapel von jedem gescannten Bein und Fuß zu erstellen.

Um eine vergleichbare Ebene als Startpunkt für die Z-Stapel zu erhalten, wurde zunächst so nah an die Hautoberfläche der Haut fokussiert, bis ein Lichtpunkt zu sehen war. Anschließend wurde in kleinen Schritten in tiefere Schichten des Gewebes fokussiert und dabei Bilder aufgenommen. Die Steuerung des Gerätes erlaubte es

nicht eine definierte Distanz für die Schritte in Z-Richtung festzulegen, sodass die Abstände zwischen den Bildern innerhalb eines Z-Stapels und zwischen verschiedenen Z-Stapeln variieren können.

2.2.7.4. Gewebeentnahme

Die Gewebeentnahme erfolgte jeweils zum Abschluss von den drei Zeitpunkten t1, t2 und t3. Zu diesen Zeitpunkten wurde eine festgelegte Anzahl an Tieren geopfert, zu t1 wurden insgesamt 12 Tiere (6 erkrankte Tiere und 6 gesunde Kontrolltiere) für die Probenentnahme geopfert. Zu t2 wurden insgesamt 24 Tiere und zu t3 die restlichen 36 Tiere geopfert. Die zu t2 und t3 geopferten Tiere setzten sich aus den verschieden Gruppen (krank +/- KAP und gesund +/- KAP) zusammen.

Die Tötung der Tiere erfolgte unter Narkose (Ketamin/Xylazin) mittels zervikaler Dislokation. Nach Sicherstellen des Todes der Tiere wurden die hinteren Beine der Tiere am Übergang zur Hüfte mit einem Skalpell abgetrennt. Anschließend wurden der Fuß und das Bein voneinander getrennt und separat in Kryoröhrchen zunächst auf Eis gelagert. Es wurden also für jedes Tier vier Proben generiert. Die Proben wurden innerhalb von einer Stunde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -150 °C asserviert.

2.2.7.5. Histologische Untersuchungen der Gewebeproben

Zur Charakterisierung der induzierten Radiodermatits, wurden die Gewebeproben für histologische Untersuchungen verwendet. Zu diesem Zweck wurden 10 µm dicke Kryoschnitte von Gewebeproben angefertigt, die zu den Zeitpunkten t1 (maximale Ausprägung der Radiodermatitissymptome, *Score* 2,5), t2 (Halbierung der Radiodermatitissymptome, *Score* 1,25) und t3 (makroskopisch geheilt, *Score* 0) entnommen wurden. Die gesunden linken Hinterbeine der erkrankten Tiere, sowie auch die linken und rechten Hinterbeine von gesunden Tieren wurden als Kontrollen vergleichend hinzugezogen. Die Schnitte wurden mittels HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung), Giemsa Färbung und PAS-Färbung gefärbt.

Die histologischen Färbungen wurden mit Unterstützung von Frau Seemann im Histologie-Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie durchgeführt.

2.2.8. Statistische Auswertung

Alle dargestellten grafischen Auswertung wurden entweder mit der Software Microsoft Excel oder im Falle der Hyperspektralen Bildgebung mit GraphPad Prism erstellt.
Mit Hilfe dieser Programme konnten der Mittelwert (MW) und Standardfehler (SEM) berechnet, sowie eine graphische Auswertung durchgeführt werden. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des t-Tests (Student-t-Verteilung) bei der zu jedem einzelnen Zeitpunkt zwei Gruppen miteinander verglichen wurden. Im Falle mehrerer Vergleichsgruppen (mindestens drei) wurde der statistische Test „one-way“ ANOVA (Varianzanalyse) mit Bonferroni post-Test durchgeführt um einen Nachweis signifikanter Unterschiede zu führen. Der Signifikanzwert (P-Wert) wurde innerhalb der Diagramme in den Stufen * ($P<0,05$), ** ($P<0,01$), *** ($P<0,001$) und **** ($P<0,0001$) angegeben. Welches Programm und welche Statistik in den einzelnen Fällen verwendet wurden, kann den Legenden der einzelnen Abbildungen entnommen werden.

3. Ergebnisse

3.1. Dosimetrie

Um zunächst die Abschirmkapazität der hergestellten Strahlenschutzkammer (2.2.2) zu testen, wurden Thermolumineszenzdosimeter in der Strahlenschutzkammer platziert und diese dann auf Position 5 (am nächsten zur Strahlenquelle) in das Bestrahlungsgerät gestellt. Die Bestrahlungszeit wurde so gewählt, dass 8 Gy an Position 5 erwartet wurden.

Bei dieser Messung zeigte sich, dass kaum Strahlung in die Strahlenschutzkammer eingedrungen ist (0,05-0,17 Gy).

Als nächstes wurde die Strahlung am Boden des Bestrahlungsgeräts (Position 5), sowie in der Plexiglasröhre und an der Seite der Strahlenschutzkammer bestimmt (Abbildung 12, Tabelle 6). Wie erwartet wurden an Position 5 ca. 8 Gy (8,29 +/- 0,07 Gy) gemessen. Unter Berücksichtigung des Abstandsquadratgesetzes ist auf Grund der höheren Entfernung zur Strahlenquelle an der Plexiglasröhre eine Strahlung von 4-5 Gy zu erwarten gewesen. Tatsächlich wurden 5,54 +/- 0,21 Gy und 4,56 +/- 0,04 Gy (D3 und D4, Tabelle 6) gemessen. Damit hat sich der Erwartungswert bestätigt.

In einer weiteren Dosimetrie wurde ein Schlauchdosimeter in die Kammer bzw. in die Plexiglasröhre gelegt (H1-H12 Tabelle 7). Auch hier bestätigte sich, unter Berücksichtigung der Abweichung der Thermolumineszenzdosimeter von +/- 10 %, innerhalb der Plexiglasröhre der erwartete Strahlenwert von 5,9 Gy (Abstandsquadratgesetz) und es zeigte sich kaum Strahlung innerhalb der Strahlenschutzkammer (H11-H12 0,89 Gy und 0,32 Gy).

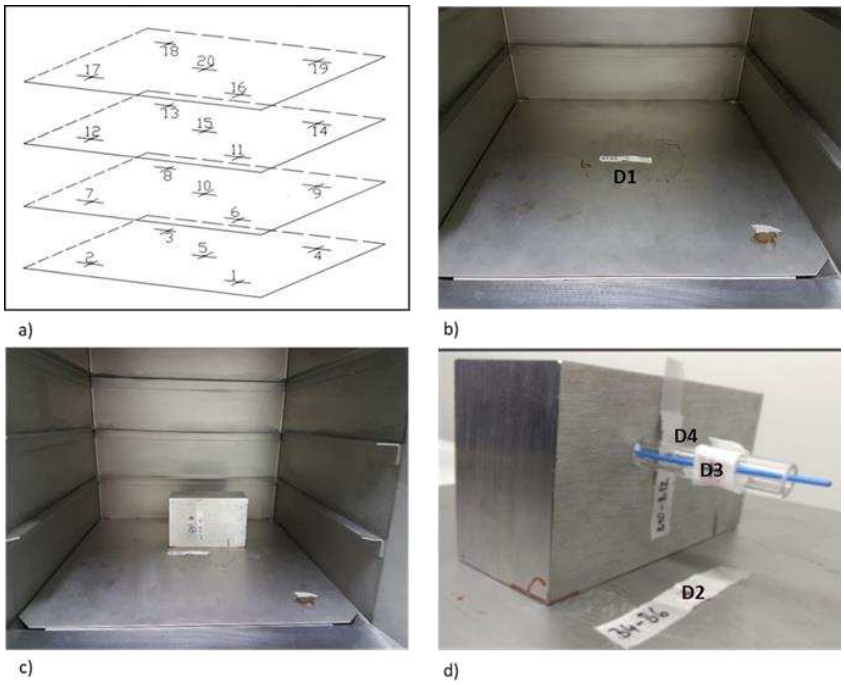


Abbildung 12

Dosimetrie. a) Darstellung der verschiedenen Ebenen und Bestrahlungspunkte innerhalb der Bestrahlungskammer; b) Thermolumineszenzdosimeter (TLD) an Position 5 der Bestrahlungskammer;

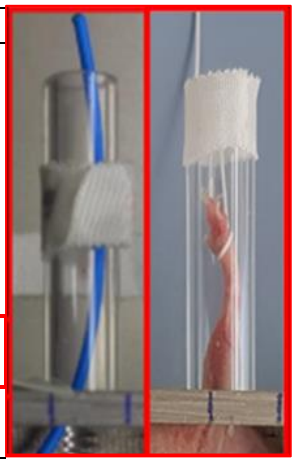
c) Strahlenschutzkammer mit der Plexiglasröhre über Position 5 in der Bestrahlungskammer; d) Verteilung weiterer TLD an der Strahlenschutzkammer. Abbildung übernommen aus Bernhardt et al. 2022 nach Creative Commons Attribution 4.0 International License.[70]

Tabelle 6 Detektierte Strahlenwerte für die Thermolumineszenzdosimeter D1-D4. Tabelle übernommen aus Bernhardt et al. 2022 nach Creative Commons Attribution 4.0 International License.[70]

Dosimeter	**Position**	**Strahlendosis [Gy]** **(Mittelwert ± SD, n = 3)**
D1	Position 5 (ohne Strahlenschutzkammer)	8,29 ± 0,07
D2	Position 5 (mit Strahlenschutzkammer)	7,91 ± 0,29
D3	Lateral an der Plexiglasröhre	5,54 ± 0,21
D4	An der Strahlenschutzkammer neben der Plexiglasröhre	4,56 ± 0,04

Tabelle 7 Detektierte Strahlenwerte für das Schlauchdosimeter H1-H12.
Die einzelnen, im Schlauch enthaltenen, Thermolumineszenzdosimeter sitzen an verschiedenen Positionen der Strahlenschutzkammer. Position a: Innerhalb der Plexiglasröhre (in gleichen Abständen innerhalb der Plexiglasröhre); Position b: Innerhalb der Plexiglasröhre dicht an der Wand der Strahlenschutzkammer; Position c: Innerhalb der Strahlenschutzkammer dicht an der Plexiglasröhre; Position d: Innerhalb der Strahlenschutzkammer. Der fett gedruckte Bereich (H9 und H10) ist der Bereich, in dem sich während der Bestrahlung das rechte Hinterbein der zu bestrahlenden Maus befinden sollte. Tabelle modifiziert nach Bernhardt et al. 2022 nach Creative Commons Attribution 4.0 International License.[70]

Dosimeter	Position	Strahlen-dosis [Gy]
H1	a	5,75
H2	a	5,14
H3	a	5,25
H4	a	5,46
H5	a	5,57
H6	a	5,51
H7	a	5,42
H8	a	5,17
H9	**a**	**5,25**
H10	**b**	**4,05**
H11	c	0,89
H12	d	0,32



Die Dosimeter H9 und H10 befanden sich innerhalb der Plexiglasröhre an der Position an der sich ebenfalls das Bein der Tiere während der Bestrahlung befinden sollte (Tabelle 7), sodass sich der angegebene Wert von 4,65 Gy aus beiden Messwerten der zwei Dosimeter H9 und H10 (4,05 – 5,25 Gy) zusammensetzt. Die hier vorliegende Verringerung der Strahlendosis entsteht durch die erhöhte Position der Plexiglasröhre im Vergleich zu Position 5 in dem Gammagerät (Abbildung 12). Da sich die Strahlenquelle im unteren Teil des Gammastrahlers befindet, kommt die Strahlung entsprechend auch von unten. Zusätzlich erreicht die Streustrahlung aber den gesamten Innenraum des Gammastrahlers. Dadurch entstehen verschiedene Punkte innerhalb des Gammastrahlers an denen die tatsächliche Strahlendosis auf Grund der Entfernung (Höhe/Breite) zu der Strahlenquelle variiert. Position 5 liegt 25 cm über der Strahlenquelle und weitere 4 cm über Position 5 befand sich die Plexiglasröhre der Strahlenschutzkammer, was somit einem Abstand von 29 cm von der Strahlenquelle zu der Plexiglasröhre entspricht. Es entsteht also ein Verlust der Strahlendosis auf Grund der erhöhten Position der Plexiglasröhre. Der tatsächliche Erwartungswert an der Plexiglasröhre kann über das Abstandsquadratgesetz errechnet werden und beträgt 8 Gy x $(25/29)^2$ = 5,9 Gy. Demnach nähern sich die gemessenen Werte außerhalb der Plexiglasröhre mit

5,54 Gy (D3 in Tabelle 6) und innerhalb der Plexiglasröhre mit 5,4 Gy (H1-H9 in Tabelle 7) dem tatsächlichen Erwartungswert an. Die Thermolumineszenzdosimeter haben eine eigene Abweichung von +/- 10 %, sodass die Messwerte innerhalb des zu erwartenden Bereiches von 5,32 bis 6,49 Gy liegen.
Die Positionen H9 und H10 entsprechen während der Bestrahlung der Position des rechten hinteren Beins der Mäuse. An dieser Position zeigt sich mit 4,65 Gy eine ähnliche Strahlendosis wie an der Wand der Strahlenkammer (D4; 4,56 Gy). Daher wurden fortlaufend die Bestrahlungszeiten anhand dieser hier gemessenen Abweichung zwischen Position 5 (8 Gy) und der Plexiglasröhre (H9 und H10; 4,65 Gy) errechnet. Somit ergab sich ein Faktor von 1,7204 (8 Gy/4,65 Gy) mit dem die errechnete Strahlendosis für Position 5 multipliziert werden musste, um die gewünschte Strahlendosis in der Plexiglasröhre an der Position des Beins der Mäuse zu erreichen.
In der Zusammenschau haben die Ergebnisse der Dosimetrie gezeigt, dass keine bzw. nur vernachlässigbare Mengen an Strahlung in die Kammer gelangen und des Weiteren konnte die tatsächliche Strahlendosis an der Position, an der sich das rechte Hinterbein während der Bestrahlung befindet, bestimmt werden.

3.2. Dosisfindung

Basierend auf Literaturangaben wurden zur Induktion einer mittelschweren Radiodermatitis (*Score* 2,5; Tabelle 4) zunächst Gesamtdosen von 25, 30, 35 und 40 Gy getestet.[70]
Dabei zeigte sich lediglich ein Haarverlust (auch Nacktmäuse haben wenige Haare) und ein Verlust der Nägel (Abbildung 13). Darüber hinaus wurden aber bis sechs Wochen nach Bestrahlung keine Anzeichen einer Radiodermatitis beobachtet.

Abbildung 13

Repräsentatives Bild des rechten Hinterlaufs einer Maus nach Bestrahlung in der ersten Dosisfindungsstudie. Es sind keine Symptome einer Radiodermatitis über Haar- und Nagelverlust hinaus erkennbar. Der Nagelverlust beschränkt sich bei dem dargestellten Tier auf einen Zeh.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde eine zweite Dosisfindungsstudie unter Applikation von 50, 60, 70 und 80 Gy durchgeführt.

Dies ging einher mit einer längeren Bestrahlungszeit, da die Strahlendosis bei dem verwendeten Gammastrahler nur über eine Verlängerung der Bestrahlungszeit erreicht werden kann. Darüber hinaus wurde die zweite Dosisfindungsstudie nach dem gleichen Muster wie die erste Studie durchgeführt.

Bereits zwei Tage nach Ende der Bestrahlungszeit traten die ersten Symptome in Form von Haar- und Nagelverlust auf und weiterhin wurde in allen Gruppen die maximale Ausprägungen der jeweiligen Radiodermatitis ca. acht Tage nach Ende der Bestrahlungszeit erreicht (Abbildung 14, Abbildung 15). Die Heilungsphase beanspruchte ca. acht weitere Tage, in dieser Zeit nahmen die Symptome der Radiodermatitis stetig ab, bis schließlich makroskopisch eine vollständige Heilung zu verzeichnen war.

In der 50 Gy Gruppe zeichneten sich leichte Erytheme und trockene Desquamationen ab (*Score* 1) während in der 60 Gy Gruppe moderate bis deutliche Erytheme und stellenweise feuchte Desquamationen (*Score* 2) auftraten. Die Mäuse in der 70 Gy Gruppe zeigten deutliche Erytheme und häufig feuchte Desquamationen in größeren Arealen (*Score* 2,5), während manche Tiere darüber hinaus eine konfluente feuchte Desquamation (*Score* 3) erreichten. In der 80 Gy Gruppe wurden neben deutlichen Erythemen auch konfluente Desquamationen beobachtet, die teilweise bis hin zu Ulzerationen aller Hautschichten reichten (*Score* 3-4; Abbildung 14).

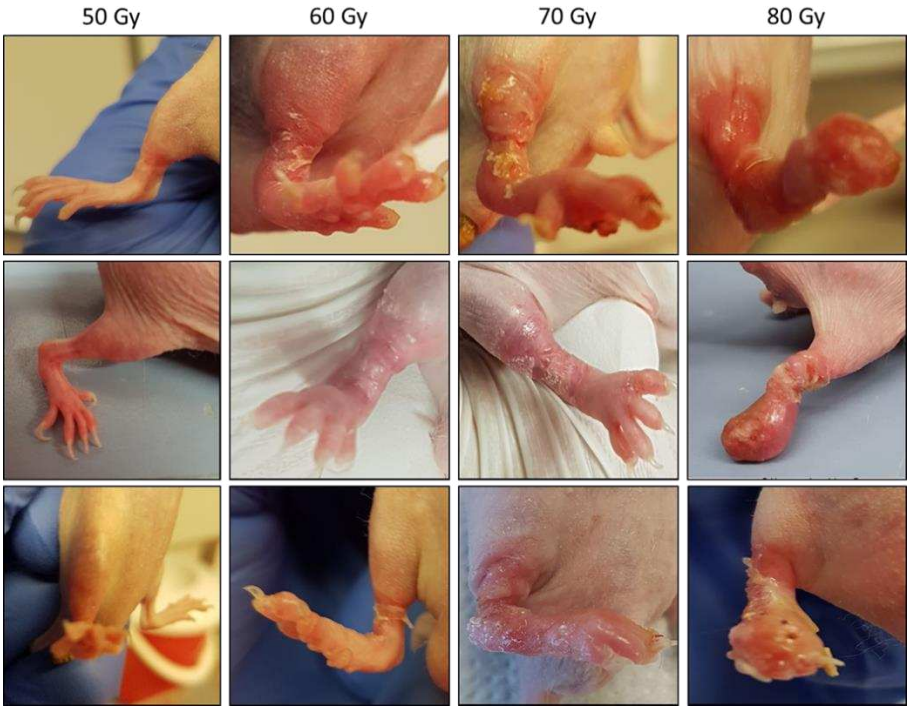


Abbildung 14

Repräsentatives Bild der rechten Hinterläufe von Mäusen jeder Gruppe (50-80 Gy) nach Bestrahlung in der zweiten Dosisfindungsstudie.50 Gy: Score 1. 60 Gy: Score 2. 70 Gy: Score 2,5-3. 80 Gy: Score 3-4. Abbildung übernommen aus Bernhardt et al. 2022 nach Creative Commons Attribution 4.0 International License.[70]

Mit einer fraktionierten Strahlung über 5 Tage und einer Gesamtdosis zwischen 60 und 70 Gy, konnte eine mittelschwere Radiodermatitis lokal am rechten Hinterbein der Mäuse induziert werden, ohne das gesamte Tier einer Strahlenbelastung auszusetzen. Eine grafische Darstellung dieser Ergebnisse verdeutlicht, dass für die Induktion einer mittelschweren Radiodermatitis (*Score* 2,5) mit dem IBL-637 Gammastrahler unter den hier beschriebenen Bedingungen eine Strahlendosis von 60 bis 70 Gy gewählt werden sollte (Abbildung 15). Daher wurde sich für eine Strahlendosis von 65 Gy für die Durchführung der KAP-Behandlungsstudie entschieden.

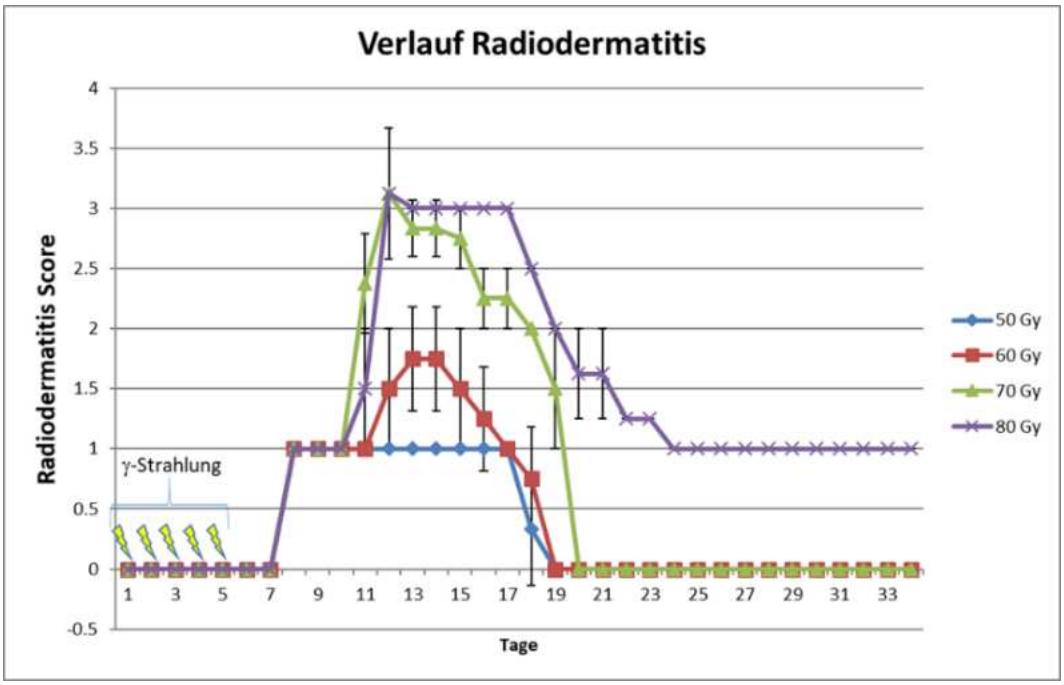


Abbildung 15

Verlauf der Radidoermatitis nach einer Gammabestrahlung mit 50-80 Gy. Die Bestrahlung erfolgte mit jeweils vier Tieren pro Gruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte des Radiodermatitis Scores der einzelnen Gruppen von den Tagen 6 bis 34 inklusive Standardabweichungen. Die Tiere wurden fraktioniert über fünf Tage bestrahlt bis Gesamtdosen von 50, 60, 70 und 80 Gy erreicht wurden und anschließend täglich auf die Ausprägung der Radiodermatitis untersucht. Abbildung modifiziert nach Bernhardt et al. 2022 nach Creative Commons Attribution 4.0 International License.[70]

3.3. KAP-Behandlungsstudie

Nach erfolgreicher Etablierung eines Mausmodells für die Radiodermatitis, sollten im Folgenden nichtinvasive bildgebende Verfahren zur objektiven Beurteilung des Krankheitsverlaufs getestet und verglichen werden. Des Weiteren sollte die mögliche Wirkung von kaltem Atmosphärendruckplasma (KAP) auf den Heilungsverlauf der Radiodermatitis untersucht werden.

3.3.1. Bestimmung des Schweregrads der Radiodermatitis mittels Scoring-System

Die KAP-Behandlungsstudie diente der Untersuchung der Wirkung von KAP auf den Heilungsverlauf einer Radiodermatitis.

Dazu wurde eine mittelschwere Radiodermatitis induziert und zu dem Zeitpunkt der maximalen Ausprägung begonnen diese täglich mit KAP zu behandeln. Nach erfolgreicher Bestrahlung der Tiere wurde mit Hilfe einer modifizierten Tabelle nach Holler et al. (Tabelle 4) der Schweregrad der Radiodermatitis der Tiere bestimmt.
Der Verlauf der Radiodermatitis wurde im Rahmen der KAP-Behandlungsstudie dokumentiert. Es hat sich gezeigt, dass die Induktion einer mittelschweren Radiodermatitis mit 65 Gy γ-Strahlung erreicht werden konnte (Abbildung 15), wobei es bedingt durch die spezifischen Merkmale der einzelnen Mäuse (Alter, Gewicht und Stärke der Immunantwort) auch Schwankungen im maximalen *Score* der Tiere gab. Die Tiere erreichten einen *Score* von 2-2,5, jedoch selten mehr, wobei ein *Score* von 2,5 der mittelschweren Radiodermatitis entspricht. Die Tiere zeigten ähnlich wie in der Dosisfindungsstudie (Abbildung 15) die ersten Symptome bereits zwei Tage nach Ende der Bestrahlungszeit und erreichten die maximale Ausprägung der Radiodermatitis ca. 10 Tage (t1) nach Ende der Bestrahlungszeit. Weitere 3 Tage später, hat sich der *Score* der Radiodermatitis bereits halbiert (t2) und insgesamt 21 Tage nach Ende der Bestrahlung konnten makroskopisch keine Symptome der Radiodermatitis mehr wahrgenommen werden. Ab dem Zeitpunkt t1 wurden die mit KAP zu behandelnden Tiere täglich 2 min behandelt. Es zeigt sich zwischen den Kontrolltieren und mit KAP-behandelten Tieren bis zu dem Zeitpunkt t1 kein signifikanter Unterschied in dem Verlauf der Radiodermatitis. Auch ab dem Zeitpunkt der KAP-Behandlungen zeigt sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 16).
Das *Scoring* der Radiodermatitis hat einen ähnlichen Verlauf gezeigt, wie er bereits in der Dosisfindungsstudie beobachtet wurde. Ein Unterschied zwischen der KAP-behandelten Gruppe zur unbehandelten Kontrollgruppe konnte nicht beobachtet werden. Die Tiere zeigten in beiden Gruppen einen zügigen Heilungsverlauf.

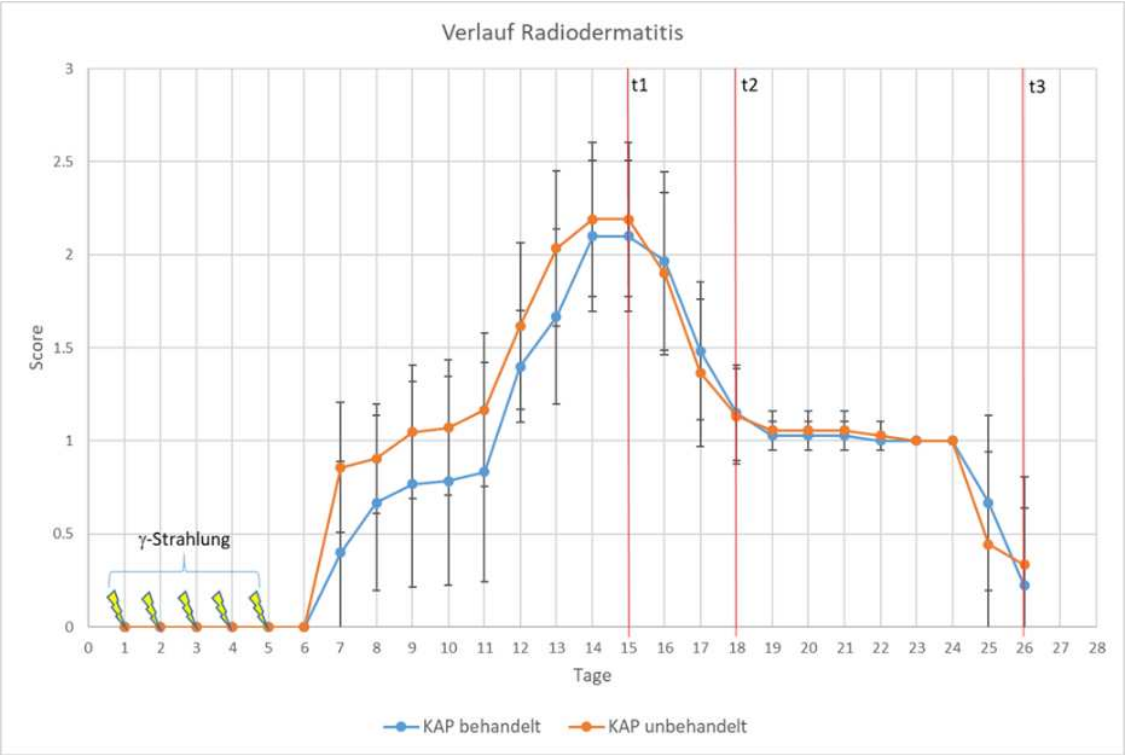


Abbildung 16

Verlauf der Radiodermatitis mit KAP-Behandlung und ohne KAP-Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte des Radiodermatitis Scores mit dazugehöriger Standardabweichung. Die Tiere wurden fünf Tage infolge mit Gammastrahlen bestrahlt, bis eine Gesamtdosis von 65 Gy erreicht wurde. Anschließend wurden die Tiere bezüglich ihres Radiodermatitis Scores täglich untersucht und ab maximaler Ausprägung des Scores wurde ein Teil der Tiere täglich mit KAP behandelt.

3.3.2. Untersuchung nichtinvasiver bildgebender Methoden für die objektive Verlaufskontrolle

3.3.2.1 Hyperspektrale Bildgebung (HSI)

Die Hyperspektrale Bildgebung (HSI) ist eines von drei bildgebenden Verfahren welches für eine objektive nichtinvasive Verlaufskontrolle der Radiodermatitis getestet werden sollte. Eine Aufnahme mit der Tivita Kamera liefert Informationen, die Rückschlüsse auf vier Parameter (Hämoglobingehalt [THI], der Gewebewassergehalt [TWI], die Perfusion in tieferen Gewebeschichten [NIR] und die Sauerstoffsättigung in oberflächlichen Gewebeschichten [StO^2]) zulassen. Für jeden Parameter wurde ein definierter Bereich am Bein und am Fuß jeweils rechts und links bei jeder Maus zu den Zeitpunkten t1, t2 und t3 gemessen. Im Folgenden werden die Ergebnisse für jeden Parameter getrennt dargestellt.

3.3.2.1.1 Durchblutung (THI)

Ein Vergleich der Gruppen zeigt eine deutliche stärkere Durchblutung sowohl am Fuß, als auch am Bein der Mäuse mit einer Radiodermatitis (Abbildung 17). Die stärkere Durchblutung beschränkt sich dabei auf die rechte erkrankte Seite. Die gemessenen Werte für die gesunde linke Seite (Fuß und Bein) ähneln den Werten, die bei gesunden Kontrollmäusen gemessen wurden. Mit zunehmender Abheilung der Radiodermatitis nimmt auch der gemessene Wert für die Durchblutung ab (t1 > t2 > t3). Während der Unterschied zwischen den erkrankten und gesunden Füßen und Beinen zu den Zeitpunkten t1 und t2 hoch signifikant ist, so ist zu dem Zeitpunkt t3 nur noch ein geringer Unterschied zu beobachten. Dieser geringe Unterschied ist aber interessant, da er auf eine höhere Sensitivität dieser Methode im Vergleich zum makroskopischen *Scoring* hinweist. Bei makroskopischer Betrachtung mit bloßem Auge waren zu diesem Zeitpunkt keine Unterschiede zu erkennen.

Ein Vergleich der Gruppen, die mit KAP behandelt wurden, zu den entsprechenden unbehandelten Kontrollgruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede, weder am Fuß noch am Bein und zwar zu keinem der drei Zeitpunkte. Insgesamt sind die gemessenen Werte vom Bein deutlich niedriger als die am Fuß gemessenen Werte.

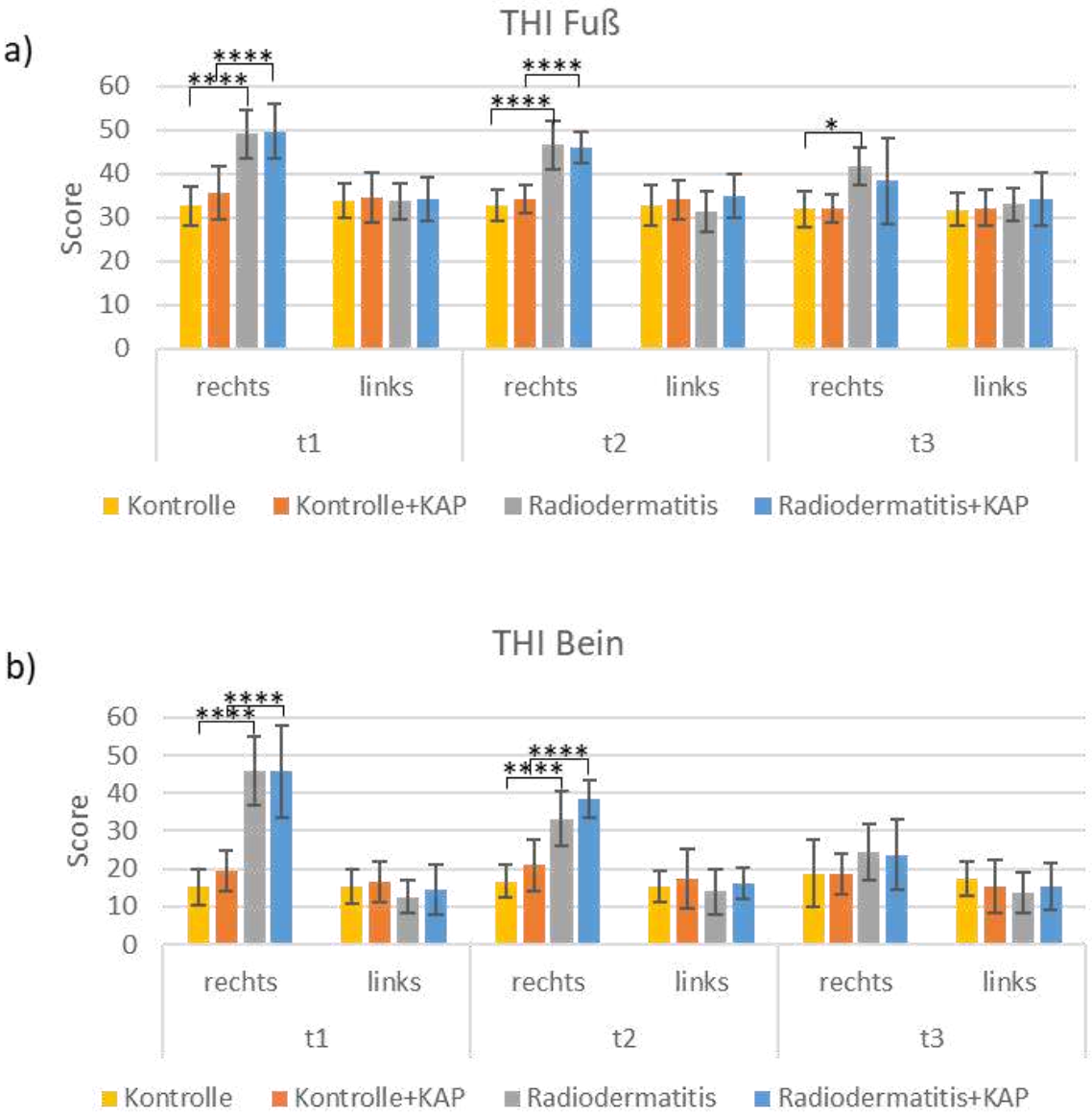


Abbildung 17

*Ergebnisse der hyperspektralen Bildgebung des Hämoglobingehalts (THI) der Füße (a) und Beine (b) aller Tiere. Dargestellt sind die Mittelwerte der einzelnen Gruppen inklusive Standardabweichungen zu den Zeitpunkten t1-t3. Ab dem Zeitpunkt t1 (maximale Ausprägung der Radiodermatitis) wurden die KAP-Gruppen täglich mit KAP behandelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Einweg-ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Post-Test. * $p \leq 0,05$; **** $p \leq 0,0001$.*

3.3.2.1.2 Gewebewassergehalt (TWI)

Der Gewebewassergehalt zeigt ähnliche Ergebnisse wie die Durchblutung, jedoch sind die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht so stark ausgeprägt. Auch hier zeigen sich signifikante Unterschiede v.a. zu t1 und t2 zwischen den gesunden und erkrankten Tieren, wobei sich die Erhöhung des TWI bei den erkrankten Tieren wieder nur auf die rechte Seite der Tiere beschränkt. Im Gegensatz zu dem THI sind die Werte der Füße diesmal niedriger als die der Beine (Abbildung 18).

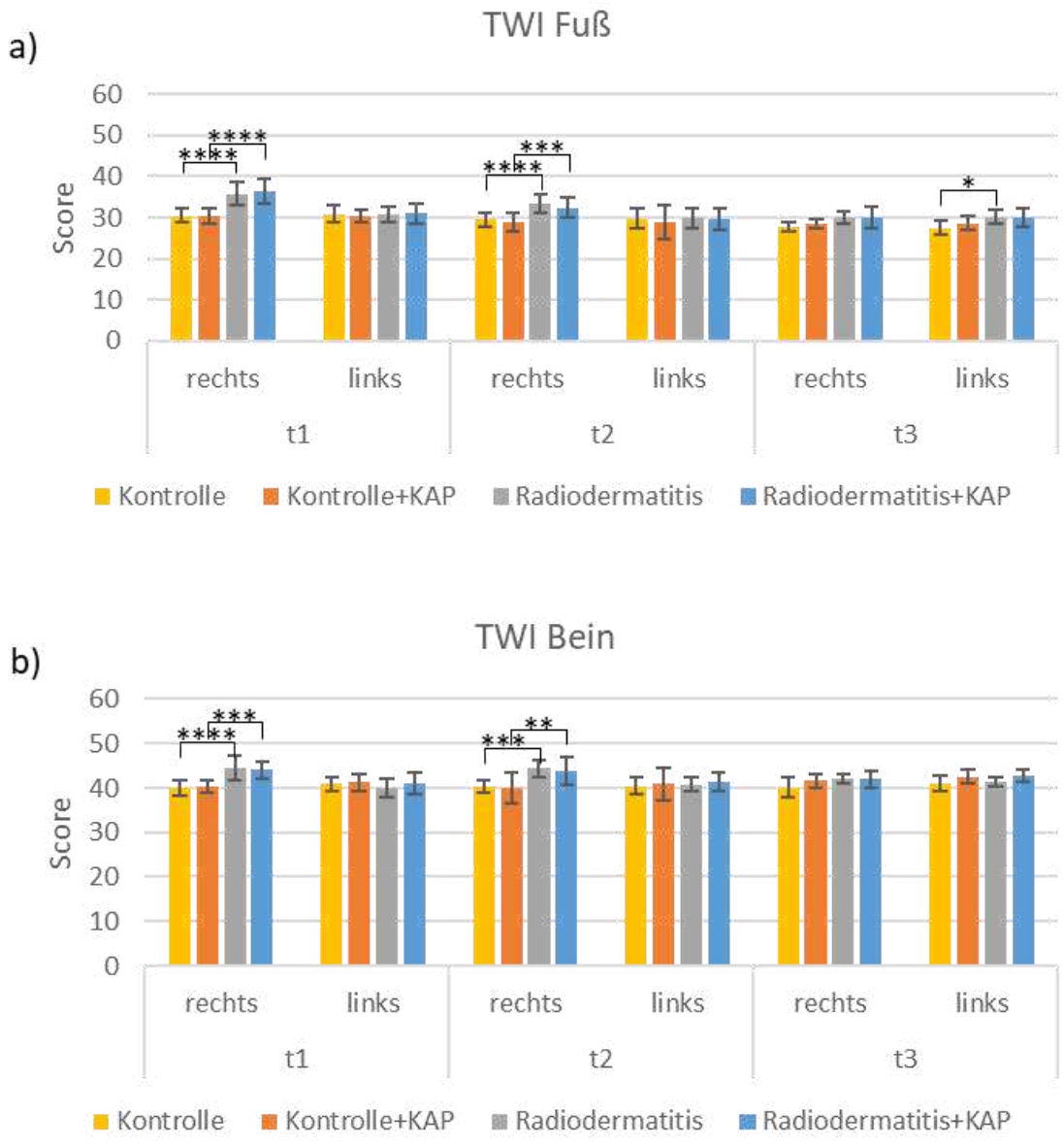


Abbildung 18

*Ergebnisse der hyperspektralen Bildgebung des Wassergehalts (TWI) der Füße (a) und Beine (b) aller Tiere. Dargestellt sind die Mittelwerte der einzelnen Gruppen inklusive Standardabweichungen zu den Zeitpunkten t1-t3. Ab dem Zeitpunkt t1 (maximale Ausprägung der Radiodermatitis) wurden die KAP-Gruppen täglich mit KAP behandelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Einweg-ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Post-Test. * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001.*

3.3.2.1.3 Gewebesauerstoffsättigung (NIR)

Auch für die Gewebesauerstoffsättigung ist ein ähnlicher Trend wie bei den Parametern zuvor erkennbar. Jedoch zeigen sich hier geringere Unterschiede zwischen den gesunden und erkrankten Tieren. Auch für die NIR sind die an den Füßen gemessenen Werte deutlich geringer als die Werte, die an den Beinen gemessen wurden. Die gemessenen Unterschiede zwischen gesunden und erkrankten Tieren sind bei den Füßen stärker ausgeprägt als bei den Beinen. Bei den unbehandelten Kontrolltieren wurden vergleichbare Werte für die NIR untereinander und auch zu den linken (gesunden) Seiten der erkrankten Tiere beobachtet (Abbildung 19).

Trotz geringerer Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen ab dem Zeitpunkt t2 im Vergleich zu vorherigen Parametern, bleibt jedoch eine konstante Tendenz zu höheren Werten bei den kranken KAP-behandelten Tieren als bei den kranken KAP-unbehandelten Tieren auffällig (Abbildung 19). Hierbei handelt es sich jedoch nicht um signifikante Unterschiede, sodass auch bei diesem Parameter keine Modulation der Radiodermatitis oder deren Heilungsprozess durch KAP festgehalten werden kann.

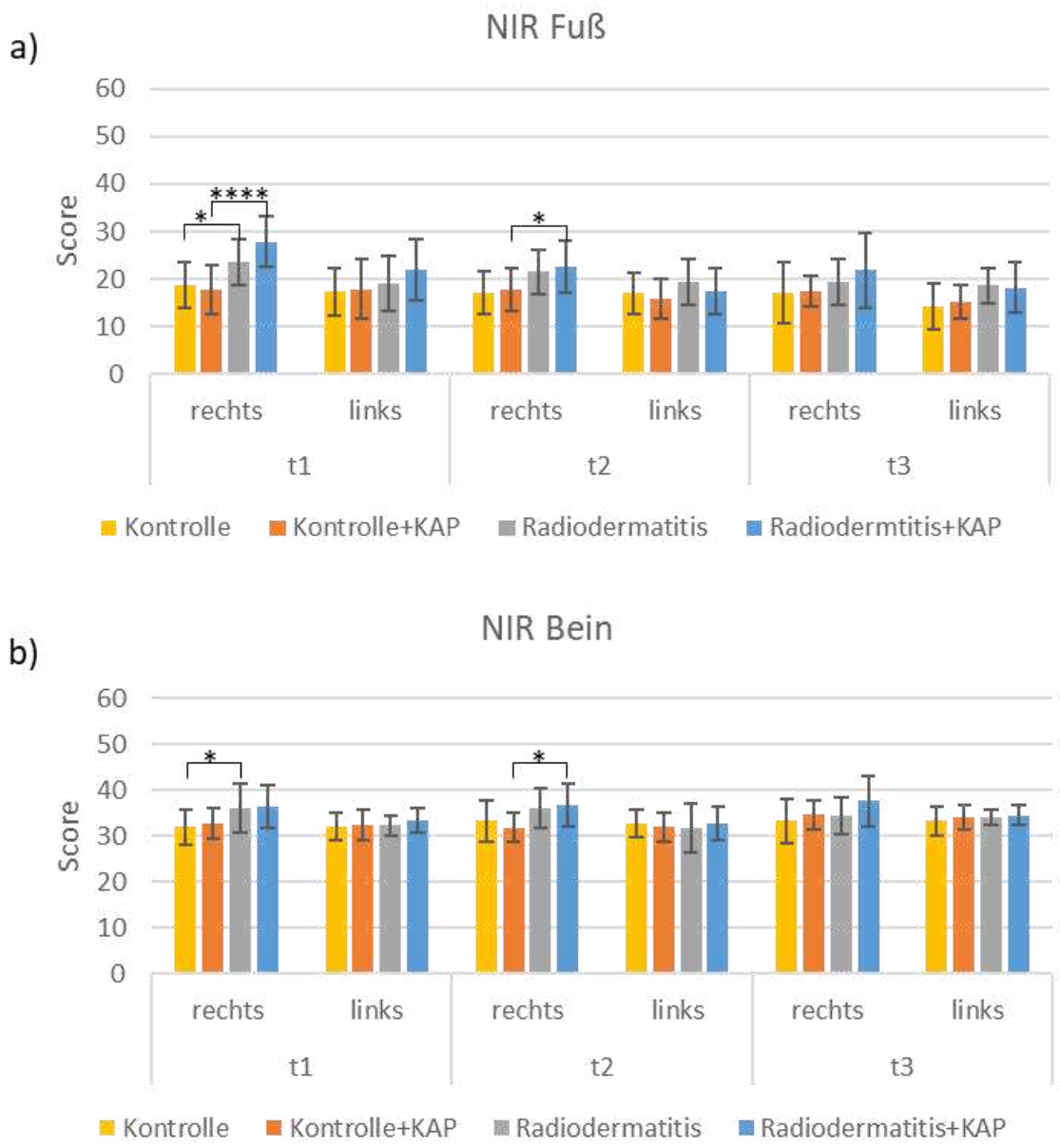


Abbildung 19

*Ergebnisse der hyperspektralen Bildgebung der Gewebesauerstoffsättigung (NIR) der Füße (a) und Beine (b) aller Tiere. Dargestellt sind die Mittelwerte der einzelnen Gruppen inklusive Standardabweichungen zu den Zeitpunkten t1-t3. Ab dem Zeitpunkt t1 (maximale Ausprägung der Radiodermatitis) wurden die KAP-Gruppen täglich mit KAP behandelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Einweg-ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Post-Test. * p ≤ 0,05; **** p ≤ 0,0001.*

3.3.2.1.4 Hämoglobin Index (StO_2)

Der Hämoglobin Index reiht sich als letzter Parameter mit vergleichbaren Ergebnissen zu den vorherigen Parametern ein. Der Trend ähnelt dem der vorhereigen Parameter mit signifikanten Unterschieden zwischen gesunden und erkrankten Tieren v.a. zu den Zeitpunkten t1 und t2. Für den StO_2 zeigen sich leicht höhere Werte der Beine im Vergleich zu den Füßen (Abbildung 20).

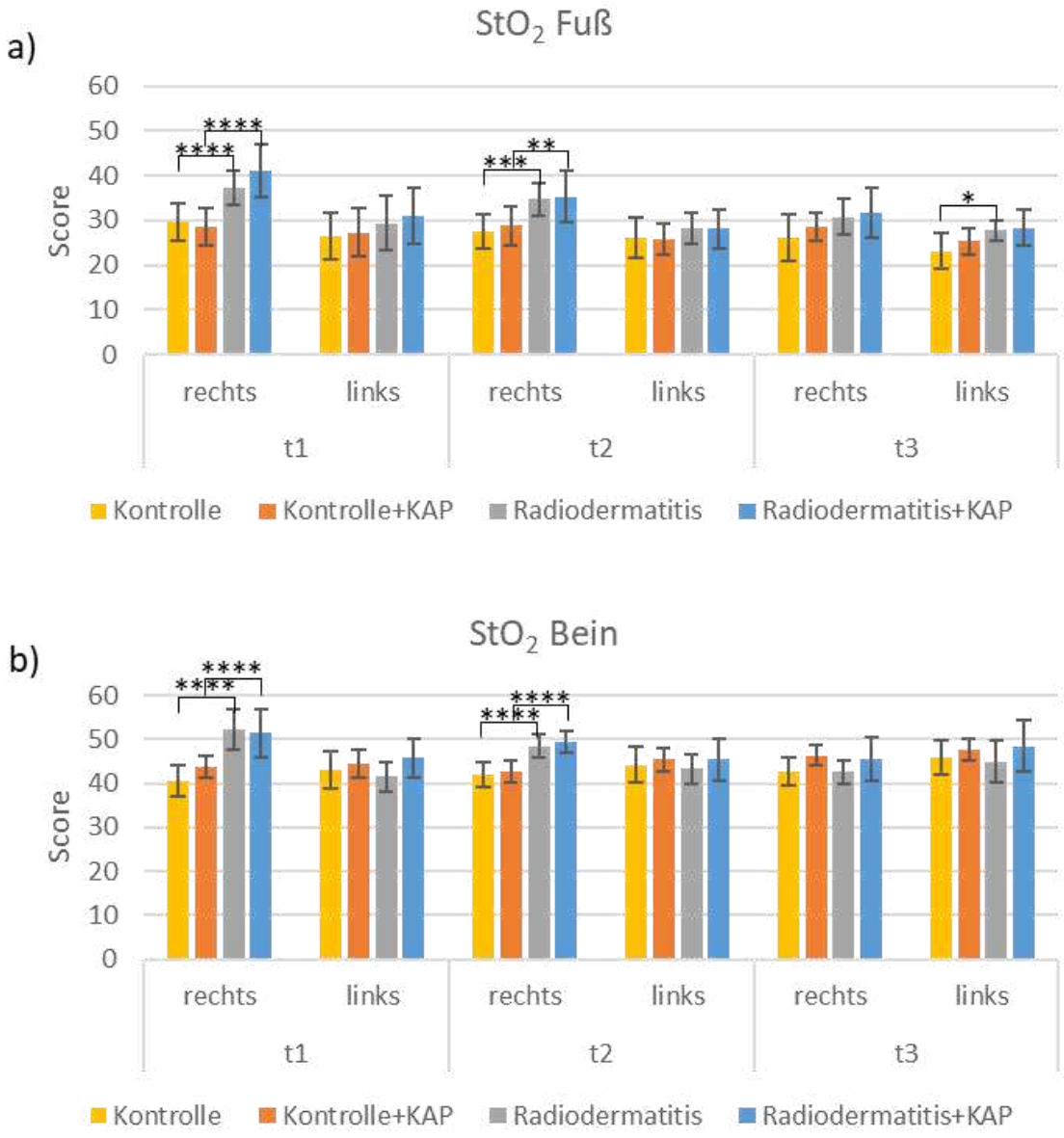


Abbildung 20

*Ergebnisse der hyperspektralen Bildgebung des Hämoglobin Index (StO_2) der Füße (a) und Beine (b) aller Tiere. Dargestellt sind die Mittelwerte der einzelnen Gruppen inklusive Standardabweichungen zu den Zeitpunkten t1-t3. Ab dem Zeitpunkt t1 (maximale Ausprägung der Radiodermatitis) wurden die KAP-Gruppen täglich mit KAP behandelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Einweg-ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Post-Test. *p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001.*

Die hyperspektrale Bildgebung zeigt klare Unterschiede zwischen den gesunden und den erkrankten Tieren mit signifikanten Unterschieden zu den Zeitpunkten t1 und t2, selten auch t3. Unterschiede der gesunden und erkrankten Tiere zu dem Zeitpunkt t3 verdeutlichen eine erhöhte Sensitivität der hyperspektralen Bildgebung im Vergleich zu dem makroskopischen *Scoring*, bei welchem zu t3 keine Unterschiede mehr zwischen den Gruppen erkennbar waren. Bei jedem der gemessenen Parameter wurden erhöhte Werte an den Beinen und Füßen mit induzierter Radiodermatitis beobachtet. Die gemessenen Werte auf der unbestrahlten linke Seite dieser Tiere sind vergleichbar zu den Werten der gesunden Kontrolltiere. Es konnten keine Unterschiede zwischen den KAP-behandelten und KAP-unbehandelten Tieren festgestellt werden, weder in der gesunden Kontrollgruppe, noch unter den Tieren mit induzierter Radiodermatitis.

3.3.2.2 Optische Kohärenztomographie (OCT)

Als weitere Methode zur nichtinvasiven Verlaufskontrolle wurde die optische Kohärenztomographie (OCT) untersucht. Zur quantitativen Auswertung der generierten Bilder wurden verschiedene Ansätze mittels ImageJ getestet. Zunächst sollte die Länge zwischen den ersten Grauwerten (Oberfläche der Epidermis) und den Grauwerten, die an der tiefsten Stelle in der Haut gemessen wurden, bestimmt werden. Auf Grund der Variabilität der Signalstärke und der unterschiedlichen Qualität der Bilder, war eine objektive Identifizierung des Grauwertes an der tiefsten Stelle nicht möglich (Abbildung 21 a).

Als nächstes wurde getestet, ob durch die Bestimmung der Summe der Grauwerte in einem definierten Bereich (gelbes Rechteck in Abbildung 21 b) Unterschiede zwischen gesunder und erkrankter Haut quantifiziert werden können. Die Analyse der so ermittelten Werte zeigte allerdings eine relativ starke Variabilität zwischen den verschiedenen Gruppen und entgegen der Erwartung keine Unterschiede zwischen Bildern von Beinen oder Füßen mit induzierter Radiodermatitis und Bildern von gesunden Beinen oder Füßen (Abbildung 21 c).

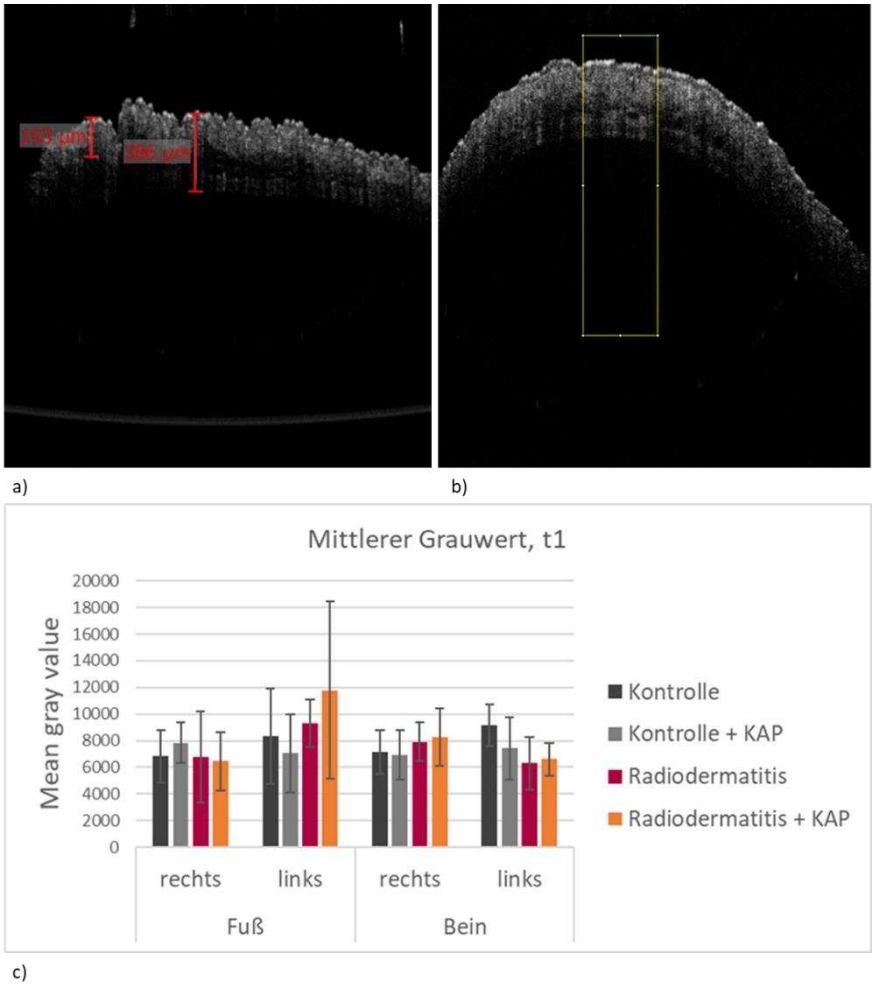


Abbildung 21

Auswertung der optischen Kohärenztomographie. a) Beispiel für die Auswertung durch Messung der Dicke der Epidermis, b) und c) Beispiel für Auswertung durch Messung des mittleren Grauwert-Anteils in einem definierten Bereich zu dem Zeitpunkt t1.

Als weitere Möglichkeit der Auswertung sollte die Verteilung der Grauwerte in den Bildern von der Oberfläche bis in tiefere Schichten verglichen werden (Abbildung 22). Aufgrund der unebenen Oberfläche der Haut an den Füßen der Mäuse waren große Unterschiede zwischen den generierten OCT-Bildern zu beobachten, was eine Vergleichbarkeit der Bilder erschwert. Daher wurde die weitere Auswertung auf OCT-Aufnahmen der Beine beschränkt. Für diese Analysen wurde wieder ein definierter Bereich von den ersten Grauwerten (Oberfläche der Epidermis) bis in tiefe Schichten der Haut, wo keine OCT-Signale mehr gemessen wurden, festgelegt (gelbes Rechteck [150 × 300 Pixel] in Abbildung 22 a). Für diesen definierten Bereich wurde dann jeweils ein *Plot Profile* in ImageJ erstellt, welches die Verteilung der Grauwerte in diesem Bereich darstellt (Abbildung 22 b).

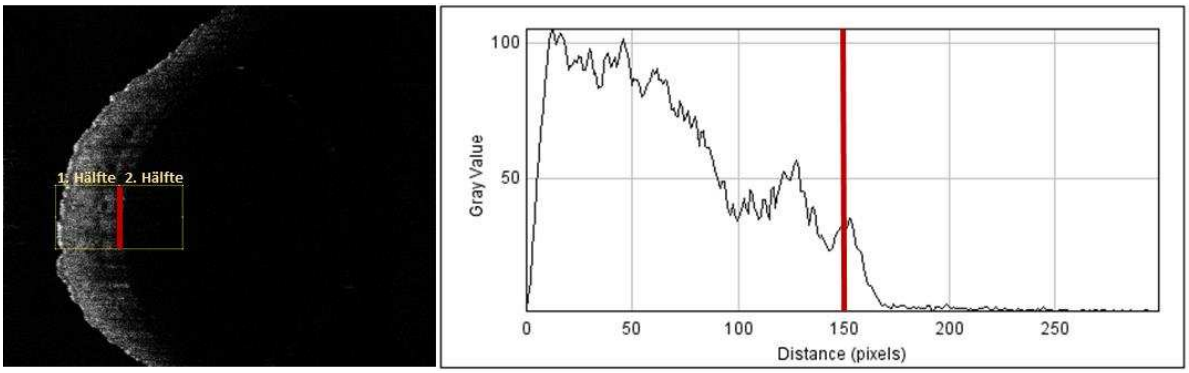


Abbildung 22

Auswertung der optischen Kohärenztomographie. Dargestellt ist ein repräsentatives Bild des rechten Hinterlaufs eines erkrankten Tieres. Gemessen wurden die Signale in den Hinterläufen aller Tiere, welche als Grauwerte dargestellt werden, (a) unter Zuhilfenahme des Graphen (Plot Profile; b). Aus dem Plot Profile geht hervor, dass in der ersten Hälfte deutlich stärkere Grauwerte vorliegen als in der zweiten Hälfte.

Um nun mögliche Unterschiede zwischen den Gruppen (Radiodermatitis versus gesund) zu ermitteln, wurde die Summe der Grauwerte der ersten Hälfte (0 bis 150 Pixel Tiefe) und der zweiten Hälfte (150 bis 300 Pixel Tiefe) verglichen (Abbildung 23). Beim Vergleich der Tiere mit induzierter Radiodermatitis und gesunden Kontrollen zeigte sich zu den Zeitpunkten t1 und t2 ein signifikanter Unterschied, mit erhöhtem Grauwertanteil in tieferen Schichten der erkrankten Tiere im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren (Abbildung 23). Zu t1 und t2 zeigte sich bei den gesunden Tieren im Durchschnitt ein Grauwertanteil von 96 % in der ersten Hälfte, während die kranken Tiere Grauwertanteile von 92 % bzw. 91 % zu dem Zeitpunkten t1 und t2 aufweisen. Für die zweite Hälfte sind es entsprechend 4 % bei den gesunden und 8 % bzw. 9 % bei den kranken Tieren für t1 und t2.

Zu dem Zeitpunkt t3 sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren mehr erkennbar. Dies verdeutlicht, dass bei den erkrankten Tieren mehr Licht in tiefere Gewebeschichten eindringen kann, bevor es dann reflektiert wird. Zu dem Zeitpunkt t3 waren die Grauwerte bei den gesunden Tieren im Durchschnitt zu 95 % auf die erste Hälfte und zu 5 % auf die zweite Hälfte verteilt. Im Gegensatz dazu waren die Werte bei den kranken Tieren mit 93 % und 7 % auf die erste und zweite Hälfte verteilt.

Demnach ist ein Unterschied in der Beschaffenheit der Haut bei einer Radiodermatitis mittels OCT messbar und quantifizierbar. Zu dem Zeitpunkt der makroskopischen Heilung (t3), lassen sich mit dieser Methode in dem Gewebe keine signifikanten

Unterschiede mehr beobachten, sodass hier nicht von einer höheren Sensitivität dieser Methode im Vergleich zum makroskopischem *Scoring* ausgegangen werden kann.

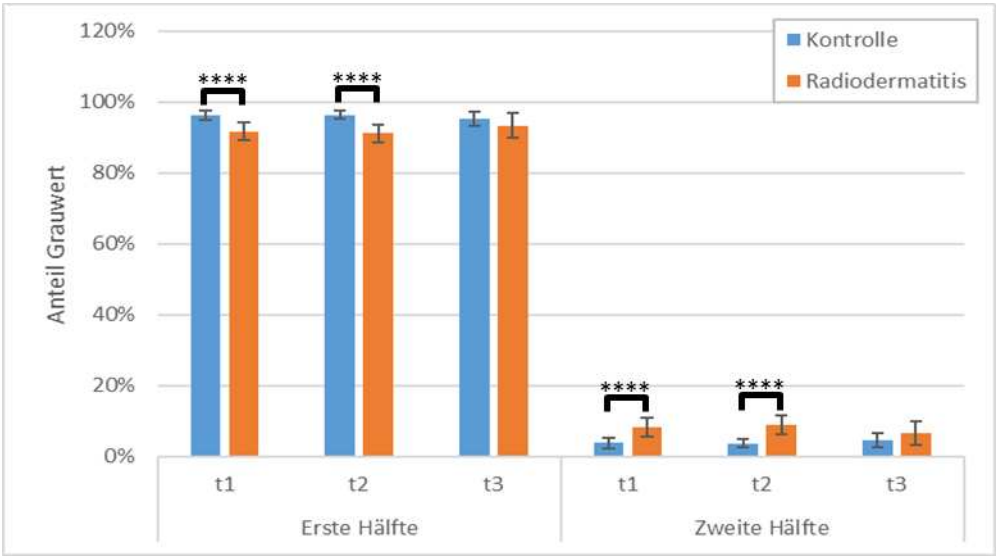


Abbildung 23

*Auswertung der optischen Kohärenztomographie. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung der relativen Grauwertanteile in höheren und tieferen Gewebeschichten aller gesunden und erkrankten Tiere zu den Zeitpunkten t1-t3. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test. **** p ≤ 0,0001.*

Nachdem eine Möglichkeit zur Quantifizierung der OCT-Aufnahmen identifiziert wurde und Unterschiede zwischen Beinen mit induzierter Radiodermatitis und gesunden Kontrollen gezeigt werden konnten, sollte analysiert werden, ob Unterschiede zwischen KAP-behandelten Tieren und unbehandelten Kontrollen bestehen, die mittels Scoring und hyperspektraler Bildgebung nicht ermittelt werden konnten.

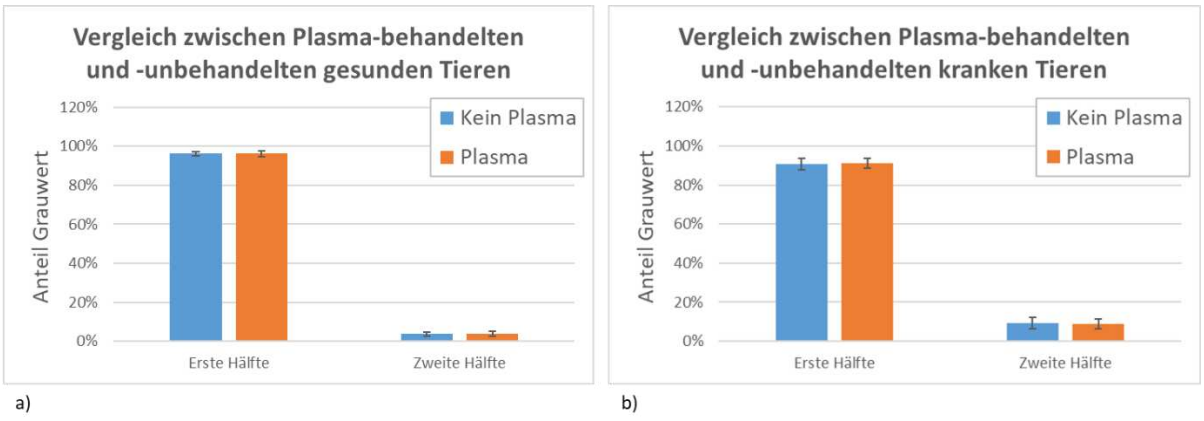


Abbildung 24

Auswertung der optischen Kohärenztomographie aller Tiere zu dem Zeitpunkt t2. Dargestellt ist der Vergleich zwischen Plasma- behandelten und –unbehandelten Tieren bei a) gesunden Tieren und b) erkrankten Tieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test.

Der Vergleich der KAP-behandelten und KAP-unbehandelten Tiere zum Zeitpunkt t2 zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen auf (Abbildung 24). Weder bei den gesunden, noch bei den erkrankten Tieren wurden durch KAP bedingte Veränderungen der Grauwertanteile beobachtet. Sowohl die KAP-behandelten gesunden Tiere, als auch die KAP-unbehandelten gesunden Tiere weisen Grauwertanteile von 96 % in den oberen Gewebeschichten (erste Hälfte) und entsprechend 4 % in den unteren Gewebeschichten auf. Bei den kranken Tieren hingegen waren die Grauwerte in beiden Gruppen (KAP-behandelt *versus* KAP-unbehandelt) mit 91 % in der ersten Hälfte und entsprechend 9 % in der zweiten Hälfte verteilt.

Ein Vergleich der KAP-behandelten und KAP-unbehandelten Gruppen zu dem Zeitpunkt t3 zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 25) bei den gesunden Tieren. Bei den erkrankten Tieren zeigt sich im Gegensatz dazu ein leicht signifikanter Unterschied zwischen den KAP-behandelten und -unbehandelten Tieren in den oberen Gewebeschichten, welcher sich jedoch nicht in den tieferen Schichten wiederspiegelt. In der oberen Gewebeschicht zeigen die gesunden Tiere Grauwertanteile von 95 % (KAP-behandelt) und 96 % (KAP-unbehandelt) und entsprechend in der tieferen Schicht 5 % und 4 %. Bei den erkrankten Tieren hingegen, zeigt sich für die erste Hälfte der KAP-behandelten Tiere mit einem Grauwertanteil von 92 % ein leicht signifikanter Unterschied im Vergleich zu den KAP-unbehandelten Tieren mit 95 %. In der zweiten Hälfte sind Grauwertanteile von 8 % und 5 % erkennbar.

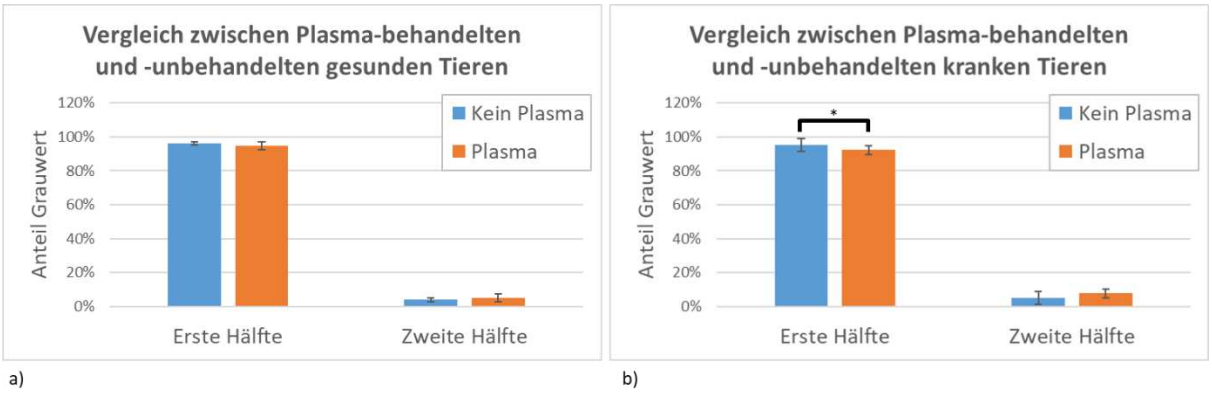


Abbildung 25

*Auswertung der optischen Kohärenztomographie aller Tiere zu dem Zeitpunkt t3. Dargestellt ist der Vergleich zwischen Plasma- behandelten und –unbehandelten Tieren bei a) gesunden Tieren und b) erkrankten Tieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test. * p ≤ 0,05.*

Die optische Kohärenztomographie hat deutliche Unterschiede zwischen den gesunden und erkrankten Tieren aufzeigen können. Bei den erkrankten Tieren wird das eindringende Licht später reflektiert als bei den gesunden Tieren, was durch den erhöhten Grauwertanteil bei den erkrankten Tieren in tieferen Gewebeschichten widergespiegelt wird. Auch mit dieser Methode lassen sich jedoch kaum bis keine Unterschiede zwischen den KAP-behandelten und KAP-unbehandelten Tieren feststellen. Da zu dem Zeitpunkt t3 kaum Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar sind, lässt sich festhalten, dass die Sensitivität dieser Methode kaum über die des makroskopischen *Scorings* hinausgeht. Die Unterschiede zwischen den gesunden und kranken Tieren deuten aber durchaus einen Nutzen dieser Technik für die objektive und nichtinvasive Verlaufsdiagnostik einer Radiodermatitis an.

3.3.2.3 Konfokale Laserscanmikroskopie (KLSM)

Die konfokale Laserscanmikroskopie (KLSM) wurde ebenfalls als nichtinvasives bildgebendes Verfahren zur objektiven Verlaufskontrolle einer Radiodermatitis getestet.

Die Tiere wurden dafür sowohl am linken und rechten Bein, als auch an den entsprechenden Füßen untersucht (Abbildung 26).

Erwartungsgemäß würde bei der KLSM durch die horizontale Schnittführung zunächst die *Stratum corneum* erkennbar sein, welche sich durch kernlose Korneozyten und Furchungen zwischen den Korneozyten auszeichnet. Darunter käme das *Stratum granulosum* mit homogen angeordneten Korneozyten. Die nächst tiefere Schicht wäre dann das *Stratum spinosum,* auffällig durch polygonale Zellen, die jedoch kleiner sind als in höheren Hautschichten. Anschließend käme die dermoepidermale Junktionszone, also die Zone in der Epidermis und Dermis aneinandergrenzen. Dieser Bereich ist gekennzeichnet durch Basalzellen, die als helle ringförmige Strukturen die dunkleren Papillen umgeben.[80]

Es lassen sich Zellstrukturen erkennen, die dem erwarteten Muster von Keratinozyten entsprechen.

Darüber hinaus, zeigen die Bilder der einzelnen Tiere kaum Unterschiede. Hin und wieder zeichnet sich bei kranken Tieren ein kleinerer Interzellularspalt ab als bei den gesunden Tieren. Mögliche durch KAP hervorgerufene Veränderungen sind zunächst

nicht zu erkennen, bzw. konnten nicht detektiert werden. Teilweise lassen sich unterschiedliche Strukturen erkennen (auch innerhalb eines Tieres), jedoch ist es auf Grund der fehlenden Tiefenangabe nahezu unmöglich die verschiedenen Gruppen zu vergleichen, sodass sich keine eindeutige Aussage über Unterschiede zwischen kranken und gesunden und KAP-behandelten und –unbehandelten Tieren treffen lässt.

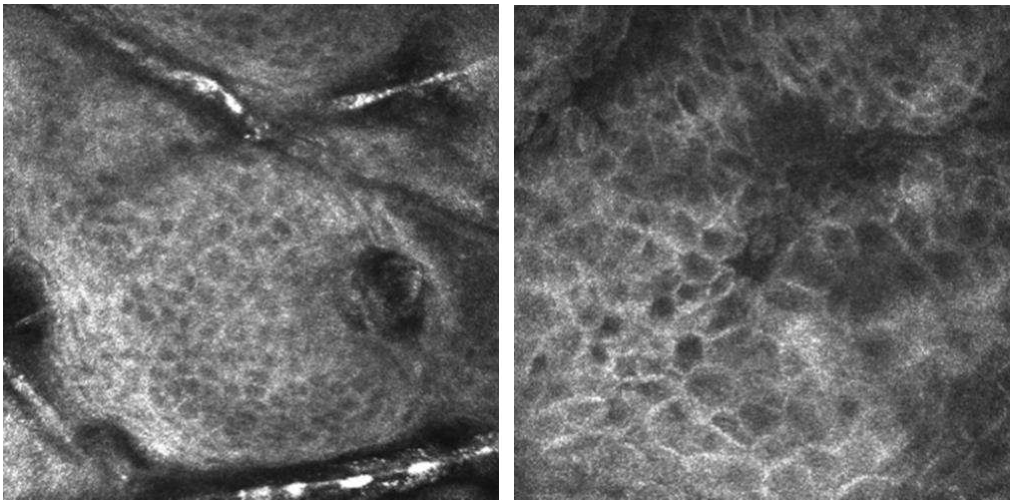


Abbildung 26
Konfokale Laserscanmikroskopie. Vergleich der Epidermis von gesunden (links) und kranken (rechts) Tieren.

Auf Grund der Varianz in den Bildern innerhalb eines Z-Stapels und der Schwierigkeit Bilder aus exakt der gleichen Ebene vergleichen zu können, war eine quantitative Auswertung der Bilder mit diesem Gerät nicht möglich.

3.3.3 Histologische Untersuchungen von Hautgewebeproben mit induzierter Radiodermatitis

Zur histologischen Beurteilung der induzierten Radiodermatitis wurden immunhistologische Untersuchungen an Hautgewebeproben der Mäuse mit und ohne Radiodermatitis durchgeführt. Nach HE-Färbung zeigten sich unterm Mikroskop typische Anzeichen einer Radiodermatitis, wie eine verdickte Epidermis und Hyperkeratose (Abbildung 27). Das *Stratum corneum* (Hornschicht) und *Stratum granulosum* (Körnerschicht) waren im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollproben stark verdickt und auch nach makroskopischer Heilung waren diese Veränderungen klar sichtbar.

Auffällig waren auch Zellinfiltrate, die zunächst in tieferen Gewebeschichten zu sehen waren und mit Voranschreiten und Abklingen der Radiodermatitis dichter an der Epidermis angesiedelt waren.
Nach Giemsa-Färbung wurden in Proben von Tieren mit Radiodermatitis eosinophile Granulozyten beobachtet, welche typischerweise als Teil einer unspezifischen Immunantwort auftreten. Diese waren zum Teil auch noch nach makroskopischer Heilung zu beobachten.
Die histologischen Analysen an Proben der gesunden linken Beine der Tiere mit Radiodermatitis am rechten Bein, zeigten, genau wie die Analysen der Proben von komplett gesunde Tieren, keine auffälligen Veränderungen.
Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Hautgewebe der Mäuse nach Bestrahlung mit dem IBL-637 Gerät histologisch typische Anzeichen einer Radiodermatitis aufweisen und dieses Modell somit gut für *In-vivo*-Untersuchungen innovativer Methoden für die Behandlung einer Radiodermatitis geeignet ist.

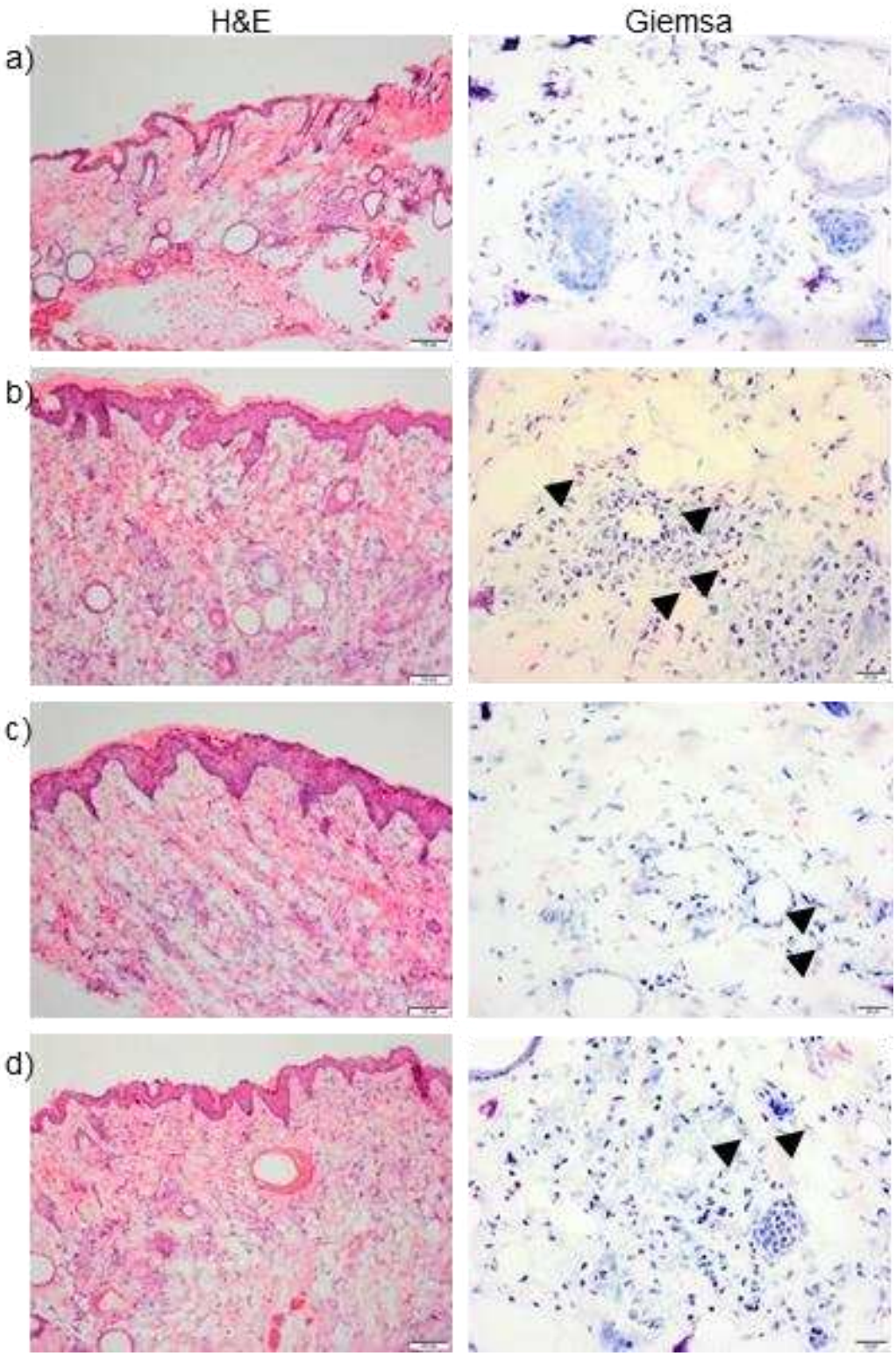


Abbildung 27

Repräsentative Bilder der HE-Färbungen (links) und der Giemsa-Färbungen (rechts) der rechten Hinterbeine verschiedener Mäuse. a) Kryoschnitte einer gesunden Kontrollmaus; b) Kryoschnitte einer Maus mit maximal ausgeprägter mittelschwerer Radiodermatitis (Score 2,5); c) Kryoschnitte einer Maus mit voranschreitender Heilung der Radiodermatitis (Score 1,25); d) Kryoschnitte einer Maus mit makroskopischer Heilung der Radiodermatitis (Score 0). Die Pfeile zeigen eosinophile Granulozyten. Abbildung übernommen aus Bernhardt et al. 2022 nach Creative Commons Attribution 4.0 International License.[70]

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig eine Radiodermatitis bei SKH1-Hr^{hr} Mäusen mit einem Cs^{137}-γ-Strahlengerät IBL-637 induziert und somit ein Modell zur Untersuchung der Radiodermatitis etabliert. Zur Induktion einer mittelschweren Radiodermatitis wurde eine Dosis von 65 Gy fraktioniert über fünf Tage benötigt. In anderen Maus- oder Rattenmodellen für die Radiodermatitis wurden 30-40 Gy Einzeldosen verwendet, wobei v.a. Röntgenstrahlen und nur in wenigen Studien Gammastrahlen verwendet wurden (siehe Anhang Tabelle A1).

In dieser Arbeit traten die ersten Radiodermatitissymptome zwei Tage nach der Bestrahlungszeit auf, während in anderen Radiodermatitismodellen die ersten Symptome meist erst nach mindestens zehn Tagen bis mehrere Wochen auftraten. Auch Cho und Kim et al. 2012 haben mit SKH1-Hr^{hr} Mäusen gearbeitet und erst 24 Tage nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung Entzündungssymptome feststellen können.[81] Lediglich Ertekin et al. 2004 konnten ein vergleichbar schnelles Auftreten der Radiodermatitis (drei Tage nach Bestrahlung) in einem Rattenmodell nach einer Einzeldosis von 30 Gy unter der Verwendung eines Co^{60}-Gammastrahlers beobachten.[72] Dies suggeriert v.a. eine schnellere Entwicklung der Radiodermatitis unter Verwendung von Gammastrahlung im Vergleich zu Röntgenstrahlung. Dies scheint sich gerade im Vergleich zu Cho und Kim et al. 2012 zu bestätigen, da diese Arbeitsgruppe ebenfalls SKH1-Hr^{hr} Mäuse verwendet hat und erst 24 Tage nach Bestrahlung mit 48 Gy Röntgenstrahlung (fraktioniert über vier Tage) die ersten Symptome erkennbar waren.[81] Jedoch haben sie deutlich geringere Strahlendosen verwendet. Während Cho und Kim et al. 2012 48 Gy verwendeten, konnten in dieser Arbeit keine Symptome unter 50 Gy Strahlendosis beobachtet werden. Das Auftreten der ersten Symptome scheint jedoch nicht zwangsläufig von der Strahlendosis abhängig zu sein, da in dieser Arbeit bei allen Gruppen (50 – 80 Gy) in der Dosisfindungsstudie die ersten Symptome ca. zur gleichen Zeit auftraten (Abbildung 15). Auch in anderen Arbeiten wurden Hr-Mäuse verwendet und mit Röntgenstrahlung bestrahlt. Chi et al. 2011 verwendeten eine Strahlendosis von 50 Gy (Einzeldosis) und Maeng et al. 2006 verwendeten eine Strahlendosis von 40 Gy (fraktioniert über vier Tage) und konnten erste Symptome sechs bzw. zehn Tage nach der Bestrahlung erkennen.[82,83] Moriyasu et al. 2007 hingegen verwendeten in einem Mausmodell einen Co^{60}-Gammastrahler mit einer Einzeldosis von 40 Gy, wobei die ersten Symptome

nach zehn Tagen auftraten.[71] Dies weist darauf hin, dass für die Induktion einer Radiodermatitis die Form der Bestrahlung als Einzeldosis oder in fraktionierter Weise ebenfalls Einfluss auf den Zeitraum bis zur Entwicklung der ersten Symptome hat. Der Heilungsprozess der Tiere in dieser Arbeit verlief im Vergleich zu anderen Maus- oder Rattenmodellen für die Radiodermatitis vergleichsweise schnell ab. Bereits drei Wochen nach Ende der Bestrahlungszeit waren makroskopisch keine Symptome der Tiere mehr erkennbar, während sich in an anderen Modellen mehrere Wochen bis Monate nach der Bestrahlung noch Symptome zeigten.[71,72,81–85]

Da Röntgenstrahlen und γ-Strahlen sich hinsichtlich ihrer Wellenlängenbereiche unterscheiden (Röntgenstrahlung ca. 0,01 nm bis 10 nm und γ-Strahlung unter 0,001 nm), sind sie auch energetisch unterschiedlich.[86,87] Je geringer der Wellenlängenbereich, desto höher der Energiebereich der jeweiligen Strahlen. Somit wäre davon auszugehen, dass γ-Strahlen (Energiebereich von über 200 keV) auch einen stärkeren Einfluss auf die Haut ausüben, als Röntgenstrahlen (Energiebereich von 100 eV bis 250 keV). Jedoch spielt hier auch die Wirkweise der Strahlung eine Rolle, sowie das verwendete Strahlengerät. Es handelt sich bei beiden Strahlungsarten um elektromagnetische Strahlung, jedoch ist γ-Strahlung darüber hinaus auch radioaktiv. Während Röntgenstrahlung durch hochenergetische Elektronenprozesse entsteht, wird γ-Strahlung durch Prozesse im Atomkern freigesetzt, wenn dieser von einem angeregten Zustand in einen energetisch günstigeren Zustand wechselt. Beide Strahlungsarten haben eine hohe Durchdringungsrate, wobei γ-Strahlung eine sehr große Reichweite und höhere Eindringtiefe aufweist.[86,87] Daher lässt sich vermuten, dass die Unterschiede in der Entstehung und somit Wirkung der Strahlung unterschiedliche Effekte erzielen und sich verschiedene Strahlungsarten unterschiedlich auf verschiedene Haut- und Gewebeschichten auswirken. Die höhere Eindringtiefe und die Radioaktivität der γ-Strahlung im Vergleich zu Röntgenstrahlung ist eine mögliche Erklärung für das frühere Auftreten einer Radiodermatitis nach Bestrahlung mit γ-Strahlung.
Ein weiterer Unterschied liegt in den zur Bestrahlung verwendeten Geräten. Während Röntgenstrahlung gezielt angewendet werden kann, ist für die Bestrahlung mit γ-Strahlen ein Gerät nötig, in welchem sich eine radioaktive Quelle befindet. Dies führt zu einer Bestrahlung innerhalb des gesamten Gerätes und somit zu Streustrahlung,

sodass sich eine gezielte und selektive Bestrahlung einzelner Komponenten ohne weitere Schutzmaßnahmen nicht umsetzen lässt. Daher kann Röntgenstrahlung für eine effektive Bestrahlung des rechten Hinterbeins der Mäuse verwendet werden und durch gezieltes Bestrahlen eine Radiodermatitis mit einer geringeren Dosis als das hier verwendete γ-Strahlengerät auslösen. Die Streustrahlung im γ-Strahlengerät ist bedingt durch die Funktionsweise des Geräts. Die Strahlenkammer in welche die Mäuse platziert wurden, wird bei dem Prozess der Bestrahlung in den unteren Teil des Geräts gefahren, wo sich die Caesiumquelle befindet. Dadurch wird die gesamte Strahlenkammer von unten mit γ-Strahlung bestrahlt, sodass eine gezielte Bestrahlung nicht möglich ist. Die Streustrahlung verliert dabei an Energie je mehr Weg sie zurücklegt, sodass gestreute Strahlung schwächer wird. Es muss also insgesamt eine höhere Dosis verwendet werden, um an dem rechten Hinterbein die eigentlich gewünschte Dosis zu erzielen. Durch die in 2.2.3 beschriebene Dosimetrie und Berechnung der Dosis über das Abstandsquadratgesetz, konnte die notwendige Strahlendosis ermittelt werden, bei welcher die gewünschte Dosis tatsächlich am rechten Hinterbein der Tiere ankommt. Das Einstellen einer höheren Dosis kann also nicht das frühere Auftreten einer Radiodermatitis unter γ-Strahlung erklären, da die Dosis am rechten Hinterbein letztlich identisch ist.

Die erfolgreiche Etablierung des Modells zur Induktion einer mittelschweren Radiodermatitis erlaubte anschließend die Untersuchung mit nichtinvasiven bildgebenden Verfahren für die objektive Untersuchung einer Radiodermatitis mit und ohne Behandlung mit kaltem Atmosphärendruckplasma (KAP).

Mit Hilfe dieser Verfahren sollte ein möglicher Einfluss von KAP auf die Wundheilung bei einer Radiodermtatitis untersucht werden. Des Weiteren gilt es zu beurteilen, ob die dafür verwendeten Verfahren generell für diesen Zweck geeignet sind.

Die hyperspektrale Bildgebung (HSI) und die optische Kohärenztomographie (OCT) lassen deutliche Unterschiede zwischen Mäusen mit Radiodermatitis und Mäusen ohne Radiodermatitis erkennen. V.a. der Wassergehalt im Gewebe (TWI) und die Durchblutung (THI) sind bei den kranken Tieren im Vergleich zu den gesunden Tieren stark verändert. Eine höhere Durchblutungsrate sorgt im Falle einer Wunde zu einer schnelleren Wundversorgung und somit Heilung. Durch die einsetzende Wundheilung ist lokal also eine erhöhte Durchblutung notwendig, sodass diese Unterschiede durch die körpereigene Wundversorgung aufgetreten sein werden. Dies erklärt auch, dass eine Erhöhung des THI sowohl in KAP-behandelten, als auch in KAP-unbehandelten

Tieren zu beobachten war. KAP weist nachgewiesenermaßen durchaus wundheilende Effekte, wie z.B. durchblutungsfördernde Effekte, auf, allerdings zeigten sich in dieser Arbeit keine daraus resultierenden Unterschiede zwischen KAP-behandelten und -unbehandelten Tieren.[18–22] Der erhöhte Wassergehalt bei den kranken Tieren ist zudem durch das Auftreten von Ödemen zu erklären. Die Ausbildung eines Ödems ist im Zuge einer Radiodermatitis ein typisches Symptom und tritt häufig frühzeitig mit dem Auftreten der Entzündung auf. Ein Ödem ist eine Ansammlung von Flüssigkeit in den Zwischenräumen von Organen, Geweben oder Zellen und äußert sich häufig lokal in einer Schwellung.[88] Demnach ist eine Erhöhung des Wassergehalts im Gewebe bei Tieren mit einer Radiodermatitis gut zu erklären. Wenig verwunderlich ist an der Stelle auch die Abnahme des TWI mit voranschreitender Heilung. Eine erhöhte Durchblutung und somit eine Erhöhung des THI ist also bei der Wundheilung von Vorteil und führt entsprechend zu einer Verminderung des TWI bei voranschreitender Heilung der Radiodermatitis. Auch die Sauerstoffgehalte (Sauerstoffsättigung NIR und Hämoglobinindex StO_2) zeigen signifikant erhöhte Werte in den kranken Tieren. Auch dies korreliert mit einer erhöhten Durchblutungsrate, da Blut der Träger von Sauerstoff im Körper ist. Der erhöhte Blutfluss, wie auch die erhöhte lokale Sauerstoffsättigung tragen laut Literatur zu einer beschleunigten Wundheilung bei.[16] Eine beschleunigte Wundheilung ist im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht zu verzeichnen gewesen. D.h. es konnte zunächst eine Immunantwort auf Grund der entstandenen Wunde mit Hilfe der HSI beobachtet werden, welche jedoch nicht durch KAP weiter moduliert werden konnte.

Auch die OCT zeigt deutliche Unterschiede zwischen den gesunden und den kranken Tieren. So ist v.a. zu den Zeitpunkten t1 (maximale Ausprägung der Radiodermatitis) und t2 (halbierter *Score* der Radiodermatitis) der mittlere Grauwert der oberen Hautschicht der kranken Tiere stark reduziert im Vergleich zu den gesunden Tieren, während der mittlere Grauwert der tieferen Hautschichten bei den kranken Tieren im Vergleich zu den gesunden Tieren erhöht ist.

Der Verlust von Hornhaut ist ein typisches Merkmal einer feuchten Abschuppung und könnte somit ausschlaggebend für unterschiedliche Grauwerte zwischen gesunden und erkrankten Tieren sein.[89] Die histologischen Befunde zeigen jedoch eher eine Verdickung der Hornschicht, sodass Lichtstrahlen weniger gut in die Haut eindringen können. Laut Singh et al. 2016 treten Strahlenschäden zudem generell vermehrt in

tieferen Hautschichten auf, was das Auftreten der eosinophilen Granulozyten in der *Stratum granulosum* erklären könnte.[90]
Dies ist auch eine mögliche Erklärung für den erhöhten Grauwertanteil der kranken Tiere in tieferen Hautschichten.
Auffällig sind auch Unterschiede zwischen den kranken und gesunden Tieren, die auch teilweise zu dem Zeitpunkt t3, zu welchem makroskopisch keine Auffälligkeiten mehr bei den Tieren wahrnehmbar waren, ersichtlich wurden. Dies spricht dafür, dass obwohl die Wunde optisch geheilt zu sein scheint, in dem Gewebe immer noch eine Reaktion stattfindet. Diese Beobachtung wurde u.a. bereits von Ruocco et al. beschrieben, mit der Erklärung, dass eine entstehende Immunsuppression auf eine Dysfunktion der Immunregulation zurückzuführen sei. So kann es durch ionisierende Strahlung zu einer Reduktion von T-Zelluntergruppen (z.B. $CD8^+$-Gedächtniszellen) kommen, sowie zur Zerstörung von strahlenempfindlichen T-Lymphozyten-Vorläufern und Langerhans-Zellen. Darüber hinaus kann ebenfalls die Biologie von Keratinozyten verändert werden. Somit kann ionisierende Strahlung die Funktion dieser Zellen verändern und entsprechend das Immunsystem des Gewebes dadurch stören, sodass selbst nach makroskopischer bzw. klinischer Heilung das Immunsystem an betreffenden Stellen dauerhaft gestört sein kann.[89]
Diese detektierten Unterschiede verdeutlichen auch, dass diese Methoden zur Erfassung einer Radiodermatitis durchaus geeignet sind. Allerdings sind die auftretenden Symptome und damit einhergehenden Änderungen im Gewebe eventuell auch bei anderen Entzündungen feststellbar und somit nicht pathognomonisch für eine Radioderamtitis.[89] Eine nichtinvasive Verlaufskontrolle der Radiodermatitis scheint mit diesen Methoden aber grundlegend möglich zu sein. Die Entzündungsreaktion kann sensitiver als mit einer makroskopischen Beurteilung der Tiere verfolgt werden, da die Methoden mehr Informationen liefern, als eine reine optische Kontrolle. Zudem stellt eine Kontrolle mit diesen Verfahren keine große Belastung (z.B. in Form von Schmerzen) für Patienten dar und die Durchführung ist ohne großen Aufwand möglich, was gerade im Klinikalltag durchaus vorteilhaft ist.
Im Gegensatz dazu, zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede in den beschriebenen Methoden zwischen KAP-behandelten und KAP-unbehandelten Tieren. Dies gilt sowohl für die gesunde als auch die kranke Gruppe. Lediglich zu t3 zeigte sich in der OCT-Messung der oberen Hautschicht ein leicht signifikanter Unterschied zwischen den kranken KAP-behandelten und –unbehandelten Tieren, mit

einem nach wie vor erhöhtem Grauwertanteil der KAP-unbehandelten Tiere. Dies könnte für eine verzögerte Heilung unter KAP sprechen. Da die OCT Messung jedoch sehr anfällig für verfälschte Ergebnisse bei unebenen Flächen zu sein scheint und darüber hinaus zu keinem anderen Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen KAP-behandelten und –unbehandelten Tieren festgestellt wurden, kann an dieser Stelle nicht von einem Einfluss von KAP auf die Wundheilung bei einer Radiodermatitis ausgegangen werden. Demnach scheint KAP keine Auswirkungen auf die Heilung einer Radiodermatitis zu haben. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in dem Unterschied zwischen akuten und chronischen Wunden zu finden sein. Bei Auftreten einer Wunde wird normalerweise eine Reaktion des Körpers ausgelöst, um die Wunde wieder zu schließen. Diese läuft in verschiedenen Phasen ab, der Exsudationsphase, der Granulationsphase und der Epithelisierungsphase.[67,68] Chronische Wunden weisen oft einen Defekt auf, der einen Wundverschluss verhindern kann, sodass bereits die Granulationsphase nicht richtig abläuft. Dies kann z.B. durch Mikroorganismen hervorgerufen werden. Eine antimikrobielle Wirkung konnte für KAP bereits nachgewiesen werden.[91,92] Chronische Wunden wie z.B. Diabetesbeine können daher mit KAP effektiv behandelt werden, da diese unter anderem durch bakterielle Infektionen, welche den Wundverschluss verhindern, entstehen.[47] KAP ist in der Lage Bakterien und andere Mikroorganismen effektiv zu töten, sogar multiresistente Keime und auch Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) können mit KAP getötet werden. Bei einer Radiodermatitis handelt es sich um eine akute Wunde, die bei gesunden Menschen durch den Körper wieder behandelt und geheilt werden kann. Dementsprechend ist die Wundheilung unter Normalbedingungen (gesunder Zustand) voll funktionsfähig und wird aktiviert, sobald eine Wunde registriert wird. In dem Fall wird die Wunde möglichst effektiv vom Körper versorgt. Durch KAP wird zwar die Durchblutung erhöht, was zu einer Förderung der Wundheilung führen kann, jedoch ist die Durchblutung bei gesunden Lebewesen, die eine akute Wunde erfahren, durch den Prozess der Wundheilung von vornherein erhöht. KAP scheint diesen Prozess der Wundheilung also nicht weiter anregen zu können, sodass eine Steigerung der Effektivität der Wundheilung bei bereits funktionierender Wundheilung nicht erreicht werden kann. Dies suggeriert, dass die Art der Wunde (akut oder chronisch) für eine effektive KAP-Behandlung ausschlaggebend sein könnte.

Aufällig ist, dass die Wundheilung in dem Modell dieser Arbeit deutlich schneller ablief, als bei anderen Modellen, sodass möglicherweise eine noch schnellere Heilung durch KAP nicht erreicht werden konnte.

Ein großer Unterschied zwischen der Haut von Mensch und Maus ist, dass Mäuse mit unter 25 µm eine dünnere Haut als Menschen (50-120 µm) haben.[93,94] Jedoch ist nicht anzunehmen, dass dies einen Einfluss auf die Effektivität von KAP auf die Wundheilung bei einer Radiodermatitis hat. Männliche Mäuse haben in der Regel eine 40 % dickere Dermis als Weibchen[95], allerdings gab es zwischen Männchen und Weibchen keine auffälligen Unterschiede in dem Verlauf der Radiodermatitis von KAP-behandelten Tieren.

Ein weiterer Grund, warum die KAP-Behandlung in dieser Arbeit keinen positiven Einfluss auf die Wundheilung zeigte, könnte sein, dass zu spät mit der Behandlung begonnen wurde. Anstatt erst zum Zeitpunkt der maximalen Ausprägung der Radiodermatitis mit der Behandlung zu beginnen, wäre eine prophylaktische Behandlung schon vor Bestrahlung oder mit Beginn der Bestrahlung möglicherweise der bessere Ansatz gewesen. Es zeigten sich diesbezüglich vielversprechende Ergebnisse bei Patienten mit Brustkrebs, bei denen eine zur Strahlentherapie simultane KAP-Behandlung das Auftreten einer Radiodermatitis verzögern und in deren Ausprägung abschwächen konnte.[55]

Der genaue Wirkmechanismus von KAP ist zwar noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch wird nach gegenwärtigem Verständnis davon ausgegangen, dass v.a. die RONS eine große Rolle in der Wirkung von KAP spielen. In dieser Arbeit wurde das Arbeitsgas Argon verwendet. Andere Arbeitsgruppen verwenden auch Helium als Arbeitsgas oder in seltenen Fällen einfach die Umgebungsluft. Ein Überblick der verschiedenen Geräte und des jeweils verwendeten Arbeitsgases in diversen klinischen Studien ist von Boeckmann et al. 2020 zusammengetragen worden.[96] Dies verdeutlicht nicht nur die Unterschiede der verschiedenen Kaltplasmaquellen, sondern auch, dass eine Vergleichbarkeit dieser Geräte nicht immer ohne Weiteres möglich ist. Ein anderes Arbeitsgas wird auch einen Einfluss auf das Spektrum der RONS haben. Weiterhin ist auch das Zuführen von Wasser geeignet, um die Bildung von RONS zu beeinflussen. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Feuchtigkeit des Arbeitsgases (oder auch der Umgebung) einen direkten Einfluss auf die Entstehung und Zusammensetzung der RONS hat.[97] Möglichwerweise könnte mit anderen KAP-Quellen oder durch Verwendung eines anderen Arbeitsgases auf Grund einer anderen

Zusammensetzung der RONS in dem Plasma eine beschleunigte Wundheilung erzielt werden.

Die konfokale Laserscanmikroskopie (KLSM) muss an dieser Stelle gesondert betrachtet werden. Die Aufnahmen lassen die Zellschicht gesunder Tiere und mutmaßlich Keratinozytenstrukturen erkennen, wobei aber kaum ein Unterschied zu den kranken Tieren erkennbar war. Durch die Wunde der kranken Tiere und die damit einhergehende, durch z.B. Schorf bedingte, unebene Hautoberfläche wurde der Prozess des Mikroskopierens erschwert, da ein direkter Kontakt der Schutzkappe und Haut erforderlich ist. Weiterhin erschwerend war, dass die Software die Tiefenangabe nicht angezeigt hat. Diese wäre zwar auch nur ein relativer Wert gewesen, hätte jedoch zur Orientierung beitragen können. Die konfokale Laserscanmikroskopie wird vorrangig in der Augenheilkunde verwendet und ermöglicht einen Blick hinter das Auge. Die Methode ist grundlegend geeignet um auch Gewebeschichten zu analysieren, konnte im Rahmen dieser Arbeit aber nicht ausgewertet werden, auf Grund fehlender Vergleichbarkeit. Es lässt sich demnach anhand der durchgeführten Versuche nicht eindeutig klären, ob die Methode grundlegend zur Detektion einer Radiodermatitis geeignet ist. Für die nichtinvasive Verlaufskontrolle bei einer Radiodermatitis ist die Methode jedoch auf Grund des direkten Kontakts zwischen Gerät und Wunde eher ungünstig. Vorteilhaft wäre jedoch das Erstellen von Z-Stapeln mit Hilfe derer die Verlaufskontrolle auf verschiedene Ebenen im Gewebe ausgeweitet werden könnte. Manche Aufnahmen von kranken Tieren (unabhängig der Gruppe) zeigten einen verkleinerten Interzellularspalt im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren, was ein Hinweis auf eine Entzündung sein könnte. Die Gruppe um Meinke et al. konnten mit Hilfe der konfokalen Laserscanmikroskopie eine Vergrößerung des interzellularen Spalts zwischen Keratinozyten bei Haut mit atopischen Ekzemen, also einer chronischen Entzündung der Haut, zeigen. Eine gesunde Haut zeigt sich v.a. durch eine intakte *Stratum corneum* und *Stratum granulosum*, sodass eine Veränderung dieser auf ein Problem mit der Haut hindeutet.[98] Neben den veränderten Interzellularräumen wurden keine Auffälligkeiten detektiert, ein Hinweis auf eine Entzündungsreaktion ist jedoch ersichtlich. Da eine reine Entzündungsreaktion mit Hilfe der KLSM aber gut nachgewiesen werden kann, könnte auch diese Methode grundlegend für die Erkennung einer Radiodermatitis geeignet sein, bedürfte jedoch weiterer Untersuchungen. Eine genaue Tiefenangabe wäre hilfreich, unter anderem um die Dicke der Epidermisschichten vergleichen zu

können. Die *Stratum spinosum* z.B. konnte von Meinke et al. als vergrößert beobachtet werden, sodass dies zu einer dickeren Epidermis bei Haut mit atopischen Ekzemen führt.[98] Solche Unterschiede konnten im Zusammenhang mit der Radiodermatitis zunächst nicht beobachtet werden, jedoch ist nicht gänzlich auszuschließen, dass dies auch an der mangelnden Durchführung bzw. den fehlenden Angaben in der Software liegen kann. Die Verdickung der Epidermis konnte an anderer Stelle durchaus nachgewiesen werden (Abschnitt 3.4.5.), war jedoch schwer in den KLSM-Bildern zu identifizieren. Dies verdeutlicht v.a. im Vergleich zu Meinke et al. 2015, dass die Aufnahmen mit dem KLSM durchaus Entzündungsreaktionen erkennen lassen, jedoch ist eine konkrete Aussage über die Ursache der Entzündung auf diese Weise nicht möglich.

Die Analyse der Gewebeproben zeigten Auffälligkeiten der bestrahlten rechten Hinterbeine im Vergleich zu den gesunden linken Hinterbeinen und zu den unbestrahlten Kontrolltieren. Die Verdickung der Epidermis, *Stratum corneum* und *Stratum granulosum*, sowie das vermehrte Auftreten eosinophiler Granulozyten sind klare Anzeichen einer Entzündung. Dies bestätigt somit die erfolgreiche Induktion einer Radiodermatitis mittels γ-Strahlung. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Zellinfiltrate mit Abklingen der Radiodermatitis dichter an die Epidmeris wandern. Bei der auf Grund der Entzündung entstehenden Immunantwort, sammeln sich vermehrt Leukozyten (weiße Blutkörperchen) im Gewebe an, welche Krankheitserreger beseitigen sollen. Daher ist es nicht ungewöhnlich bei einer Entzündung Zellinfiltrate nahe der Epidermis zu sehen, da diese durch die Epidermis die Krankheitserreger ausscheiden wollen. Somit ist auch diese Erscheinung ein klarer Hinweis auf eine Entzündung. Das Auftreten einer Immunantwort bei einer Radiodermatitis wurde auch von Maeng et al. beschrieben und ist auf die Schädigung der Epidermis (Inflammation und Erythem) als Auslöser für die Immunantwort zurückzuführen.[83]

Hier ist jedoch zu bedenken, dass histologische Befunde nicht pathognomonisch für eine Radiodermatitis sind, da das histologische Erscheinungsbild von der Ausprägung und Verletzungsphase der Radiodermatitis abhängt. So sind anfänglich die Hauptsymptome einer Radiodermatitis Ödeme, Degeneration der Basalzellschicht und eine Entzündungsreaktion (bedingt durch fortschreitende Kernpyknose), während z.B. bei einer trocknen Desquamation auch Hyperkeratosen beobachtet werden können. Die feuchte Desquamation bringt wiederum auch einen Hornhautverlust und die Bildung von intraepidermalen Blasen mit sich.[89] Beim Vergleich zwischen

histologischen Befunden von Ruocco et al. und den Befunden dieser Arbeit, zeigen sich bezüglich der Entzündungsreaktion deutliche Gemeinsamkeiten.[89]

5. Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erfolgreich ein Mausmodell für die Radiodermatitis durch Bestrahlung mit einem Caesium^{137}-Gammastrahler etabliert werden. Im Vergleich zu anderen Maus- oder Rattenmodellen für die Radiodermatitis verheilen die Wunden sehr schnell, sodass nach etwa drei Wochen makroskopisch keine Symptome mehr sichtbar sind.

Durch tägliche Behandlung mit einer Argon-Jet-Plasma-Quelle ab dem Zeitpunkt der maximalen Ausprägung der Radiodermatitis, konnte die Wundheilung in diesem Modell mit dem hier verwendeten Behandlungsschema nicht zusätzlich beschleunigt werden.

Die Verwendung verschiedener bildgebender Verfahren für die nichtinvasive objektive Verlaufskontrolle einer Radiodermatitis zeigte, dass v.a. die hyperspektrale Bildgebung und hier insbesondere die Messung des Gewebe-Hämoglobin-Indexes (THI) zu diesem Zweck gut geeignet ist. Mit diesem Verfahren werden auch noch Unterschiede zwischen gesundem Gewebe und Gewebe mit makroskopisch komplett ausgeheilter Radiodermatitis gemessen.

Mittels optischer Kohärenztomographie (OCT) konnte ebenfalls zwischen gesunden und erkrankten Geweben unterschieden werden, sodass auch diese Methode grundsätzlich für die Verlaufskontrolle einer Radiodermatitis geeignet sein könnte. Durch die relativ starke Varianz in der Qualität der Aufnahmen, unter anderem bedingt durch die unebene Oberfläche der Gewebe und die recht aufwendige Durchführung und Auswertung, ist das hier verwendete OCT-Gerät weniger gut für die objektive Verlaufskontrolle einer Radiodermatitis geeignet.

Die Eignung der Laserscanmikroskopie für die nichtinvasive objektive Verlaufskontrolle konnte nicht abschließend untersucht und beurteilt werden, da das verwendete Gerät keine Informationen zur Tiefenebene der Aufnahmen liefert und somit ein Vergleich der Aufnahmen von verschiedenen Tieren nicht sinnvoll war.

6. Zusammenfassung

Der Großteil aller Krebspatienten die eine Strahlentherapie erhalten, entwickeln auch eine Radiodermatitis, welche bedingt durch Schmerzen und starkem Juckreiz einen hohen Verlust der Lebensqualität mit sich bringt und bis zum Abbruch oder zu einer Unterbrechung der Strahlentherapie führen kann.

Kaltes Atmosphärendruckplasma (KAP), ein teilweise ionisiertes Gas, stellt durch seine antiseptischen, antiinflammatorischen und durchblutungsfördernden Effekte eine innovative Therapieoption mit einem breiten Anwendungsspektrum dar.

In dieser Arbeit sollte zunächst ein Nacktmausmodell für die Radiodermatitis etabliert und anschließend die Behandlung der Radiodermatitis mit KAP untersucht werden. Des Weiteren sollten bildgebende Verfahren, wie die hyperspektrale Bildgebung, die optischen Kohärenztomographie und die konfokale Laserscanmikroskopie, auf ihre Eignung für eine nichtinvasive Verlaufskontrolle untersucht werden.

Es konnte erfolgreich ein Mausmodell für die Radiodermatitis durch Bestrahlung mit einem Caesium^{137}-Gammastrahler etabliert werden. Durch tägliche Behandlung ab dem Zeitpunkt der maximalen Ausprägung der Radiodermatitis mit einer Argon-Jet-Plasma-Quelle konnte die Wundheilung in diesem Modell mit dem hier verwendeten Behandlungsschema nicht zusätzlich beschleunigt werden. Der makroskopisch beurteilte Heilungsprozess ab dem Ende der Bestrahlung dauerte bei den KAP-behandelten Tieren genauso wie bei den KAP-unbehandelten Kontrolltieren etwa drei Wochen.

Durch die bildgebenden Verfahren konnten signifikante Unterschiede zwischen den gamma-bestrahlten und nicht-bestrahlten Tieren gemessen werden. V.a. die hyperspektrale Bildgebung und die optische Kohärenztomographie zeigten signifikante Unterschiede zwischen erkrankten und gesunden Tieren. Diese Unterschiede waren teilweise (wenn auch geringfügiger und nicht immer signifikant) noch erkennbar, als die Tiere makroskopisch wieder gesund schienen und verdeutlichen somit eine höhere Sensitivität (v.a. bei der hyperspektralen Bildgebung) im Vergleich zu dem makroskopischen *Scoring*. Eine abschließende Beurteilung der Laserscanmikroskopie war auf Grund technischer Limitierungen des verwendeten Geräts nicht möglich. Abschließend bleibt festzuhalten, dass insbesondere die hyperspektrale Bildgebung, aber auch die optische Kohärenztomographie geeignete Verfahren für eine objektive nichtinvasive Verlaufskontrolle der Radiodermatitis

darstellen. Unterschiede zwischen den KAP-behandelten und KAP-unbehandelten Tieren konnten auch mit den bildgebenden Verfahren nicht gemessen werden.

7. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Thoralf Bernhardt, die Arbeit mit dem Thema „Untersuchung von kaltem Atmosphärendruckplasma als innovative Therapie zur Behandlung einer Radiodermatitis in einem Nacktmausmodell“ selbstständig und unter Angabe aller Quellen und Hilfsmittel verfasst zu haben.

Die Stellen, die dem Wortlaut oder Sinn nach aus anderen Quellen übernommen wurden, habe ich in jedem Fall unter Angabe der entsprechenden Quelle kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

_____

Ort, Datum

_____

Unterschrift

8. Literaturverzeichnis

1. Ruysscher, D. de *et al.* Radiotherapy toxicity. *Nature reviews. Disease primers* **5,** 13; 10.1038/s41572-019-0064-5 (2019).
2. McLean, A. S. Early adverse effects of radiation. *British medical bulletin* **29,** 69–73; 10.1093/oxfordjournals.bmb.a070960 (1973).
3. Zasadziński, K., Spałek, M. J. & Rutkowski, P. Modern Dressings in Prevention and Therapy of Acute and Chronic Radiation Dermatitis-A Literature Review. *Pharmaceutics* **14**; 10.3390/pharmaceutics14061204 (2022).
4. Cipollaro, V. A. Radiation dermatitis today. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **15,** 300–301; 10.1046/j.0926-9959.2001.00151.x (2001).
5. Wollina1, U., Christen2, N., Kostler1, E. & Schorcht2, J. Zur Prophylaxe und Therapie der Radiodermatitis und Radiomucositis. On prophylaxis and treatment of radition-induced dermatitis and mucositis. *H&G Zeitschrift Hautkrankheiten* **77,** 418–423; 10.1046/j.1439-0353.2002.02103.x (2002).
6. Seité, S., Bensadoun, R.-J. & Mazer, J.-M. Prevention and treatment of acute and chronic radiodermatitis. *Breast cancer (Dove Medical Press)* **9,** 551–557; 10.2147/BCTT.S149752 (2017).
7. Hecht, M. *et al.* Radiosensitization by BRAF inhibitor therapy-mechanism and frequency of toxicity in melanoma patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **26,** 1238–1244; 10.1093/annonc/mdv139 (2015).
8. Goldschmidt, H. & Sherwin, W. K. Reactions to ionizing radiation. *Journal of the American Academy of Dermatology* **3,** 551–579; 10.1016/S0190-9622(80)80067-3 (1980).
9. Hymes, S. R., Strom, E. A. & Fife, C. Radiation dermatitis: clinical presentation, pathophysiology, and treatment 2006. *Journal of the American Academy of Dermatology* **54,** 28–46; 10.1016/j.jaad.2005.08.054 (2006).
10. Schmuth, M. *et al.* Permeability barrier function of skin exposed to ionizing radiation. *Archives of dermatology* **137,** 1019–1023 (2001).
11. Rezvani, M., Ross, G. A., Wilkinson, J. H. & Bywaters, A. Evidence for humoral effects on the radiation response of rat foot skin. *The British journal of radiology* **75,** 50–55; 10.1259/bjr.75.889.750050 (2002).
12. Camidge, R. & Price, A. Characterizing the phenomenon of radiation recall dermatitis. *Radiotherapy and Oncology* **59,** 237–245; 10.1016/s0167-8140(01)00328-0 (2001).
13. Hegedus, F., Mathew, L. M. & Schwartz, R. A. Radiation dermatitis: an overview. *International journal of dermatology* **56,** 909–914; 10.1111/ijd.13371 (2017).
14. Schratter-Sehn, A. U., Brinda, K., Kahrer, M. & Novak, M. Improvement of skin care during radiotherapy. *Onkologie* **24,** 44–46; 10.1159/000050281 (2001).

15. Wolf, R. A. *Atmospheric Pressure Plasma for Surface Modification.* 1st ed. (John Wiley & Sons, New York, NY, 2012).
16. Gan, L. *et al.* Medical applications of nonthermal atmospheric pressure plasma in dermatology. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* **16,** 7–13; 10.1111/ddg.13373 (2018).
17. Gerling, T. & Weltmann, K. D. Einführung in Atmosphärendruck-Plasmaquellen für plasmamedizinische Anwendungen. In *Plasmamedizin,* edited by H.-R. Metelmann, T. von Woedtke & K.-D. Weltmann (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2016), pp. 3–15.
18. Keidar, M. *et al.* Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *British journal of cancer* **105,** 1295–1301; 10.1038/bjc.2011.386 (2011).
19. Emmert, S. *et al.* Atmospheric pressure plasma in dermatology: Ulcus treatment and much more. *Clinical Plasma Medicine* **1,** 24–29 (2013).
20. Heinlin, J. *et al.* Plasma medicine: possible applications in dermatology. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* **8,** 968–976; 10.1111/j.1610-0387.2010.07495.x (2010).
21. Heinlin, J. *et al.* Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* **25,** 1–11; 10.1111/j.1468-3083.2010.03702.x (2011).
22. Daeschlein, G. *et al.* Antibacterial Activity of an Atmospheric Pressure Plasma Jet Against Relevant Wound Pathogens in vitro on a Simulated Wound Environment. *Plasma Processes and Polymers* **7,** 224–230 (2010).
23. Privat-Maldonado, A. *et al.* ROS from Physical Plasmas: Redox Chemistry for Biomedical Therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2019,** 9062098; 10.1155/2019/9062098 (2019).
24. Gelbrich, N., Stope, M. B. & Burchardt, M. Kaltes atmosphärisches Plasma für die urologische Tumortherapie. *Der Urologe. Ausg. A* **58,** 673–679; 10.1007/s00120-018-0754-8 (2019).
25. Bekeschus, S. *et al.* Hydrogen peroxide: A central player in physical plasma-induced oxidative stress in human blood cells. *Free radical research* **48,** 542–549; 10.3109/10715762.2014.892937 (2014).
26. Mertens, N. & Goppold, A., Emmert, S. und Vioel, W. *Dielectric barrier discharge plasma-a powerful tool for medical applications.* (20th International Conference of the Society for Medical Innovation and Technology (SMIT), Vienna, Austria, 2008).
27. Heinlin, J. *et al.* A randomized two-sided placebo-controlled study on the efficacy and safety of atmospheric non-thermal argon plasma for pruritus. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* **27,** 324–331; 10.1111/j.1468-3083.2011.04395.x (2013).

28. Isbary, G. *et al.* Cold atmospheric plasma for local infection control and subsequent pain reduction in a patient with chronic post-operative ear infection. *New microbes and new infections* **1,** 41–43; 10.1002/2052-2975.19 (2013).
29. Daeschlein, G. *et al.* In Vitro Susceptibility of Important Skin and Wound Pathogens Against Low Temperature Atmospheric Pressure Plasma Jet (APPJ) and Dielectric Barrier Discharge Plasma (DBD). *Plasma Processes and Polymers* **9,** 380–389 (2012).
30. Daeschlein, G. *et al.* In Vitro Killing of Clinical Fungal Strains by Low-Temperature Atmospheric-Pressure Plasma Jet. *IEEE Transactions on Plasma Science* **39,** 815–821 (2011).
31. Xiong, Z., Roe, J., Grammer, T. C. & Graves, D. B. Plasma Treatment of Onychomycosis. *Plasma Processes and Polymers* **13,** 588–597 (2016).
32. Lipner, S. R., Friedman, G. & Scher, R. K. Pilot study to evaluate a plasma device for the treatment of onychomycosis. *Clinical and experimental dermatology* **42,** 295–298; 10.1111/ced.12973 (2017).
33. Isbary, G. *et al.* Randomized placebo-controlled clinical trial showed cold atmospheric argon plasma relieved acute pain and accelerated healing in herpes zoster. *Clinical Plasma Medicine* **2,** 50–55; 10.1016/j.cpme.2014.07.001 (2014).
34. Fridman, G. *et al.* Blood Coagulation and Living Tissue Sterilization by Floating-Electrode Dielectric Barrier Discharge in Air. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* **26,** 425–442 (2006).
35. Chutsirimongkol, C., Boonyawan, D., Polnikorn, N., Techawatthanawisan, W. & Kundilokchai, T. Non-Thermal Plasma for Acne Treatment and Aesthetic Skin Improvement. *Plasma Medicine* **4,** 79–88 (2014).
36. Daeschlein, G. *et al.* Comparison between cold plasma, electrochemotherapy and combined therapy in a melanoma mouse model. *Experimental dermatology* **22,** 582–586; 10.1111/exd.12201 (2013).
37. Mashayekh, S., Rajaee, H., Akhlaghi, M., Shokri, B. & Hassan, Z. M. Atmospheric-pressure plasma jet characterization and applications on melanoma cancer Treatment (B/16-F10). *Physics of Plasmas* **22,** 093508-1 - 093508-8 (2015).
38. Metelmann, H.-R. *et al.* Clinical experience with cold plasma in the treatment of locally advanced head and neck cancer. *Clinical Plasma Medicine* **9,** 6–13 (2018).
39. Walk, R. M. *et al.* Cold atmospheric plasma for the ablative treatment of neuroblastoma. *Journal of pediatric surgery* **48,** 67–73; 10.1016/j.jpedsurg.2012.10.020 (2013).
40. Vandamme, M. *et al.* ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. *International journal of cancer* **130,** 2185–2194; 10.1002/ijc.26252 (2012).
41. Hattori, N. *et al.* Effectiveness of plasma treatment on pancreatic cancer cells. *International journal of oncology* **47,** 1655–1662; 10.3892/ijo.2015.3149 (2015).

42. 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* **7,** e52653; 10.1371/journal.pone.0052653 (2012).
43. Mirpour, S. *et al.* Utilizing the micron sized non-thermal atmospheric pressure plasma inside the animal body for the tumor treatment application. *Scientific reports* **6,** 29048; 10.1038/srep29048 (2016).
44. Fridman, G. *et al.* Floating Electrode Dielectric Barrier Discharge Plasma in Air Promoting Apoptotic Behavior in Melanoma Skin Cancer Cell Lines. *Plasma Chemistry and Plasma Processes* **27,** 163–176 (2007).
45. Bernhardt, T. *et al.* Plasma Medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2019,** 3873928; 10.1155/2019/3873928 (2019).
46. Chuangsuwanich, A., Assadamongkol, T. & Boonyawan, D. The Healing Effect of Low-Temperature Atmospheric-Pressure Plasma in Pressure Ulcer: A Randomized Controlled Trial. *The international journal of lower extremity wounds* **15,** 313–319; 10.1177/1534734616665046 (2016).
47. Stratmann, B. *et al.* Effect of Cold Atmospheric Plasma Therapy vs Standard Therapy Placebo on Wound Healing in Patients With Diabetic Foot Ulcers: A Randomized Clinical Trial. *JAMA network open* **3,** e2010411; 10.1001/jamanetworkopen.2020.10411 (2020).
48. Mirpour, S. *et al.* Cold atmospheric plasma as an effective method to treat diabetic foot ulcers: A randomized clinical trial. *Scientific reports* **10,** 10440; 10.1038/s41598-020-67232-x (2020).
49. Isbary, G. *et al.* Successful and safe use of 2 min cold atmospheric argon plasma in chronic wounds: results of a randomized controlled trial. *The British journal of dermatology* **167,** 404–410; 10.1111/j.1365-2133.2012.10923.x (2012).
50. Isbary, G. *et al.* A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. *The British journal of dermatology* **163,** 78–82; 10.1111/j.1365-2133.2010.09744.x (2010).
51. Vandersee, S. *et al.* Laser scanning microscopy as a means to assess the augmentation of tissue repair by exposition of wounds to tissue tolerable plasma. *Laser Phys. Lett.* **11,** 115701; 10.1088/1612-2011/11/11/115701 (2014).
52. Metelmann, H.-R. *et al.* Scar formation of laser skin lesions after cold atmospheric pressure plasma (CAP) treatment: A clinical long term observation. *Clinical Plasma Medicine* **1,** 30–35; 10.1016/j.cpme.2012.12.001 (2013).
53. Heinlin, J. *et al.* Randomized placebo-controlled human pilot study of cold atmospheric argon plasma on skin graft donor sites. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **21,** 800–807; 10.1111/wrr.12078 (2013).

54. Schmidt, A., Bekeschus, S., Wende, K., Vollmar, B. & Woedtke, T. von. A cold plasma jet accelerates wound healing in a murine model of full-thickness skin wounds. *Experimental dermatology* **26,** 156–162; 10.1111/exd.13156 (2017).

55. Dejonckheere, C. S. *et al.* Non-Invasive Physical Plasma for Preventing Radiation Dermatitis in Breast Cancer: A First-In-Human Feasibility Study. *Pharmaceutics* **14**; 10.3390/pharmaceutics14091767 (2022).

56. Helmke, A. *et al.* The acidification of lipid film surfaces by non-thermal DBD at atmospheric pressure in air. *New Journal of Physics* **11** (2009).

57. Plasmamedizin, N. Z. f. Risikopotenzial und zu Anwendungsperspektiven von kaltem Atmosphrendruckplasma in der Medizin. Positionspaper des Nationalen Zentrums fr Plasmamedizin. *Plasmakurier* **1,** 43–52 (2014).

58. Fridman, G. *et al.* Applied Plasma Medicine. *Plasma Processes and Polymers* **5,** 503–533 (2008).

59. Helmke, A. *et al.* Physical and Microbiological Characterisation of Staphylococcus epidermidis Inactivation by Dielectric Barrier Discharge Plasma. *Plasma Processes and Polymers* **8,** 278–286 (2011).

60. Valacchi, G., Fortino, V. & Bocci, V. The dual action of ozone on the skin. *The British journal of dermatology* **153,** 1096–1100; 10.1111/j.1365-2133.2005.06939.x (2005).

61. Bekeschus, S., Kramer, A. & Schmidt, A. Gas Plasma-Augmented Wound Healing in Animal Models and Veterinary Medicine. *Molecules (Basel, Switzerland)* **26**; 10.3390/molecules26185682 (2021).

62. Haertel, B., Woedtke, T. von, Weltmann, K.-D. & Lindequist, U. Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing. *Biomolecules & therapeutics* **22,** 477–490; 10.4062/biomolther.2014.105 (2014).

63. Peters, B. (ed.). *Narbentherapie* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2017).

64. Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A. & Tymińska, A. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy dermatologii i alergologii* **30,** 30–41; 10.5114/pdia.2013.33376 (2013).

65. Schwarz, E. Biochemie der epidermalen Keratinisation Grundzüge der pathologischen Verhornung. In *Normale und Pathologische Physiologie der Haut II,* edited by R. Bauer*, et al.* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1979), pp. 1–115.

66. Klaschka, F. Arbeitsphysiologie der Hornschicht in Grundzügen. In *Normale und Pathologische Physiologie der Haut II,* edited by R. Bauer*, et al.* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1979), pp. 153–261.

67. Trainotti, S. & Scheithauer, M. Phasen, Störungen und Förderung der Wundheilung. *HNO* **65,** 777–788; 10.1007/s00106-017-0381-5 (2017).

68. Karrer, S. Topische Ulkustherapie. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* **56,** 1165-78; quiz 1179; 10.1007/s00105-005-1052-0 (2005).
69. Schmidt, A. *et al.* Non-thermal plasma activates human keratinocytes by stimulation of antioxidant and phase II pathways. *The Journal of biological chemistry* **290,** 6731–6750; 10.1074/jbc.M114.603555 (2015).
70. Bernhardt, T. *et al.* Induction of Radiodermatitis in Nude Mouse Model using Gamma Irradiator IBL 637. *Skin pharmacology and physiology*; 10.1159/000524596 (2022).
71. Moriyasu, S. *et al.* Involvement of histamine released from mast cells in acute radiation dermatitis in mice. *Journal of pharmacological sciences* **104,** 187–190; 10.1254/jphs.SC0070127 (2007).
72. Ertekin, M. V. *et al.* The effect of zinc sulphate in the prevention of radiation-induced dermatitis. *Journal of radiation research* **45,** 543–548; 10.1269/jrr.45.543 (2004).
73. Anna-Lena Ernst. Untersuchungen zur radioaktiven Belastung von Maronenröhrlingen (Imleria badia) und Steinpilzen (Boletus edulis) mit Cäsium-137. Doctoralthesis. Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg, 2021.
74. Holler, V. *et al.* Pravastatin limits radiation-induced vascular dysfunction in the skin. *The Journal of investigative dermatology* **129,** 1280–1291; 10.1038/jid.2008.360; (2009).
75. Diaspective Vision. Hyperspektrale Bildgebung: Aufnahme und Darstellung umfassender oder komplexer chemischer Gewebe-eigenschaften. Available at https://diaspective-vision.com/technologie/.
76. Bille, J. F. (ed.). *High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology: New Frontiers in Biomedical Optics* (Cham (CH), 2019).
77. Welzel, J. & Sattler, E. *Nichtinvasive physikalische Diagnostik in der Dermatologie* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2016).
78. Hofmann-Wellenhof, R., Pellacani, G., Malvehy, J. & Soyer, H. P. *Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2012).
79. Nehal, K. S., Gareau, D. & Rajadhyaksha, M. Skin imaging with reflectance confocal microscopy. *Seminars in cutaneous medicine and surgery* **27,** 37–43; 10.1016/j.sder.2008.01.006 (2008).
80. Astner, S. & Ulrich, M. Konfokale Laserscan-Mikroskopie. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* **61,** 421–428; 10.1007/s00105-009-1878-y (2010).
81. Cho, S.-K. & Kim, W.-D. Early diagnosis of radiodermatitis using lactate dehydrogenase isozymes in hairless mice (SKH1-hr). *Laboratory animal research* **28,** 239–244; 10.5625/lar.2012.28.4.239 (2012).

82. Chi, C. *et al.* Vitamin E-deficiency did not exacerbate partial skin reactions in mice locally irradiated with X-rays. *Journal of radiation research* **52,** 32–38; 10.1269/jrr.10042 (2011).

83. Maeng, H. G. *et al.* Altered immune cell proportions in the radiodermatitis induced hairless mice-1 (HR-1). *Journal of radiation research* **47,** 9–17; 10.1269/jrr.47.9. (2006).

84. Murakami, R. *et al.* The effect of azelastine on acute radiation dermatitis in mice models. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics* **37,** 907–911; 10.1016/s0360-3016(96)00621-9 (1997).

85. Fares, F. An Innovative Complex of Benzene-Poly-Carboxylic Acid and Molybdenum, for Prevention and Treatment of Radiation Dermatitis. *Med chem* **5**; 10.4172/2161-0444.1000299 (2015).

86. Henbest, N. & Marten, M. Röntgen- und Gammastrahlen-Astronomie. In *Die Neue Astronomie,* edited by N. Henbest & M. Marten (Birkhäuser Basel, Basel, 1984), pp. 192–205.

87. Arcand, K. & Watzke, M. *Licht. Mehr als wir sehen* (Edition Fackelträger, Köln, 2016).

88. Diday-Nolle, A. P. Ödem und Ödembehandlung. In *Handrehabilitation,* edited by A. P. Diday-Nolle, S. Breier, D. U. Slatosch Wintsch, A. Reiter Eigenheer & B. Waldner-Nilsson (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013), pp. 183–196.

89. Ruocco, E., Di Maio, R., Caccavale, S., Siano, M. & Lo Schiavo, A. Radiation dermatitis, burns, and recall phenomena: Meaningful instances of immunocompromised district. *Clinics in dermatology* **32,** 660–669; 10.1016/j.clindermatol.2014.04.014 (2014).

90. Singh, M., Alavi, A., Wong, R. & Akita, S. Radiodermatitis: A Review of Our Current Understanding. *American journal of clinical dermatology* **17,** 277–292; 10.1007/s40257-016-0186-4 (2016).

91. Daeschlein, G. *et al.* In Vitro Susceptibility of Multidrug Resistant Skin and Wound Pathogens Against Low Atmospheric Pressure Plasma Jet (APPJ) and Dielectric Barrier Discharge Plasma (DBD). *Plasma Processes and Polymers* **11,** 175–183 (2014).

92. Bourke, P., Ziuzina, D., Han, L., Cullen, P. J. & Gilmore, B. F. Microbiological interactions with cold plasma. *Journal of applied microbiology* **123,** 308–324; 10.1111/jam.13429 (2017).

93. Zomer, H. D. & Trentin, A. G. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *Journal of dermatological science* **90,** 3–12; 10.1016/j.jdermsci.2017.12.009 (2018).

94. Abdullahi, A., Amini-Nik, S. & Jeschke, M. G. Animal models in burn research. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **71,** 3241–3255; 10.1007/s00018-014-1612-5 (2014).

95. Wong, V. W., Sorkin, M., Glotzbach, J. P., Longaker, M. T. & Gurtner, G. C. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2011,** 969618; 10.1155/2011/969618 (2011).

96. Boeckmann, L. *et al.* Cold Atmospheric Pressure Plasma in Wound Healing and Cancer Treatment. *Applied Sciences* **10,** 6898; 10.3390/app10196898 (2020).

97. Winter, J. *et al.* Feed gas humidity: a vital parameter affecting a cold atmospheric-pressure plasma jet and plasma-treated human skin cells. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **46,** 295401; 10.1088/0022-3727/46/29/295401 (2013).

98. Meinke, M. C. *et al.* Characterization of atopic skin and the effect of a hyperforin-rich cream by laser scanning microscopy. *Journal of biomedical optics* **20,** 51013; 10.1117/1.JBO.20.5.051013 (2015).

9. Lebenslauf

Beruflicher Werdegang

Seit Juni 2023	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universitätsmedizin Rostock
Oktober 2021 – Mai 2023	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Universitätsmedizin Rostock
September 2018 – Oktober 2021	Promotion, Klinik für Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Universitätsmedizin Rostock
Oktober 2015 – November 2017	Studium Master of Science Mikrobiologie und Biochemie, Universität Rostock
Oktober 2012 – Juli 2015	Studium Bachelor of Science Biowissenschaften, Universität Rostock
Oktober 2009 – März 2012	Studium Bachelor of Science Chemie, Universität Rostock
August 2008 – April 2009	Zivildienst in der Pathologie, Universität Greifswald

Nebentätigkeiten

September 2016 – Dezember 2016	Studentische Hilfskraft in der Fakultät für Biowissenschaften, Abteilung Biochemie, Universität Rostock

Schulbildung

1999 - 2008	Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium Greifswald, Abschluss Abitur
1995 - 1999	Fritz-Reuter Grundschule Greifswald, Teilnahme am Schulversuch „Frühbeginnender Fremdsprachenunterricht“

Erweiterte Kenntnisse

Oktober 2018	Kurs: Drittmittelanträge (DFG) schreiben
Januar 2019	Kurs: Academic Writing in Natural Science
April 2019	FELASA B
Oktober 2019	Kurs: Projektmanagement für Akademiker
September 2019	Kurs: Gute wissenschaftliche Praxis

10. Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Steffen Emmert für die Möglichkeit dieses Thema bearbeiten zu dürfen, für die Unterstützung bei der Umsetzung des Themas und für den kompetenten Rat wann immer dieser notwendig war.
Herrn Dr. Lars Böckmann danke ich für die sehr gute Betreuung und Unterstützung bei der Umsetzung meines Themas, sowie für die zahlreichen und sehr hilfreichen Besprechungen und dafür, dass er sich immer Zeit genommen hat wenn ich einen guten Rat gebraucht habe.
Ich danke dem gesamten Team der Klinik für Dermatologie und Venerologie für die tolle Zusammenarbeit und für die unvergessliche Zeit, die ich dort erlebt habe. Dabei gilt mein Dank insbesondere Dr. Tobias Fischer für viele hilfreiche Gespräche bezüglich der Ethik von Tierversuchen und anderweitigen Fragen rund um das Thema Promotion, Frau Heike Seemann für das Anfertigen zahlreicher Kryoschnitte und histologischen Färbungen, sowie Herrn Dr. Rüdiger Panzer für die gemeinsame Auswertung der histologischen Färbungen und seinen kompetenten Rat hinsichtlich dieser Färbungen. Ohne diese Unterstützung hätte ich meine Arbeit nicht in dem Ausmaß durchführen können.
Ich danke außerdem Frau Prof. Dr. Vollmar für die Möglichkeit der experimentellen Umsetzung in dem Institut für experimentelle Chirurgie. Weiterhin gilt mein Dank Christin Schlie für die Hilfe bei der experimentellen Umsetzung v.a. in der Anfangszeit meiner Arbeit. Frau Karin Gerber danke ich für die Zucht und Bereitstellung der Versuchstiere und Mareike Degner und Ilona Klamfuß danke ich für die Einweisungen, zum einen für das Arbeiten in dem Institut für experimentelle Chirurgie und zum anderen für den Umgang mit Gerätschaften wie der Isoflurananlage.
Ich danke weiterhin Prof. Dr. Oliver Stachs aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde für das Bereitstellen der OCT und KLSM Geräte, für die Einweisung in diese Geräte und auch für den kompetenten Rat und die vielen hilfreichen Gespräche.
Der Firma Diaspective Vision mit dem Ansprechpartner Eric Beck danke ich für die Bereitstellung der Hyperspektralkamera und der Einführung in dieses Gerät.
Mein Dank gilt außerdem Prof. Dr. Guido Hildebrandt aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie für die Zusammenarbeit, sowie Frau PD Dr. Katrin Manda und Dr. Stephan Kriesen für die kompetente Beratung und Herstellung der

Strahlenschutzkammer. Herrn Dipl. Phys. Tobias Siebert † danke ich für die Einweisung in das Gammastrahlengerät und die Unterstützung bei den Dosimetrien.
Ich danke dem Team des INP Greifwald für die Bereitstellung des Plasmageräts.
Bei meiner Familie bedanke ich mich für die Unterstützung. Ohne meine Eltern hätte ich weder studieren, noch eine Promotion antreten können. Zudem standen mir meine Eltern und Geschwister jeder Zeit mit einem guten Rat oder einfach einem Ohr beiseite.
Auch meiner Lebensgefährtin Mirijam Schäfer danke ich für viele hilfreiche Gespräche und die Unterstützung in einer sehr schönen, aber manchmal auch sehr anstrengenden Zeit.
Zu guter Letzt danke ich der Damp – Stiftung für die Finanzierung des Projekts (Projektnummer: 2017-05).
Ohne all die Unterstützung hätte ich meine Arbeit nicht umsetzen können.

11. Anhang

Tabelle A1 Klinische Studien zur Wirkung von kaltem Atmosphärendruckplasma (KAP) auf die Wundheilung.

QUELLE	TIERE	STRAHLUNGSART	STRAHLENDOSIS (DOSISRATE)	BESTRAHLUNGS-ART	REGION	ERSTE SYMPTOME
81	SKH1-hr Mäuse	Röntgenstrahlung Mevatron 6700, Siemens, Germany	48 Gy (3 Gy/min)	4 aufeinanderfolgende Tage (12 Gy/d)	Posteriore, dorsale Region	24 Tage nach Bestrahlung
82	Haarlose Hos:HR-1 Mäuse	Röntgenstrahlung Generator (200 kV and 20 mA, Pantak HF-320, Shimadzu, Kyoto, Japan)	50 Gy (1,27 Gy/min)	Einzeldosis	rechtes Hinterbein	6 Tage nach Bestrahlung
84	C3H/He Mäuse	Röntgnstrahlung 230 kV	20, 40, 60 Gy (0,62 Gy/min)	Einzeldosis	rechtes Hinterbein	10 Tage nach Bestrahlung
85	BALB/cfC 3H Mäuse	Medical linear accelerator (ELEKTA AB, Stockholm, Schweden)	30 Gy (2,5 Gy/min))	5 Mal	rechtes Hinterbein	5 Wochen
83	HR-1 Mäuse	Röntgenstrahlung	40 Gy (4 Gy/min)	4 aufeinanderfolgende Tage (10 Gy/d)	Posteriore, dorsale Region	10 Tage nach erster Bestrahlung
72	C57BL/6 Mäuse	Gammastrahler (Cobalt-60)	40 Gy (1,94 Gy/min)	Einzeldosis	Hinterbein	10 Tage
73	Sprague-Dawley Ratten	Gammastrahler (Cobalt-60)	30 Gy (0,68 Gy/min)	Einzeldosis	rechtes Hinterbein	3 Tage
71	SKH1-hr Mäuse	Gammastrahler IBL637 (Cesium-137)	50-80 Gy (1,38 Gy/min)	5 aufeinanderfolgende Tage (10-16 Gy/d)	rechtes Hinterbein	2 Tage nach Bestrahlungszeit