Abschlussbericht zum Verbundprojekt Campus PlasmaMed



# Teilvorhaben Campus PlasmaMed 6 Förderkennzeichen 13N9779

Ausführende Stelle:	Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP Greifswald)
	Felix-Hausdorff-Str. 2 17489 Greifswald
Projektleiter:	Prof. Dr. Klaus-Dieter Weltmann



# Inhalt:

# Zusammenfassung

- I.1 Aufgabenstellung
- I.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde
- I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens
- I.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde
- I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen
- II.1 Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele
  - II.1.1 Leitthema PlasmaQuellen
  - II.1.2 Leitthema PlasmaPharm
  - II.1.3 Leitthema PlasmaSept
  - II.1.4 Leitthema Plasmalmp
  - II.1.5 Leitthema PlasmaOpt
  - II.1.6 Leitthema PlasmaLern
- II.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises
- II.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit
- II.4 Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit des Ergebnisses
  - II.4.1 Wirtschaftliche Erfolgsaussichten
  - II.4.2 Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten
  - II.4.3 Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit
- II.5 Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen
   II.6 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse



# Zusammenfassung:

Hauptziel des Campus PlasmaMed war eine Verstetigung bereits bestehender Kooperationen auf dem Gebiet der Forschung- und Entwicklung von indirekten und direkten Anwendungen von physikalischen Plasmen in der Medizin. Dabei sollten die vor allem an den Standorten Greifswald und Rostock, aber auch darüber hinaus vorhandenen Kompetenzen auf den Gebieten Plasmaphysik und Lebenswissenschaften, insbesondere Medizin gebündelt werden und vor allem Möglichkeiten der therapeutischen Anwendung von physikalischen Plasmen erforscht und in praktisch anwendbare Medizinprodukte und Verfahren überführt werden.

Das Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP Greifswald) nahm im gesamten Verbundprojekt Campus PlasmaMed eine zentrale Stellung ein, indem es federführend bei der Antragstellung und Berichterstattung war, die organisatorische und wissenschaftliche Koordination verantwortete und einen der beiden Sprecher stellte.

Die Steuerung des Vorhabens Campus PlasmaMed erfolgte nach thematisch-inhaltlichen Gesichtspunkten in den drei Themenfeldern Plasmamedizin, Plasmadekontamination und biokompatible Oberflächen. Innerhalb dieser Themenfelder wurden neun Leitthemen konzipiert, die den konzeptionellen und organisatorischen Rahmen für die Forschungsarbeit im Campus PlasmaMed bildeten. Das INP Greifswald hatte die wissenschaftliche Leitung der Leitthemen PlasmaQuellen, PlasmaSept, PlasmaPharm und PlasmaOpt inne und war weiterhin mit wissenschaftlichen Arbeiten in die Leitthemen PlasmaImp und PlasmaLern eingebunden.

Eine zentrale Stellung nahm dabei das Leitthema PlasmaQuellen mit den folgenden zentralen Aufgaben ein:

- Systematische Entwicklung und Optimierung von Plasmaquellen zur Testung und Anwendung im Campus PlasmaMed
- Umfassende Plasmadiagnostik zur detaillierten Charakterisierung und Interpretation chemischer, biologischer und medizinischer Plasmaeffekte

Im Laufe der Projektförderung wurden zehn verschiedene Plasmaquellen-Anforderungen konzipiert, charakterisiert, als Experimentalanlagen aufgebaut und den Verbundpartnern für Experimente zur Verfügung gestellt. Mit diesen Quellen wurde die Möglichkeit der effektiven Bekämpfung von Hautpilzen und Wundinfektionen mit Plasma experimentell nachgewiesen sowie durch erste Experimente bestätigt, dass der Einsatz von Plasma auch Wege zur Inaktivierung und Entfernung von ansonsten sehr schwer zugänglichen Biofilmen vor allem im Dentalbereich eröffnet.



Im Leitthema PlasmaSept konnten effektive und aussagekräftige, auf der Anwendung von Mikroorganismen und Zellkulturen basierende In-vitro-Testmodelle aufgebaut und zur Charakterisierung der biologischen Wirksamkeit von Plasmaquellen angewendet werden. Damit konnte u.a. erstmals ein regenerationsfördernder Effekt einer Plasmabehandlung unabhängig von einer antiseptischen Wirkung *in vitro* gezeigt werden.

Darüber hinaus wurden über Untersuchungen von Plasma-Flüssigkeits-Wechselwirkungen Erkenntnisse zur plasmavermittelten Generierung biologisch wirksamer chemischer Spezies gewonnen und Grundlagen geschaffen, zukünftig auch das Gebiet der Plasmapharmazie, d.h. der plasmavermittelten Herstellung, Optimierung und Stabilisierung wirkstoffhaltiger Flüssigkeiten zu erschließen.

Plasmalmp Im Rahmen des Leitthemas wurden u.a. aminofunktionalisierte Plasmapolymerschichten erzeugt, die über verstärkte zelladhäsive Wirkungen beispielsweise für ein beschleunigtes Einwachsen von metallischen Knochenimplantaten sorgen. Mittels Plasma-Ionen-Immersions-Implantationstechnik (PIII) gelang es, metallisches Kupfer in die Subsurface des Titans zu implementieren und eine anti-bakterielle Wirkung zu erzeugen. Allerdings verursacht Cu-PIII auf Titanoberflächen in der anti-bakteriell notwendigen Konzentration eine Einschränkung der Zellfunktion. Die zellbiologisch notwendige Balance zu finden - keine adverse Zellreaktion bei anti-bakterieller Wirkung der Cu-PIII-Oberflächen - erfordert weitere intensive Grundlagenforschung, die letztlich die Basis für die zukünftig anwendbaren Implantate darstellt.

Im Rahmen des Leitthemas PlasmaLern wurde unter Leitung des Institutes für Physik der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald das Konzept für einen Masterstudiengang (Master of Science) "Plasmatechnik" mit einem Vertiefungsfach "Plasmamedizin" entwickelt.

Das Leitthema PlasmaOpt war das einzige Forschungsthema im Campus PlasmaMed, in dem keine Atmosphärendruck-Plasmaquellen, sondern Plasmalampen genutzt wurden. Aufgrund dieser besonderen Stellung wurde auf Empfehlung des Projektträgers im Sinne einer Konzentration der Ressourcen des Campus PlasmaMed die Bearbeitung dieses Leitthemas in der zweiten Hälfte der Förderphase stark reduziert und die Möglichkeit der Einbindung in geeignete Projekte des Förderschwerpunktes "Optische Technologien" des BMBF geprüft.

Im Förderzeitraum konnte sich das INP Greifswald mit dem Campus PlasmaMed als Zentrum der plasmamedizinischen Forschung weltweit Anerkennung verschaffen. Ein Höhepunkt war die im September 2010 in Greifswald stattfindende "3<sup>rd</sup> International Conference on Plasma Medicine (ICPM-3)". Diese Konferenz war mit 184 Teilnehmern aus 24 Ländern die bis dahin größte ihrer Art. Auf dieser Konferenz wurde die Präsidentschaft



der "International Society for Plasma Medicine (ISPM)" bis 2012 an den Campus-Sprecher Prof. K.-D. Weltmann übertragen. Begleitet wurde diese Entwicklung durch eine Vielzahl eingeladener Vorträge auf nationalen und internationalen Konferenzen sowie eine gesteigerte Publikationstätigkeit vor allem im Jahre 2010. Aufgrund der im Campus PlasmaMed erzielten wissenschaftlichen Ergebnisse wurden die Voraussetzungen für eine zweite Förderphase geschaffen, in der die wirtschaftliche Verwertung der Forschungsergebnisse im Vordergrund der Arbeiten stehen soll.



# I.1 Aufgabenstellung

Der Campus PlasmaMed bündelt – ganz im Sinne der landespolitischen Strategie und der Konzepte der Hochschulen – weiträumig, organisationsübergreifend und themenorientiert die vor allem an den Standorten Greifswald und Rostock, aber auch darüber hinaus vorherrschenden Kompetenzen auf den Gebieten Plasmaphysik und Lebenswissenschaften, insbesondere Medizin.

Mit den drei thematischen Schwerpunkten **Plasmamedizin**, **Plasmadekontamination** und **Biofunktionale Oberflächen** (siehe I.3) wurden in der ursprünglichen Konzeption des Campus PlasmaMed hochinnovative Themenfelder mit bereits in Forschung und Anwendung etablierten Gebieten der Plasmatechnologie kombiniert, womit einerseits anwendungsorientierte Spitzenforschung, andererseits aber auch eine frühzeitige Überführung von Forschungsergebnissen in die Anwendung und damit die Nachhaltigkeit des Campus gewährleistet werden sollte. Damit wurde das lokal und regional existente Synergiepotential aktiviert und eine langfristige Perspektive für die innovative, strukturbildende Kooperation innerhalb der Wissenschaft und zwischen Wissenschaft und Wirtschaft eröffnet.

Ein bereits praktisch etabliertes großes Anwendungsfeld war die plasmagestützte Herstellung, Modifikation und Optimierung **biofunktionaler Oberflächen**, wobei im Campus PlasmaMed medizinische Implantate im Mittelpunkt des Interesses standen.

Auf dem Gebiet der **Plasmadekontamination**, d.h. der Entwicklung von plasmagestützten Sterilisations-, Dekontaminations- und Aufbereitungsverfahren bestand das Ziel in der Weiterverfolgung aktueller Forschungsergebnisse unter Einbeziehung von Industriepartnern bis zur Anwendungsreife, wobei der Schwerpunkt auf der Plasmabehandlung medizinisch bzw. pharmazeutisch relevanter Güter lag.

Wenn die beiden bisher angeführten Themenfelder den Einsatz von Plasmen im Vorfeld medizinischer Anwendungen beschreiben, so stellte demgegenüber die direkte therapeutische Plasmaanwendung als zentrales Feld der **Plasmamedizin** weitestgehend Neuland dar. Die Plasmamedizin entsteht gegenwärtig international als eigenständiges Fachgebiet mit dem Ziel, der breiten therapeutischen Anwendung von kalten Normaldruckplasmen zum Durchbruch zu verhelfen – vergleichbar mit der Entwicklung der Lasermedizin vor etwa 30 Jahren. Mit der Förderung der Forschung im Campus PlasmaMed sollte der starken Konkurrenz aus den Frankreich, den USA und dem asiatischen Raum adäquat begegnet werden, um die Entwicklung der Plasmamedizin von Beginn auch am Wissenschaftsstandort Deutschland strategisch entscheidend mit zu prägen. Gemeinsam mit der medizinischen Fakultät der Universität hat das INP Greifswald weltweit die erste



Professur für Plasmamedizin eingerichtet. Die Professur wird die Rolle des wissenschaftlichen Koordinators im Campus PlasmaMed einnehmen.

Hauptziel des Campus PlasmaMed war eine Verstetigung bereits bestehender Kooperationen auf dem Gebiet der Forschung- und Entwicklung von indirekten und direkten Anwendungen von physikalischen Plasmen in der Medizin. Dabei sollten vor allem Möglichkeiten der therapeutischen Anwendung von physikalischen Plasmen erforscht und in praktisch anwendbare Medizinprodukte und Verfahren überführt werden.

Das Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP Greifswald) nahm im gesamten Verbundprojekt Campus PlasmaMed eine zentrale Stellung ein, indem es federführend bei der Antragstellung und Berichterstattung war, die organisatorische und wissenschaftliche Koordination verantwortete und einen der beiden Sprecher stellte. Außerdem hatte das INP Greifswald die wissenschaftliche Leitung der Leitthemen PlasmaQuellen, PlasmaSept, PlasmaPharm und PlasmaOpt inne und war weiterhin mit wissenschaftlichen Arbeiten in die Leitthemen PlasmaImp und PlasmaLern eingebunden.

#### I.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die innovative, strukturbildende Kooperation zwischen verschiedenen Forschungseinrichtungen in der Region einerseits sowie zwischen Wissenschaft und Wirtschaft im Rahmen des Campus PlasmaMed baute auf bereits bestehenden Netzwerken auf.

Im Rahmen der BMBF-Initiative "Unternehmen Region" wurde im Februar 2006 ein Innovationsforum "PlasmaPlusBio" durchgeführt, das FuE-Einrichtungen und Unternehmen in Mecklenburg-Vorpommern der Biound Plasmatechnologie mit dem Ziel zusammenbrachte, interdisziplinär neue Märkte zu erschließen. Im Ergebnis dieses NEMO – Netzwerk "Plasma Innovationsforums wurde das plus Bio" (www. aufgebaut. Dieses Netzwerk konzentrierte sich vor allem auf die plasmaplusbio.de) Entkeimung und Anwendung antimikrobieller Schichten mittels plasmatechnologischer Verfahren. Die hier entwickelten Kompetenzen auf dem Gebiet der komplexen Behandlung, Diagnostik und Bewertung von Entkeimungs- und Sterilisationsproblemen im Bereich der Lebenswissenschaften sollten allem im vor Rahmen des Themenfeldes Plasmadekontamination fortgeführt werden.

Die seit Jahren bestehende intensive Kooperationen des INP Greifswald mit der Abteilung Zellbiologie der Universität Rostock auf dem Gebiet der plasmabasierten Oberflächenbehandlung von Implantaten stellten eine wesentlich Voraussetzung für die



anwendungsorientierten Forschungsarbeiten im Themenfeld Biofunktionale Oberflächen dar.

Aufgrund der Neuetablierung des sehr stark auf die klinische Anwendung von Plasmen fokussierten zentralen Themenfeldes Plasmamedizin stellte die Einbindung von klinischen Partnern sowie von regionalen Wirtschaftsunternehmen eine besonders anspruchsvolle Aufgabe dar. Mit dem im April 2008 erfolgreich verteidigten Konzept für ein im Rahmen der BMBF-Initiative "Unternehmen Region" am Standort Greifswald aufzubauendes Zentrum für Innovationskompetenz "plasmatis - Plasma plus Zelle" wurde eine wesentliche Voraussetzung für die Etablierung hochinnovativer Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Plasmamedizin geschaffen. Eine erste anwendungsorientierte Studie zum Thema "Plasmasept – ein plasmabasiertes Verfahren zur Wundheilung" im Sinne eines Schlüsselexperimentes wurde 2007/2008 in Kooperation mit dem Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald durchgeführt. Grundlage dafür war ein 4. Preis in der Kategorie Forscherteam im Rahmen des Ideenwettbewerbes "Venturesail 2007" des Landes Mecklenburg-Vorpommern. Weiterhin bestand seit 2007 eine bilaterale Vereinbarung zwischen dem INP Greifswald und der Klinik und Poliklinik für Greifswald Hautkrankheiten des Universitätsklinikums über erste gemeinsame Voruntersuchungen zur Thematik "Plasmajet zur Anwendung auf der Haut".

Diese Vorarbeiten bzw. begleitenden Initiativen bildeten die Grundlage für das Konzept des Campus PlasmaMed, Plasmatechnologie gezielt in das bisher kaum erschlossene Gebiet der Medizin und Medizintechnik zu transferieren. Durch die Einbeziehung klinischer Partner von Beginn an sollte die langfristige medizinische Akzeptanz gesichert werden. Für die praktisch-industrielle Umsetzung derartiger Produkte waren eigene Transfermechanismen zu etablieren. Auch hier konnte auf bereits bestehende Strukturen zurückgegriffen werden. Mit dem Projekt "Plasmatransfer MV" gehörte das INP Greifswald gemeinsam mit den Projektpartnern neoplas GmbH Greifswald, ATI Küste GmbH - Gesellschaft für Technologie und Innovation Stralsund, Technologiezentrum-Fördergesellschaft mbH Vorpommern Greifswald und RWI - Regionale Wirtschaftsinitiative Ost-Mecklenburg-Vorpommern zu den Siegern des Innovationswettbewerbs "Wirtschaft trifft Wissenschaft" des Bundesministeriums für Verkehr, Bau und Stadtentwicklung. Mit den in diesem Transferprojekt kooperierenden Partnern sowie durch die Einbeziehung der Fachhochschule Stralsund und der Hochschule Neubrandenburg sollte Transfers die professionelle Begleitung des von Forschungsergebnissen aus dem Campus PlasmaMed in die regionale wirtschaftliche Umsetzung gewährleistet werden.



Auf der Basis dieser Voraussetzungen wurde das Projekt unter den folgenden Kriterien durchgeführt:

- hohes wissenschaftliches Niveau mit internationalem Führungsanspruch
- großes Markteintrittspotenzial, hohe Umsatzerwartungen
- Anregung langfristiger Forschungskooperationen
- Erhöhung der Attraktivität des Forschungsstandortes (regionale Rahmenbedingungen)
- Nationale und internationale Sichtbarkeit der Initiative
- Nachhaltigkeit und Anschlussfähigkeit
- Profilschärfung der beteiligten Hochschulen
- Gewinnung und Halten hochkarätiger Wissenschaftler und anderer qualifizierter Fachkräfte
- Nachwuchsförderung und praxisnahe Qualifizierung
- überregionale, länderübergreifende Kooperationen, insbesondere Einbeziehung etablierter Institutionen mit gleichem Forschungsfokus aus den alten Ländern
- Ausrichtung auf internationale Wettbewerbsfähigkeit
- Beteiligungen von Unternehmen mit dem Ziel der Ergebnisverwertung
- länderseitige Unterstützungs- oder Strukturmaßnahmen

# I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Leitung des Campus PlasmaMed erfolgte durch die beiden gewählten Sprecher Prof. Dr. Klaus-Dieter Weltmann, INP Greifswald, und Prof. Dr. med. Axel Kramer, Klinikum der Universität Greifswald.

Die organisatorische und wissenschaftliche Koordination des Campus PlasmaMed lag beim INP Greifswald.

Die Steuerung des Vorhabens Campus PlasmaMed erfolgte nach thematisch-inhaltlichen Gesichtspunkten. Es wurden in der ursprünglichen Konzeption die drei Themenfelder Plasmamedizin, Plasmadekontamination und biokompatible Oberflächen definiert. Innerhalb dieser Themenfelder wurden neun Leitthemen konzipiert, die den konzeptionellen und organisatorischen Rahmen für die Forschungsarbeit im Campus PlasmaMed bildeten (Abb. 1).



Die Leitthemen wurden durch jeweils einen Themenverantwortlichen geleitet, der den Sprechern in einem monatlichen schriftlichen Statusbericht Rechenschaft über den Stand der Forschungsarbeiten ablegte.

Zur kontinuierlichen Sicherung der Anwendungsorientierung der Forschungsarbeiten im Campus PlasmaMed wurde ein Industriebeirat gebildet, der während der Projektlaufzeit drei Mal zusammenkam.

Die strategische Begleitung des Campus PlasmaMed erfolgte durch das malik management zentrum St. Gallen im Rahmen von fünf strategischen Workshops unter Einbeziehung des gesamten Campus PlasmaMed, durch Einzelworkshops in den Leitthemen sowie in Form einer kontinuierlichen Begleitung der Sprecher und Themenleiter über die gesamte Projektlaufzeit.



Abb. 1 Projektstruktur des Campus PlasmaMed

Die im Themenfeld **Plasmamedizin** eine zentrale Stellung einnehmende Konzeption und experimentell-klinische Erprobung von neuartigen plasmabasierten Verfahren und Medizinprodukten zur Behandlung von

o infizierten Wunden,



- o mit bakteriellen und Pilzinfektionen assoziierten Hauterkrankungen,
- o Zahnerkrankungen wie Parodontitits und Periimplantitis

barg ein erhebliches Innovationspotential und war zugleich mit den größten Risiken verbunden. Auf Grund der weltweit erst am Anfang stehenden Plasmamedizin als neues, sich entwickelndes medizinisches Anwendungsgebiet bestand hiermit jedoch die einmalige Chance, international eine Schlüsselposition einzunehmen und die Region damit attraktiv für die Neugründung und Ansiedelung von Firmen für die Herstellung und Vermarktung plasmamedizinischer Produkte und Verfahren zu machen.

Dem Themenfeld Plasmamedizin waren die Leitthemen PlasmaBiozid, PlasmaDent, PlasmaDerm, PlasmaWund, PlasmaSept und PlasmaOpt zugeordnet, wobei sich zum Teil inhaltliche Verbindungen zu den beiden anderen Themenfeldern ergaben.

Die Leitthemen **PlasmaBiozid** und **PlasmaDent** befassten sich mit der Untersuchung des Einflusses von Atmosphärendruckplasmen auf mikrobielle Biofilme sowohl auf Oberflächen semikritischer und kritischer Medizinprodukte sowie auf biologischen Oberflächen, insbesondere bei Infektionen von Wunden und Organen. Mit dem Leitthema PlasmDent lag ein besonders anwendungsrelevanter spezifischer Schwerpunkt auf plasmabasierten Biofilmentfernungen im Dentalbereich.

Im Leitthema **PlasmaWund** wird die Anwendbarkeit von Atmosphärendruckplasmen zur Unterstützung von Hautregeneration und Wundheilung untersucht. Im Verlaufe der Bearbeitung des Projektes Campus PlasmaMed wurden im Interesse einer thematischen und inhaltlichen Fokussierung die Leitthemen PlasmaBiozid und PlasmaWund unter der neuen Bezeichnung **PlasmaCure** vereinigt.

Das Leitthema **PlasmaDerm** konzentrierte sich auf den möglichen Einsatz von Atmosphärendruckplasmen zur Behandlung von Hauterkrankungen.

Im Leitthema **PlasmaSept** werden auf der Basis der Ergebnisse eines bereits realisierten Schlüsselexperimentes Forschungsarbeiten zur Anwendung von Atmosphärendruckplasmen zur selektiven antiseptischen Behandlung von Wunden fortgeführt, wobei *In-vitro*-Experimente zur Wirkung von Plasmabehandlungen auf Mikroorganismen und Zellen im Mittelpunkt der Arbeiten standen.

Das Leitthema **PlasmaOpt** befasst sich mit der Optimierung von plasmabasierten Beleuchtungssystemen im klinischen Bereich oder der Intensivmedizin. Im Zuge der thematischen und inhaltlichen Fokussierung der Forschungsarbeiten wurde dieses Leitthema zum Meilenstein nach 15 Monaten Bearbeitungszeit aus dem Themenspektrum des Campus PlasmaMed herausgenommen.



Im Themenfeld **Biofunktionale Oberflächen** wurden auf der Basis umfangreicher Erfahrungen und bereits bestehender Industriekontakte industrielle Anwendungen zur plasmagestützten Herstellung biofunktionaler Oberflächen zur Optimierung von Implantaten mit spezifischen Anforderungen in der Orthopädie und der Zahnheilkunde vorbereitet. Die Umsetzung der Thematik erfolgte im Leitthema **Plasmalmp**, wobei die Schwerpunkte auf der Erforschung von Beschichtungen von Knochenimplantaten zwecks Biologisierung und Verschleißminderung lagen.

Im Rahmen des Themenfeldes Plasmadekontamination war beabsichtigt, bereits vorhandene wissenschaftliche Resultate auf dem Gebiet der (mikro-)biologischen Dekontamination spezieller medizinisch relevanter Produkte weiterzubearbeiten und die Überführung in praktische Anwendungen einzuleiten. Im Rahmen des Leitthemas PlasmaPharm lag der inhaltliche Fokus auf wirkstoffhaltigen Flüssigkeiten mit komplexer Zusammensetzung und Schüttgütern sowie mikro- und nanodisperse Materialien wie z.B. Arzneidrogen. Vor allem bei der Behandlung von Schüttgütern (Arzneidrogen) wurde von einem hohen Anwendungspotenzial und einer schnellen Praxisumsetzung ausgegangen. Diese Annahme hat sich im Verlauf der Themenbearbeitung nicht bestätigt, so dass zum Meilenstein nach 15 Monaten entschieden wurde, den auf diesem Gebiet weiterhin erforderlichen Forschungsaufwand zugunsten der Fokussierung auf das Kerngebiet Plasmamedizin nicht weiter im Rahmen des Campus PlasmaMed zu betreiben. Der die Erforschung von biologischen Effekten von Plasma-Flüssigkeits-Wechselwirkungen betreffende Teil des Leitthemas PlasmaPharm wurde aufgrund seiner inhaltlichen Relevanz für die Charakterisierung von Plasmaeffekten auf Zellen in das Leitthema PlasmaSept übernommen.

Da im Verlaufe der ersten Monate der Bearbeitung des Campus PlasmaMed deutlich wurde, dass die Konzeption, Anpassung, Optimierung und Verbesserung von Plasmaquellen für spezielle experimentelle und potentielle therapeutische Anwendungen ein deutlicher Schwerpunkt des Campus PlasmaMed mit eigenem Forschungspotential und –bedarf ist, wurde Anfang 2009 das Campus-übergreifende Leitthema **PlasmaQuellen** zusätzlich aufgelegt.

Ein wichtiges Ziel der wissenschaftlichen Arbeit des Campus PlasmaMed war die Etablierung der Plasmamedizin als neues Gebiet der experimentellen und klinischen Forschung und Therapie. Perspektivisch sollten aus den Forschungsarbeiten des Campus heraus entsprechende Aus- und Weiterbildungsangebote für die Bereiche Medizin und Lebenswissenschaften entwickelt und realisiert werden. Zu diesem Zweck wurde in einem außerhalb der drei übergeordneten Themenfelder angesiedelten themenübergreifenden



Leitthema **PlasmaLern** ein Masterstudiengang "Plasmatechnik" mit einem Vertiefungsfach "Plasmamedizin" erarbeitet sowie ein Weiterbildungskurs für industrielle Anwender mit Schwerpunkt auf kleine und mittlere Unternehmen (KMU) konzipiert.

# I.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Zum Zeitpunkt der Antragstellung war die Oberflächenmodifizierung von Implantaten, Medizinprodukten und biomedizinischen Diagnostika mit an die Anwendung angepassten Gasentladungsplasmen bereits ein etabliertes Prinzip, das international von allen Industrienationen gefördert wurde, so auch in Deutschland.

Im INP Greifswald gab es ebenfalls bereits über zehn Jahre währende Aktivitäten auf diesem Gebiet. Mit den Prozessentwicklungen zur mikrostrukturierten Funktionalisierung von Kunststoffoberflächen, zu aminofunktionellen und zu bioaktiven Oberflächen wurden Forschungen sowohl zu Implantaten als auch für biomedizinische *in vitro*-Anwendungen von Kunststoffen durchgeführt. Damit gehört das INP zu den führenden Impulsgebern auf diesem Gebiet [Ohl u. Schröder 1999, Schröder et al. 2000, Meyer-Plath et al. 2003, Schröder et al. 2005, Ohl u. Schröder 2008]. Neben dem INP gibt es in Deutschland noch eine ganze Reihe von Arbeitsgruppen, die intensiv an der industriellen Umsetzung plasmachemischer Oberflächenmodifikationen für (blutkontaktierende) Implantate [Klee u. Höcker 2000, Nitschke et al. 2004] und das Tissue Engineering gearbeitet haben [Oehr et al. 2003].

Die Anwendung von Plasma zur Sterilisation bzw. mikrobiologischen Dekontamination wird seit Ende der 1960er Jahre untersucht [Wallenwein 1995, Moisan et al. 2001, Laroussi 2005]. Aus Untersuchungen zur Plasmasterilisation mit Mikrowellenentladungen im Niederdruck wurde die Hypothese abgeleitet, dass über die Inaktivierung der Mikroorganismen hinaus ein Abtrag organischen Materials durch Prozesse wie Photodesorption und reaktives Ätzen erfolgen kann [Lerouge et al. 2001, Moisan et al. 2002]. Vor allem auch deshalb gelten Plasmaverfahren als besonders aussichtsreiche alternative Sterilisationsverfahren. Inwieweit diese Wirkung auf das zu dekontaminierende Material beschränkt bleibt und nicht auch das Sterilisiergut schädigt, muss jeweils im Einzelfall geprüft werden.

Sowohl mit Atmosphärendruck- als auch mit Niederdruck-Plasmaquellen wurden signifikante Wirkungen gegen ein breites Erregerspektrum bei Behandlungszeiten von einigen Sekunden bis Minuten nachgewiesen [Laroussi 2005, Laroussi et al. 2005]. Generell wird der Behandlungserfolg durch die Zusammensetzung und die Betriebsparameter des Plasmas, aber auch durch die Wechselwirkung mit dem Sterilisiergut bestimmt, wobei die



antimikrobielle Wirkung einzelner Komponenten oder evtl. auftretender synergistischer Effekte auch von der spezifischen Resistenz der Erreger abhängt [Lerouge et al. 2001].

Im Unterschied zu den bisher unter der Bezeichnung Plasmasterilisation zur praktischen Anwendung gekommenen Verfahren wie z.B. das STERRAD-Verfahren (ASP-Advanced Sterilization Products, Johnson & Johnson Medical), die keine Plasmabehandlungen im eigentlichen Sinne darstellen, beruht bei den eigentlichen Plasmasterilisationsverfahren die abtötende Wirkung auf der *direkten* Wechselwirkung der Güter mit Plasmen.

Im Unterschied zu den z.T. bereits praktisch für die mikrobiologische Dekontamination eingesetzten Niederdruck-Plasmaverfahren liegen verfahrenstechnische Vorteile von Atmosphärendruck-Plasmaquellen vor allem im möglichen Verzicht auf die z.T. sehr kostenund wartungsintensive Vakuumtechnik, wodurch eine einfachere Prozessimplementierung erfolgen kann. Auf diesem Gebiet sind international Forschungsarbeiten seit Mitte der 1990er Jahre zu verzeichnen. Trotz intensiver weltweiter Forschung ist zum Zeitpunkt der Antragstellung ebenso wie gegenwärtig kein Atmosphärendruck-Plasmaverfahren vollständig in einen kommerziell-technologischen Sterilisationsprozess umgesetzt worden, abgesehen von einem unter dem Namen TipCharger (Cerionx, Inc.) angebotenen System zur Reinigung von Pipettenspitzen.

Im INP Greifswald wurden Arbeiten zur Nutzung von Atmosphärendruck-Plasmen zur mikrobiologischen Dekontamination von empfindlichen Produkten und Materialien seit Ende der 1990er Jahre durchgeführt. Es wurde in verschiedenen Publikationen nachgewiesen, dass insbesondere thermolabile Kunststoffe mittels Atmosphärendruck-Plasmen effektiv dekontaminiert werden können, ohne die behandelten Güter nachhaltig zu schädigen [von Woedtke et al. 2003, Ehlbeck et al. 2003, Brandenburg et al. 2007, Ehlbeck et al. 2008, Weltmann et al. 2008, von Woedtke et al. 2008]. Die im Rahmen dieser Arbeiten gewonnenen Erfahrungen sollten im Rahmen des Campus PlasmaMed auf spezielle Anwendungsfelder aus dem medizinischen bzw. pharmazeutischen Bereich angewendet werden.

Unterschied Biofunktionale Im zu den Themenfeldern Oberflächen und Plasmadekontamination. bei denen der medizinische Plasmaeinsatz indirekt, d.h. zur Vorbereitung und Optimierung von Produkten zur medizinischen Anwendung erfolgt, befasst sich das Themenfeld Plasmamedizin mit direkten therapeutischen Anwendungen von physikalischen Plasmen, d.h. mit Plasmaanwendungen unmittelbar am oder im menschlichen Körper. Von derartigen Anwendungen wurden zum Zeitpunkt der



Antragstellung bedeutende Einsatzmöglichkeiten in der medizinischen Praxis erwartet [Stoffels 2006, Satawa 2007, Kramer et al. 2008].

Die einzige bis dahin praktizierte therapeutische Plasmaanwendung war die Argon-Plasma-Koagulation zur Abtragung bzw. Verödung von Gewebe und zur Stillung starker Blutungen. Dabei werden im Wesentlichen thermische Plasmaeffekte in biologischem Gewebe ausgenutzt [Raiser u. Zenker 2006, Zenker 2008]. Aus ersten experimentellen Untersuchungen ergaben sich Hinweise auf Möglichkeiten der Beeinflussung apoptotischer Prozesse in Zellen, die u.a. für die Krebsbehandlung genutzt werden könnten [Stoffels et al. 2004, Laroussi u. Lu 2005, Stoffels et al. 2006, Fridman et al. 2007, Stoffels 2007].

Besonders interessant für therapeutische Anwendungen sind sub-letale bzw. nicht-letale Plasmaeffekte, d.h. Beeinflussungen von Zellen, die nicht zu deren Untergang führen. So konnte in In-vitro-Zellkulturen gezeigt werden, dass die Adhärenz von Zellen durch Plasmabehandlung reversibel beeinflusst werden kann, ohne nekrotische Prozesse zu induzieren [Stoffels et al. 2003, Kieft et al. 2004, Stoffels et al. 2004 a u. b, Kieft et al. 2005, Yonson et al. 2005, Stoffels et al. 2006, Stoffels 2007]. Solche Effekte lassen sich beispielsweise für eine selektive In-vivo-Antiseptik ausnutzen, d.h. die Inaktivierung von Infektionserregern an bzw. auf lebendem Gewebe ohne die Körperzellen nachhaltig zu schädigen. Als praktische therapeutische Anwendung und somit als erstes Anwendungsfeld für die Plasmamedizin steht die Wundheilung, insbesondere die Wundantiseptik im Mittelpunkt des Interesses. Eine Vorreiterrolle spielte zum Zeitpunkt der Antragstellung die Arbeitsgruppe um Alexander Fridman an der Drexel University in Philadelphia, USA, die bereits von ersten erfolgreichen Plasmaanwendungen mit Wundheilungserfolgen berichteten [Fridman et al. 2008; siehe auch http://plasma.mem.drexel.edu/icpm-1/). Dabei handelte es sich jedoch um Einzelfallberichte.

Eine erste klinische Studie (Phase II) zur Wundantiseptik mit einer mikrowellenangeregten Plasmaquelle (Microwave Plasma Torch; ADTEC Plasma Technology Co. Ltd, Hiroshima, Japan) wurde von Prof. Dr. med. Wilhelm Stolz in der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Umweltmedizin am Klinikum Schwabing gemeinsam mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Gregor Morfill vom Max-Planck-Institut für extraterrestrische Physik, München-Garching durchgeführt. Ziel war die Behandlung bakterieller Superinfektionen in chronischen Wunden. Es wurden 888 Einzelbehandlungen an 105 Patienten ausgewertet, die durchschnittliche Behandlungsdauer betrug 8,5 Tage und variierte zwischen einem und 64 Tagen. Die Plasmabehandlung wurde zusätzlich zur konventionellen Wundtherapie durchgeführt und ergab Hinweise auf eine Verstärkung der antiseptischen Effektivität durch das Plasma [Stolz et al. 2007].



#### In I.4 zitierte Literatur:

Fridman G, Shereshevsky A, Jost MM, Brooks AD, Fridman A, Gutsol A, Vasilets V, Friedman G. Floating Electrode Dielectric Barrier Discharge Plasma in Air Promoting Apoptotic Behavior in Melanoma Skin Cancer Cell lines. Plasma Chem Plasma Process 27 (2007) 163-176

Fridman, G., Friedman, G., Gutsol, A., Shekter, A.B., Vasilets, V.N., Fridman, A. (2008). Applied Plasma Medicine. *Plasma Process. Polym.*, 5, DOI: 10.1002/ppap.200700154

Kieft IE, Broers JLV, Caubet-Hilloutou V, Slaaf DW, Ramaekers FCS, Stoffels E. Electric Discharge Plasmas Influence Attachment of Cultured CHO K1 Cells. Bioelectromagnetics 25 (2004) 362-368

Kieft IE, Darios D, Roks AJM, Stofffels E. Plasma Treatment of Mammalian Vascular Cells: A Quantitative Description. IEEE Trans Plasma Sci 33 (2005) 771-775

Klee, D., Höcker, H. Polymers for biomedical applications: Improvement of the interface compatibility, Adv. Polym. Sci. 149 (2000), 1-57.

Kramer A, Lindequist U, Weltmann KD, Wilke C, von Woedtke T. Plasma Medicine – its perspective for wound therapy. GMS Krankenhaushyg Interdiszip 2008; 3(1):Doc16; http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2008-3/dgkh000114.shtml

Laroussi M. Low Temperature Plasma-Based Sterilization: Overview and State-of-the-Art. Plasma Process Polym 2005; 2: 391-400

Laroussi M, Lu X. Room-temperature atmospheric pressure plasma plume for biomedical applications. Appl Phys Lett 87 (2005) 113902

Lerouge S, Wertheimer MR, Yahia L'H. Plasma Sterilization: A Review of Parameters, Mechanisms, and Limitations. Plasmas and Polymers 2001; 6: 175-188

Meyer-Plath, A. A., Schröder, K., Finke, B., Ohl A. Current trends in biomaterial surface functionalization - nitrogen-containing plasma assisted processes with enhanced selectivity. Vacuum 71(2003), 3, 391-406.

Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabritian M, Yahia L'H. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. Int J Pharm 2001; 226: 1-21

Moisan M, Barbeau J, Crevier M-C, Pelletier J, Philip N, Saoudi B. Plasma sterilization. Methods and Mechanisms. Pure Appl Chem 2002; 74: 349-358

Nitschke, M., Zschoche, S., Baier, A., Simon, F., Werner C. Low pressure plasma immobilization of thin hydrogel films on polymer surfaces. Surf. Coat. Technol. 185 (2004), 120-125.

Oehr, C. Plasma surface modification of polymers for biomedical use, Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B 208 (2003), 40-47.

Ohl, A., Schröder, K. Plasma induced chemical micropatterning for cell culturing applications: a brief review." Surface and Coatings Technology, 116-119 (1999), 820-830.

Ohl, A., Schröder K. Plasma assisted surface modification of biointerfaces. In: Low temperature plasma physics. Hippler, R., Kersten, H., Schmidt, M., Schoenbach, K. H. (eds.). VCH Wiley, Berlin 2008.

Raiser J, Zenker M. Argon plasma coagulation for open surgical and endoscopic applications: state of the art. J Phys D: Appl Phys 39 (2006) 3520-3523

Satawa R. Plasma – foundation of a new revolution in healthcare, Vortrag, First International Conference on Plasma Medicine, 15.-18. Oktober 2007, Corpus Christi, TX, USA

Schröder, K., Keller, D., Meyer-Plath, A., Müller, U., Ohl, A. Pattern guided cell growth on gas discharge plasma induced chemical microstructured polymer surfaces. In: Materials for Medical Engineering. Stallforth, H., Revell, P. (eds.), Wiley-VCH Weinheim 2000, p.161-165.



Schröder, K., Finke, B., Ohl, A. Improved low-pressure microwave plasma-assisted amino functionalization of polymers. In: Plasma Processes and Polymers. d'Agostino, R, Favia, P., Oehr, C., Wertheimer, M.R. (eds.). Wiley VCH, Weinheim, 2005, 333-349.

Stoffels E, Flikweert AJ, Stoffels WW, Kroesen GMW. Plasma needle: a non-destructive atmospheric plasma source for fine surface treatment of (bio)materials. Plasma Sources Sci Technol 2002; 11: 383-388

Stoffels E, Kieft IE, Sladek REJ. Superficial treatment of mammalian cells using plasma needle. J Phys D: Appl Phys 36 (2003) 2908-2913

Stoffels E, Kieft IE, Sladek REJ, van der Laan EP, Slaaf DW. Gas Plasma Treatment: A New Approach to Surgery? Crit Rev Biomed Eng 32 (2004) 427-460

Stoffels E, Sladek REJ, Kieft IE. Gas Plasma Effects on Living Cells. Physica Scripta T107 (2004) 79-82

Stoffels E, Kieft IE, Sladek REJ, van den Bedem LJM, van der Laan EP, Steinbuch M. Plasma needle for in vivo medical treatment: recent developments and perspectives. Plasma Sources Sci Technol 15 (2006) S169-S180

Stoffels E. "Tissue Processing" with Atmospheric Plasmas. Contrib Plasma Phys 47 (2007) 40-48

Stoffels E. Cold-plasma treatment in wound care: efficacy and risk assessment, Vortrag, First International Conference on Plasma Medicine, Corpus Christi, TX, USA, 15.-18. Oktober 2007

Stolz W, Georgi M, Schmidt H-U, Ramrath K, Pompl R, Shimizu T, Steffes B, Bunk W, Peters B, Jamitzky F, Morfill G. Low-temperature Argon plasma fort he sterilization of chrinic wounds: from bench to bedside. Vortrag, First International Conference on Plasma Medicine, Corpus Christi, TX, USA, 15.-18. Oktober 2007

Wallenwein R. Die Niedrigtemperatur-Plasmasterilisation aus der Patentsicht. Zentr Steril 1995; 3: 373-384.

Yonson S, Coulombe S, Leville V, Leask RL. Cell treatment and surface functionalization using a miniature atmospheric pressure glow discharge plasma torch. J Phys D: Appl Phys 39 (2006) 3508-3513

Zenker M. Argon plasma coagulation.GMS Krankenhaushyg Interdiszip 2008; 3(1):Doc15; http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2008-3/dgkh000113.shtml

Th. von Woedtke, W.-D. Jülich, S. Thal, M. Diederich, M. Stieber, E. Kindel. Antimicrobial efficacy and potential application of a newly developed plasma-based ultraviolet irradiation facility. J. Hosp. Infect. 55 (2003) 203-211

J. Ehlbeck, A. Ohl, M. Maaß, U. Krohmann, T. Neumann. Moving atmospheric microwave plasma for surface and volume treatment. Surf. Coat. Technol. 174-175 (2003) 493-497

R. Brandenburg, J. Ehlbeck, M. Stieber, Th. von Woedtke, J. Zeymer, O. Schlüter, K.-D. Weltmann. Antimicrobial treatment of heat sensitive materials by means of atmospheric pressure rf-driven plasma jet. Contrib. Plasma Phys. 47 (2007) 72-79

J. Ehlbeck, R. Brandenburg, Th. von Woedtke, U. Krohmann, M. Stieber, K.-D. Weltmann. PLASMOSE - antimicrobial effects of modular atmospheric plasma sources. GMS Krankenhaushyg Interdiszip 3 (2008) Doc14

K.-D. Weltmann, R. Brandenburg, Th. von Woedtke, J. Ehlbeck, R. Foest, M. Stieber, E. Kindel. Antimicrobial treatment of heat sensitive products by miniaturized atmospheric pressure plasma jets (APPJs). J. Phys. D: Appl. Phys. 41 (2008) 194008

Th. von Woedtke, A. Kramer, K.-D. Weltmann. Plasma sterilization: what are the conditions to meet this claim? Plasma Process Polym 5 (2008) 534-539

#### I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das Gesamtprojekt Campus PlasmaMed wurde institutionsübergreifend nach thematischinhaltlichen Gesichtspunkten im Rahmen von neun Leitthemen gesteuert. Das INP



Greifswald hatte die wissenschaftliche Leitung der Leitthemen PlasmaQuellen, PlasmaSept, PlasmaPharm und PlasmaOpt inne und war weiterhin mit wissenschaftlichen Arbeiten in die Leitthemen PlasmaImp und PlasmaLern eingebunden. Im Rahmen dieser Leitthemen wurde mit den folgenden Institutionen zusammengearbeitet:

# PlasmaQuellen:

- Klinikum der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald:
  - o Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten
  - Zentrum f
    ür Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Poliklinik f
    ür Zahnerhaltung, Parodontologie und Endodontologie
  - o Institut für Hygiene und Umweltmedizin
- Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald:
  - o Institut für Pharmazie
  - o Institut für Physik
- Fachhochschule Stralsund, Fachbereich Maschinenbau
- Hochschule Neubrandenburg, Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften
- Externe Partner (keine Campus-Verbundpartner):
  - o Cinogy GmbH Duderstadt
  - o Ferdinand-Braun-Institut für Höchstfrequenztechnik Berlin

#### PlasmaPharm:

- Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald:
  - o Institut für Pharmazie
- Hochschule Neubrandenburg,
  - o Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften

#### PlasmaSept:

- Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald:
  - o Institut für Pharmazie
- Hochschule Neubrandenburg, Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften
- Externer Partner (kein Campus-Verbundpartner):
  - Klinikum der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenkrankheiten (HNO)

# PlasmaOpt:



- Externe Partner (keine Campus-Verbundpartner)
  - o AG Schlafforschung und Klinische Chronobiologie Berlin
  - o Kinderklinik im Krankenhaus Köln-Porz

# Plasmalmp:

- Klinikum der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald:
  - Zentrum f
    ür Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Poliklinik f
    ür Zahnerhaltung, Parodontologie und Endodontologie
  - o Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
- Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald:
  - o Institut für Pharmazie
  - o Institut für Physik
- Universität Rostock:
  - o Arbeitsbereich Zellbiologie des Zentrums für Medizinische Forschung
  - o Orthopädische Klinik und Poliklinik
  - o Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
- IMaB Institut für Marine Biotechnologie e.V. Greifswald (im Unterauftrag)

#### PlasmaLern:

- Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald:
  - o Institut für Physik
- Fachhochschule Stralsund, Fachbereich Maschinenbau

# II.1 Eingehende Darstellung der Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Das INP Greifswald hatte die wissenschaftliche Leitung der Leitthemen PlasmaQuellen, PlasmaSept, PlasmaPharm und PlasmaOpt inne und war weiterhin mit wissenschaftlichen Arbeiten in die Leitthemen PlasmaImp und PlasmaLern eingebunden. Im folgenden Abschnitt wird über die Anteile des INP Greifswald an den Arbeiten der einzelnen Leitthemen berichtet.

# II.1.1 Leitthema PlasmaQuellen

In Korrektur der ursprünglichen Planung und einer Empfehlung des Projektträgers folgend wurde im Verlaufe der ersten Förderphase ab März 2009 ein eigenes Leitthema



**PlasmaQuellen** eingerichtet, um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass der Aufbau und die Diagnostik von Plasmaquellen und vor allem deren spezifische Optimierung und Anpassung an die besonderen experimentellen Anforderungen der Verbundpartner sich als ein zentraler Faktor innerhalb des Campus PlasmaMed erwiesen hat.

Zu den Zielen des Leitprojektes PlasmaQuellen gehörten insbesondere die

- Systematische Entwicklung und Optimierung von Plasmaquellen zur Testung und Anwendung im Campus PlasmaMed, die
- Umfassende Plasmadiagnostik zur detaillierten Charakterisierung und Interpretation chemischer, biologischer und medizinischer Plasmaeffekte und die
- Etablierung der Quellenentwicklung als eigene Forschungsaufgabe im Rahmen des Campus PlasmaMed über Serviceaufgaben für die Campus-Partner hinaus.

Alle Leitthemen (außer PlasmaOpt und PlasmaLern) verfügten mit dem Atmosphärendruck-Plasmajet der kINPen®-Reihe über eine vor Ort anwendbare Plasmaquelle. Nach der ursprünglichen Planung war vorgesehen, auf der Basis dieser Plasmaquelle erste orientierende Experimente durchzuführen und auf der Basis von dabei erworbenen Erfahrungen gemeinsam mit dem INP an der Weiterentwicklung der Quellen zu arbeiten. Dieses Konzept ist in sehr unterschiedlichem Maße verwirklicht worden. Einige Campus-Partner nutzen die ihnen zunächst zur Verfügung gestellte Plasmaguelle sehr intensiv vor Ort und konzipieren ihre Experimente – unter Berücksichtigung der selbstverständlich damit noch verbundenen Grenzen bei der Anwendung - im Hinblick auf die mit dieser Plasmaquelle realisierbaren Möglichkeiten (Hautklinik Greifswald, Institut für Pharmazie Greifswald, Charité Berlin). Andere Partner im Campus haben die Möglichkeit erster orientierender Experimente unter vorübergehender Inkaufnahme von Einschränkungen deutlich zu wenig genutzt und sind sehr schnell mit dem Wunsch nach neuen bzw. an bestimmte experimentelle Anforderungen speziell angepassten Quellen an das INP Greifswald herangetreten. Hier war ein sehr umfassender beidseitiger Lernprozess erforderlich, der auf Seiten der Plasmatechnik ein hohes Verständnis der Anforderungen biologischer und medizinischer Experimente erforderte, auf Seiten der Anwender aus dem Life-Science-Bereich aber auch eine Auseinandersetzung mit den Grenzen von Plasmaguellen im Stadium der Entwicklung und Optimierung verlangte. Im Ergebnis der jetzt im Leitthema PlasmaQuellen koordinierten Arbeiten wurden mehrere unterschiedliche Plasmaguellen entwickelt, gebaut und den Partnern im Campus PlasmaMed in einem neu im INP errichteten plasmamedizinischen Labor zur Verfügung gestellt.



Zur Charakterisierung der generierten Plasmen wurden die optische Emissionsspektroskopie vom VUV- bis in den nahen Infrarotbereich, FTIR, Kurzzeitphotographie, Temperatur- und elektrische Messtechnik eingesetzt.

# II.1.1.1 HF-Plasma-Jet (kINPen 08, kINPen 09)

# Funktionsprinzip des HF-Plasma-Jets

Der prinzipielle Aufbau des Elektrodensystems der Plasmaquelle ist in Abb. 2a dargestellt. Im Innern einer Quarz- oder Keramikkapillare (Innendurchmesser 1,6mm) ist eine Edelstahlelektrode (Durchmesser 1mm) angeordnet. Mittels eines Sinusgenerators wird über einen Reihenschwingkreis eine Hochspannung mit einer Frequenz von 1,1 MHz und einer Amplitude von 2-3 kV<sub>ss</sub> erzeugt und der Elektrode (3) zugeführt. Am Ende der Kapillare befindet sich eine geerdete Ringelektrode (2). Zwischen dieser und der Innenelektrode entsteht bei einer genügend hohen Spannung ein Plasma, welches durch den Gasstrom (5) und Ionisationswellen nach außen getrieben wird.

Als Trägergas ist besonders Argon bei Gasflussraten zwischen 2 und 10 slm geeignet. Geringe Zumischungen von Molekülgasen unter 1% sind möglich. Bei maximaler Eingangsleistung werden Jet-Längen bis zu 12 mm erreicht. Das im INP entwickelte Gerät (kINPen® 09, CE-zertifiziert)) ist in Abb. 2b dargestellt. Es besteht aus einem Handstück (Länge=170 mm, Durchmesser=20 mm, Gewicht=170 g) in dem das Elektrodensystem und die Ansteuerelektronik untergebracht sind, einer DC-Spannungsversorgung (8 W bei 220 V, 50/60 Hz) und einer Gasversorgung. Eine Pulsung des Plasmas zur Reduzierung der mittleren eingebrachten Energie ist über die Ansteuerelektronik möglich.



Abb. 2: Plasmajet kinpen. a) Prinzipeller Aufbau des Elektrodensystems b) Foto des kinpen 09.



#### Aufbau des kINPen® 08

Im Zuge der Entwicklung der Plasmaquellen im INP wurde der kINPen® 08 konzipiert, gebaut und den Partnern im Campus PlasmaMed zur Verfügung gestellt. Der Grundaufbau des Elektrodensystems entspricht dem oben beschriebenen Funktionsprinzip. Gegenüber dem Nachfolger (kINPen09) erfolgt hier die Ansteuerung des Resonanzkreises über einen gegentaktgeschalteten Transformator. Die im Resonanzkreis befindliche Induktivität bestand aus einer Luftspule, die es gestattete, das System bei einer Frequenz von 1,8 MHz zu betreiben. Die Ansteuerelektronik befand sich noch im Grundgerät, so dass über die Zuleitung die hochfrequente Ansteuerspannung zum Handstück geführt wurde, was starke Störungen verursachte. Ebenfalls waren die Verluste im Handstück (Erwärmung) durch die Wirkung von Wirbelströmen in der Umhüllenden relativ hoch (Induktionsofen!). Zur Vermeidung dieser Mängel wurde der KINPen® 09 entwickelt.

#### Aufbau des kINPen® 09

Der kINPen® 09 zeichnet sich dadurch aus, dass die Ansteuerelektronik im Handstück untergebracht ist und somit eine Antennenwirkung der Versorgungsleitung (Gleichspannung) vermieden wird. Zur Vermeidung der hohen Verluste durch induzierte Wirbelströme in dem aus Edelstahl hergestellten Handstück, wurde die Luftspule im erforderlichen Resonanzkreis durch eine Ferritkernspule ersetzt. Die Anregung des Resonanzkreises erfolgt hier direkt über einen MOSFET-Schalter bei 1,1 MHz. Auch diese Quelle wurde den Partnern im CPM zur Verfügung gestellt.

#### Vergleich des kINPen® 08 mit dem kINP® 09

Untersuchungen am INP mit dem kINPen® 08 und kINPen® 09 zum Ätzen von Kunststoffen zeigten, dass der kINPen® 08 wesentlich potenter war als der kINPen® 09, obwohl vom äußeren Erscheinungsbild beide Effluenten gleiche Ausdehnungen zeigten. Zur Klärung dieser Diskrepanz wurden Temperatur- und kalorimetrische Messungen durchgeführt (Beschreibung der Meßmethoden siehe unten).

In Abb. 3a ist für beide Quellen der axiale Temperaturverlauf für den Argon-Effluenten bei einer Durchflußrate von 5 slm dargestellt. Es zeigt sich, dass im kINPen® 08 wesentlich höhere Temperaturen im Bereich von 0 bis 11 mm generiert werden. Beide Quellen zeigen einen gleich langen Effluenten von etwa 11 mm, wo dann auch die Temperaturen übereinstimmen und etwa 40 °C betragen. Ähnlich verhält es sich auch mit den gemessenen thermischen Leistungen. In Abb. 3b sind für beide Quellen der axiale Verlauf der thermischen Leistungen für 5 slm Ar gezeigt. Auch hier zeigt der kINPen® 08 bis zu einem



Abstand von 8 mm vom Kapillarende wesentlich höhere Werte (700 – 200 mW). Ab 8 mm nähern sich beide an und zeigen wiederum in der Spitze des Plasmas etwa gleiche Werte.



Abb. 3: Axialer Temperaturverlauf (a) und thermische Leistung (b) des kINPen 08/09.

Beide Messungen zeigen, dass der Energieeintrag in den Effluenten des kINPen® 08 höher ist als im kINPen® 09. Da beide Quellen den gleichen Elektrodenaufbau haben und die Spannungen an der Hochspannungselektrode vergleichbar waren, wurde vermutet, dass die Differenzen in dem unterschiedlichen Energieeintrag in beiden Quellen dadurch bedingt waren, dass beide Systeme mit unterschiedlichen Frequenzen betrieben wurden.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde an einer Quarzkapillare mit zwei Außenelektroden bei konstantem elektrischen Feld zwischen beiden Elektroden (U = 3kV an der hochspannungsführenden Elektrode) und einer Ar-Durchflussrate von 3 bzw. 5slm die Frequenz der Versorgungsspannung von 1 bis 9 MHz variiert. Gemessen wurde die thermische Leistung im Bereich der Plasmaspitze. Abb. 4 zeigt die thermischen Leistungen in Abhängigkeit von der Frequenz und der Ar-Durchflussrate bei konstanter Spannung zwischen beiden Elektroden. Deutlich ist eine Zunahme der thermischen Leistung und auch der Länge des Effluenten (Kennzeichnung auf der Abszisse) mit höher werdender Frequenz zu erkennen. Strommessungen in der Spitze des Plasmas zeigten die gleiche Tendenz. Die Ursache für dieses Verhalten wird in einer Verringerung der Impedanz der von der Hochspannungselektrode in die Umgebung ausgehenden Streukapazität mit Erhöhung der Frequenz gesehen.





Abb. 4: Thermische Leistung des Effluenten einer Kapillarentladung in Abhängigkeit von der Frequenz

#### Temperaturmessungen

Die Temperaturmessungen im Jet erfolgten mit einem faseroptischen Messgerät (Luxtron, Modell 755). Abb. 5 zeigt den Messaufbau. Zur Aufnahme des axialen Temperaturprofils wird die Sonde über ein Translationselement in axialer Richtung verschoben.



Abb. 5: Meßaufbau zur faseroptischen Temperaturmessung.

In Abb. 6 ist der axiale Temperaturverlauf für den Ar-HF-Plasma-Jet bei einem Ar-Gasfluss von 5 slm für unterschiedliche Eingangsleistungen in das Handstück dargestellt. Mit dem Abstand und kleiner werdender Leistung sinkt die Gastemperatur. Die Länge des Jets erhöht sich mit der Leistung von 4 mm bis zu 12 mm. Die Temperaturen in der Plasmaspitze sind nahezu unabhängig von der Leistung und liegen im Bereich zwischen 48 <sup>o</sup>C und 50<sup>o</sup> C.





Abb. 6: Axialer Temperaturverlauf im HF-Plasma-Jet in Abhängigkeit von der Leistung

Es wurde ein gepulster Jet entwickelt, mit dem es möglich ist die Temperaturen im Effluenten deutlich zu verringern. In Abb. 7 sind in Abhängigkeit von der Intervalldauer und der axialen Position die Temperaturverläufe dargestellt. Deutlich verringern sich die Temperaturen mit größer werdender Intervalldauer.



Abb. 7: Axialer Temperaturverlauf im gepulsten Jet.



#### Kalorimetrische Messungen

Zur Bestimmung der Wärmeenergie in der Spitze des Effluenten wurde die zeitliche Temperaturerhöhung eines Kupfersubstrats (10×10×0,09 mm<sup>3</sup>, Gewicht 0,12 g) mittels der faseroptischen Meßmethode gemessen.

Entsprechend folgender Gleichung wurde dann die Wärmeenergie berechnet (P – Wärmeenerie, m – Gewicht des Substrats,  $c_w$  – spezifische Wärme des Substrats (385J/ (kg·K),  $\Delta T/\Delta t$  – zeitliche Änderung der Temperatur des Substrats):

$$\mathsf{P} = \mathsf{m} \cdot \mathsf{c}_{\mathsf{w}} \cdot \Delta \mathsf{T} / \Delta \mathsf{t} \; .$$

In Abb. 8 ist für drei unterschiedliche Eingangsleistungen in das Handstück die Wärmeenergie in Abhängigkeit von der axialen Position dargestellt. Dabei zeigt sich, dass in der Spitze des Effluenten (gelb markiert) die Energie bei ca. 150 mW liegt und relativ unabhängig von der Eingangsleistung ist. Dies korreliert auch mit den Temperaturmessungen, wonach auch hier in der Spitze eine nahezu von der Eingangsleistung unabhängige konstante Temperatur von etwa 48 °C bis 50° C gemessen wurde (s.o.).



Abb. 8: Wärmeenergie in Abhängigkeit von der axialen Position im Effluenten



# **Optische Emissionsspektroskopie im UV und VIS**

Optische Emissionsspektroskopie wurde sowohl im VUV- Bereich (120 nm – 200 nm), im UV-Bereich (200 nm – 400 nm), im sichtbaren (400 nm – 780 nm) und nahen Infrarot-Bereich (780 nm – 1000 nm) durchgeführt.

Die spektralen Eigenschaften des kINPen<sup>1</sup> wurden in Abhängigkeit von den Betriebsparametern Arbeitsgas, Arbeitsabstand und Leistung untersucht. In Anbetracht des großen Parameterfeldes wurde ein Standardarbeitspunkt ( $Q_{Argon} = 5 \text{ slm}$ , U = 60 V) definiert, um den herum Variationen der Einstellungen vorgenommen wurden. Ein typisches Übersichtsspektrum für diesen Arbeitspunkt ist in Abb. 9 gezeigt. Charakteristisch für diese Betriebsbedingungen ist die vergleichsweise starke Emission des OH-Radikals um 308 nm, das Vorhandensein der Stickstoffbanden des zweiten positiven Systems im UV-Bereich, sowie die Vielzahl der Argon-Linien im nahinfraroten Spektralbereich.



Abb. 9: End-on Übersichtsspektrum für den kINPen 09 bei einer Betriebsspannung von 60 V und einer Argonflussrate von 5 slm.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> kinpen 09 in Laborausführung (Voltcraft-Netzteil) mit Quartz-Kapillare



In Abb. 10 ist die axiale Änderung der spektralen Emissionseigenschaften des kINPen-Plasmas für drei verschiedene Betriebsspannungen dargestellt. Aus den Diagrammen geht hervor, dass die Plasmalänge von der eingekoppelten elektrischen Leistung (Betriebsspannung) abhängt. Gleichfalls skaliert die Intensität der einzelnen Linien mit der Leistung. Besonders auffällig ist die stark ausgeprägte Ortsabhängigkeit der UV-Strahlungseigenschaften (obere Reihe). Bei kleiner Leistungseinkopplung (U = 50 V) ist das UV-Spektrum stark durch die Emission des OH-Radikals um 308 nm bestimmt.



Abb. 10: Axiale Variation der relativen spektralen Intensitäten im UV und NIR für drei verschiedene Betriebsspannungen des kINPpen.

Die Intensität dieser Strahlung ist in einem Abstand von ca. 3 mm vor der Düse am größten und klingt in Richtung der Spitze des Effluenten (bei ca. 6 mm) schnell wieder ab. Bei Erhöhung der Spannung auf 60 V wird der Effluent insgesamt länger (ca. 9 mm) und das Zentrum der OH-Emission verschiebt sich in die Mitte des Effluenten. Bei einer Betriebsspannung von 70 V wird neben der Verlängerung des Effluenten auf ca. 12 mm eine qualitative Änderung des axialen Verlaufs der UV-Strahlungseigenschaften beobachtet. Das Zentrum der OH-Emission liegt bei ca. 3 mm vor der Düse und die OH-Intensität nimmt langsam in Richtung der Spitze des Effluenten ab. Eine gänzlich neue Qualität der UV-Strahlungseigenschaften ist durch die starke Emission des zweiten positiven Systems von Stickstoff (Bandenstruktur 330 405 nm) die ~ gegeben, erst bei hohen des Betriebsspannungen an der Spitze Effluenten zu beobachten ist. Aus Langzeitmessungen ist bekannt, dass die intensive Emission des Stickstoffs im Laufe des



Betriebs des kINPen zu- und gleichzeitig die Emission des OH-Radikals abnimmt. Sowohl die räumliche Struktur der Emissionscharakteristik im Effluenten als auch die zeitliche Entwicklung der OH-Emission lassen den Schluss zu, dass sich Feuchtigkeit im Arbeitsgas bzw. sehr hohe Luftfeuchtigkeit parasitär auf die Anregung der übrigen Spezies im Plasma auswirkt.

Neben reinem Argon wurde der kINPen auch mit anderen Edelgasen und Gasgemischen betrieben. Beispielhafte Übersichtsspektren dafür sind in Abb. 11 dargestellt. Im Falle des Varigon-Gasgemisches (Ar+2% H<sub>2</sub>) ist ein ähnliches Spektrum wie bei reinem Argonbetrieb zu beobachten. Zusätzlich wird um UV-Bereich ein breitbandiges Kontinuum emittiert, dessen Ursprung noch nicht vollständig geklärt werden konnte. Wird der kINPen mit sogenanntem Ballongas (He+Luft) betrieben, wird über den gesamten UV-Bereich hinweg intensiv Strahlung erzeugt. Im UV-C wird NO angeregt, UV-B ist durch die Emission des OH-Radikals gekennzeichnet und im UV-A kommt die Bandenstruktur des Stickstoffs zum Tragen. Im sichtbaren Spektralbereich werden die Emissionslinien des Heliums beobachtet. Sehr beachtenswert ist das Auftreten vergleichsweise intensiver Emissionslinien des atomaren Sauerstoffs im Nahinfrarotbereich.



Abb. 11: Übersichtsspektren für den Betrieb des kINPen mit Edelgasen und Gasgemischen. a) Varigon-Gasgemisch (Ar + 2% H<sub>2</sub>), b) Ballongas (unreines Helium)

Ein weiterer Schwerpunkt der Untersuchungen am kINPen bestand in der Bestimmung der Bestrahlungsstärken. Für diese Messungen wurde ein optischer Aufbau, wie in Abb. 12 gezeigt eingerichtet. Dabei wurde ein von der zu untersuchenden Strahlungsquelle bestrahltes Flächenelement einer Streuscheibe über eine 1:1-Abbildung auf den Eintrittsspalt eines Monochromators abgebildet. Der gesamte Aufbau wurde mittels einer Deuteriumlampe auf absolute Bestrahlungsstärkeeinheiten kalibriert.





Abb. 12: Optischer Aufbau zur Bestimmung der UV-Bestrahlungsstärke.

In Abb. 13 ist ein Beispielspektrum des kINPen-Plasmas für ein Argon/Stickstoff Gasgemisch gezeigt. Durch Integration über bestimmte Spektralbereiche wird daraus die Bestrahlungsstärke für die Teilregionen UV-A, UV-B und UV-C gewonnen.



Abb. 13: Typisches UV-Spektrum des kINPen für eine Argon-Stickstoff Gasmischung

In Abb. 14 sind die entsprechenden Messergebnisse in Abhängigkeit von verschiedenen Betriebsparametern gezeigt. Signifikante UV-C Bestrahlungsstärken wurden nur bei



expliziter Beimischung von Luft bzw. Stickstoff zu Argon beobachtet. In diesem Fall wird NO gebildet, das sich anhand seiner typischen  $NO_{\gamma}$ -Bandenstruktur im UV-C nachweisen lässt.



Abb. 14: Parameterabhängigkeit der UV-Bestrahlungsstärken. a) Leistungs- / Betriebsspannungsvariation b) Abstandsvariation c) Variation der Stickstoffbeimischung

Die Parametervariationen im reinen Argon-Betrieb (Abb. 14a und 14b) lassen einen näherungsweise linearen Zusammenhang zwischen der Betriebsspannung und den UV-Bestrahlungsstärken annehmen. Die Abstandsvariation ergibt eine gute Abhängigkeit der Bestrahlungsstärken nach dem  $1/r^2$ -Gesetz. Lediglich bei sehr kleinen Entfernungen des Detektors von der Düse treten Abweichungen von diesem Zusammenhang auf. Dies ist einerseits durch einen gewissen Offset zwischen dem Düsenende des kINPens (Referenzort d = 0 mm) und dem Ort der Plasmaerzeugung (Spitze der HV-Elektrode) bedingt.



Andererseits kommt es bei sehr kleinen Distanzen zu einer eingeschränkten Wechselwirkung des Trägergases mit der Umgebungsluft, wodurch insbesondere die Anregung von Stickstoff und damit die Emission im UV-A eingeschränkt sind. Die Variation der N<sub>2</sub>-Beimischung (Abb. 16c) zeigt, dass mit wachsender N<sub>2</sub>-Konzentration die Emission im UV-Bereich zunehmend durch die Strahlung des zweiten positiven Systems von Stickstoff im UV-A dominiert wird, während der Beitrag der UV-B Strahlung, die wesentlich durch die Emission des OH-Radikals bestimmt ist, abnimmt. Zusätzlich kommt es bereits bei kleinen Stickstoffbeimischungen zu einer Bildung von NO, welches im UV-C emittiert. Für die UV-C-Emission des NO wird jedoch eine Sättigung der Bestrahlungsstärken ab ca. 1  $^{\circ}/_{\infty o}$  beobachtet. Somit besteht durch die Anpassung des Konzentrationsverhältnisses von Argon zu Stickstoff im Gasgemisch die Möglichkeit, die Strahlungsintensitäten in den Spektralbereichen UV-A, UV-B und UV-C gezielt zu beeinflussen.

In Langzeituntersuchungen zur zeitlichen Variation der spektralen Eigenschaften hat sich gezeigt, dass mit zunehmender Betriebsdauer die Emissionsintensität der OH-Banden abnimmt, während die Strahlungsanteile aus dem zweiten positiven System des Stickstoffs anwachsen. Gleichfalls steigt im Laufe der Zeit die Intensität der Argon-Linien im Nah-Infrarotbereich an. Es gibt Indizien, dass Feuchtigkeit im Arbeitsgas bzw. in der Umgebungsluft einen starken Einfluss auf die spektrale Performance des Plasmajets nimmt. In diesem Zusammenhang ist darauf zu achten, dass geeignete Gasleitungssysteme verwendet werden (Edelstahlleitungen bzw. Teflonschläuche) und die Luftfeuchtigkeit während der Versuche in die Interpretation der Ergebnisse einbezogen wird. Aus den Untersuchungen mit Ar/N<sub>2</sub>-Gemischen konnte geschlossen werden, dass bereits kleine Mengen von Stickstoffbeimischungen positiven Einfluss auf die Stabilität des Jets nehmen.

#### Emissionsspektroskopie im VUV

In Abb. 15 sind beispielhaft Spektren des HF-Plasma-Jets (kINPen® 09) mit Argon als Trägergas als auch mit einem Gemisch Ar/N<sub>2</sub> gezeigt.

Im VUV-Bereich ist die vom Ar-Excimer generierte Strahlung bei 126 nm und die Linienstrahlung des Sauerstoffatoms bei 130 nm auffällig. Im UV-Bereich wird Strahlung bei 309 nm detektiert, die durch das OH-Radikal hervorgerufen wird. Im nahen Infrarot sind es in der Hauptsache Ar-Linien. Die Erzeugung des OH geschieht höchstwahrscheinlich durch Dissoziation von Wasser, welches sich im Trägergas und/oder in der Umgebung des Effluenten befindet.





Wird dem Argon etwas Stickstoff zugemischt, ändert sich das Bild insofern, als dass die Excimerstrahlung als auch die Linienstrahlung des Sauerstoffs nahezu gequencht wird, jedoch dann im UV-A- und UV-B-Bereich die Stickstoffbanden zwischen 300 nm und 400 nm erscheinen. An diesem ausgewählten Beispiel soll gezeigt werden, das durch Zumischung von Gasen zu dem eigentlichen Trägergas, die Spektren in gewissen Grenzen modifizierbar sind.

Abb. 16 zeigt die absolute spektrale Strahldichte des HF-Plasma-Jets (kINPen® 09) von 115 nm bis 220 nm in einer halblogarithmischen Skala für zwei verschiedene Spannungen bzw. ins Handstück eingespeiste Leistungen. Der Abstand zwischen dem Düsenausgang und dem MgF<sub>2</sub> Fenster entsprach der Plasmalänge und betrug bei 1.8 W ca. 6,5 mm sowie bei 3,26 W ca. 13 mm. Dominiert wird das Emissionsspektrum durch das 2. Ar-Excimerkontinuum im Bereich um 128 nm und einer Emission des atomaren Sauerstoffs bei 130 nm.

Deutlich erkennbar ist auch, dass bei dem größeren Abstand zwischen der Düse und dem  $MgF_2$ -Fenster (x = 13 mm) Teile des Spektrums absorbiert werden (sogenannte Absorptionsdips, hervorgerufen durch Sauerstoff bzw. Ozon). Das schwach auftretende Kontinuum im Bereich um 190 nm ist davon nicht betroffen und auch unabhängig von der eingespeisten Leistung bzw. der Länge des Effluenten.

Der starke Abfall des Ar<sub>2</sub>-Kontinuums oberhalb von 135 nm lässt sich mit dem Eindringen von Luft und der damit verbundenen Erhöhung des Sauerstoffanteils im Effluenten erklären.



Der molekulare Sauerstoff zeigt gerade in diesem Bereich ein Ansteigen des Absorptionskoeffizienten, dem Schumann-Runge-Dissoziationskontinuum.



Abb. 16: Gemessene absolute spektral aufgelöste VUV-Strahldichten (μW/nm mm<sup>2</sup> sr) des kINPen 09 in halblogarithmischer Darstellung für zwei verschiedene Leistungen und den entsprechenden Längen des Effluenten in die umgebende Luft.

Abb. 17 zeigt die absoluten VUV-Strahldichten in Abhängigkeit von der Leistung für verschiedene Abstände zwischen dem Düsenausgang und dem MgF<sub>2</sub> Fenster, das gleichzeitig als Target bzw. Einkoppelfenster für VUV-Strahldichtemessapparatur wirkt.



Abb. 17: VUV-Strahldichten des klNPen 09 in Abhängigkeit von der eingekoppelten Leistung ins Handstück für verschiedene Abstände zwischen Düsenausgang und dem MgF<sub>2</sub>-Einkoppelfenster der VUV-Messapparatur.



Die Abhängigkeit von der ins Handstück eingespeisten Leistung ist eher als gering zu bezeichnen, während der Abstand zwischen der Spitze des Effluenten und dem Einkoppelfenster eine größere Rolle spielt. Dies gilt aber nur für den Fall, dass die Spitze des Effluenten das Fenster nicht berührt.

Abb. 18a zeigt das radiale End-on-Profil der beiden Hauptemissionen im VUV-Bereich, das Ar-Excimer um die 128 nm und die atomare Sauerstofflinie bei 130 nm. Charakteristisch ist, dass die radialen Profile nahezu identisch sind und von einer starken Emission aus der Mitte der Kapillare geprägt werden, das heißt von dem Plasmaansatz an der Spitze der metallischen Nadelelektrode. Der axiale Verlauf dieser VUV-Emissionen (gemessen end on mittels verschiedener Abstände zwischen Düsenausgang und MgF<sub>2</sub>-Fenster) ist in Abb. 18b dargestellt. Die Länge des Effluenten beträgt ca. 8 mm und innerhalb dieser Zone ändern sich die Intensitäten nicht. Außerhalb ist ein nahezu lineares Abklingen zu verzeichnen.



Abb. 18: (a) Radiales end on Profil der Strahldichte für die prominentesten VUV- Emissionen und (b) axiale Abhängigkeit der beiden charakteristischen VUV-Emissionen von der MgF2 Fensterposition.

Mischt man nun zum Argongasstrom geringfügige Mengen Sauerstoff (1...8 sccm) hinzu, ergibt sich eine Veränderung in der spektralen Verteilung im VUV-Gebiet (Abb. 19). Die für das 2. Argonexcimerkontinuum mitverantwortlichen metastabilen Argonatome (Dreier-Stoss-Prozess mit neutralen Ar-Atomen) werden mit wachsender Sauerstoffzumischung gequencht und demzufolge wird die Intensität geringer, während im Gegensatz dazu die atomare Sauerstofflinie bei 130 nm ein Maximum durchläuft.

Um die optimale Zumischung von molekularem Sauerstoff zum Argongasstrom bezüglich der Erzeugung von atomaren Sauerstoffs (charakterisiert durch die Emission bei 130 nm) zu ermitteln, wurde diese VUV-Emission in Abhängigkeit von der O<sub>2</sub>-Zumischung gemessen und ist in Abb. 20 dargestellt.



Gearbeitet wurde mit zwei Flowcontrollern unterschiedlicher Auflösung (10 und 100 sccm), um Unsicherheiten bei der Gaszumischung zu minimieren. Als optimale O<sub>2</sub>-Zumichung hat sich eine Konzentration von 0,12% Sauerstoff zu 5 slm Argon erwiesen.



Abb. 19: Relative spektrale Strahlungsemission des klNPen 09 mit reinem Ar-Gasfluß, sowie Ar + 2 sccm Sauerstoff.



Abb. 20: Intensität der atomaren Sauerstofflinie bei 130 nm in Abhängigkeit von der O<sub>2</sub>-Zumischung zum Ar-Gasstrom.


Eine Stickstoffzumischung zum reinen Argongasfluss führt ebenfalls dazu, dass sich die Intensität des Argonexcimerkontinuums verringert und zusätzlich atomare Stickstofflinien im VUV bei 149 nm und bei 175 nm erscheinen (Abb. 21).



Abb. 21: Relative spektrale Strahlungsemission des klNPen 09 mit reinem Ar-Gasfluß , sowie Ar + 5 sccm Stickstoff

Die Abhängigkeit der Intensität der atomaren Hauptemissionslinien im VUV von der Stickstoffzumischung ist in Abb. 22 dargestellt. Die atomaren Stickstofflinien durchlaufen ein schwaches, wenig ausgeprägtes Maximum, während die Intensität der atomaren Sauerstofflinie stark abnimmt.







#### FTIR am kINPen 09

Das jetartige Plasma des kINPen® 09 kann nach dem Austritt aus der Düse mit der umgebenden Luft und der darin enthaltenen Luftfeuchtigkeit reagieren und weitere, in wasserbasierten Flüssigkeiten lösliche, längerlebige reaktive Spezies wie zum Beispiel Ozon, Stickstoffmonoxid oder auch Stickstoffdioxid bilden. Die beim Kontakt des Argonplasmas mit der umgebenden Luft auftretende Chemie kann durch geringe Beimischungen von Luft, Stickstoff oder Sauerstoff weiter beeinflusst werden. Die so gebildeten Spezies reagieren in unterschiedlichstem Maße mit organischen Materialien wie Mikroorganismen und Zellen, aber auch Polymersubstraten.

Um die längerlebigen im Plasma gebildeten Spezies untersuchen zu können, wurde eine geeignete Messzelle konstruiert und aufgebaut (siehe Abb. 23). Diese Messzelle ermöglichte von der Umgebungsluft abgeschirmte Untersuchungen, erlaubte jedoch gleichzeitig umgebungsähnliche Bedingungen einzustellen. Das Kammervolumen betrug ca. 250 cm<sup>3</sup>. Der kINPen wurde über eine entsprechende Dichtung in der Messzelle fixiert. Um eine Anreicherung des Prozessgases in der Messzelle zu verhindern, wurde dieser direkt ein etwas größerer Volumenstrom an Luft oder angefeuchteter Luft zugeführt.



Abb. 23: Messzelle mit variablem Abstand zwischen Austrittsöffnung und Substrat für ex-situ FTIR Diagnostik am kINPen

Das Substrat wurde durch ein Keramikröhrchen dargestellt und konnte in einem Abstand von 3-15mm zur Austrittsöffnung platziert werden. In dieses strömte das effluente Plasma ein und erzeugte den im FTIR-Messgerät notwendigen Gasaustausch. Die Analytik erfolgte mit einem mobilen FTIR Gerät GASMET DX4000mobil der Firma GASMET Techologies OY.



In allen Untersuchungen erfolgte eine quantitative Bewertung für Ozon und Stickstoffdioxid. Für Argon als Prozessgas (5 slm) in einer trockenen Luftumgebung (6 slm) ergab sich ein Ansteigen der Ozonkonzentration bis zu einem Abstand zwischen Austrittsöffnung und Substrat von 8 mm (siehe Abb. 24). Danach sank die Ozonkonzentration wieder ab.

Dieses Verhalten ist durch den direkten Kontakt der Umgebungsluft mit dem Argonplasma zu erklären. Verstärkt wird dieser Effekt durch den Sachverhalt, dass es sich hier um ein strömendes System handelt. Die Geschwindigkeit des Prozessgases an der Austrittsöffnung betrug rund 42 m/s, was unter Anwendung der Bernoulligleichung eine nennenswerte Druckkomponente in radialer Richtung zum Plasma hin erzeugt. Die Konzentration an Stickstoffdioxid betrug im Maximum rund 1/10 der Ozonkonzentration und nahm kontinuierlich ab.



Abb. 24: Ozon- und Stickstoffdioxidkonzentration in Abhängigkeit des Abstandes zwischen Substrat und Austrittsöffnung für Argon als Prozessgas in trockener Umgebungsluft

Wurde dem Prozessgas noch eine geringe Menge an Sauerstoff zugesetzt, so nahm die maximale Konzentration an Ozon bis zu einer Zumischung von 0,5 % zu. Dies konnte bis zu 136 ppm Ozon bestimmt werden. Wie im Fall für reines Argon konnte auch hier ausgehend von der Austrittsöffnung zunächst ein Ansteigen der Ozonkonzentration festgestellt werden. Wurde dem Prozessgas Luft statt Sauerstoff beigemischt, so stieg die Ozonkonzentration auf maximal 28 ppm, was mit reinem Argon in trockener Luft vergleichbar ist. Die Stickstoffdioxidkonzentration verdreifachte sich im Vergleich dazu, war jedoch mit ca.



7,9 ppm vergleichsweise niedrig. Geringfügig höhere Konzentrationen an Stickstoffdioxid konnten nur unter Beimischung von Stickstoff gemessen werden.

Wurde die Umgebungsluft mit einer definierten Luftfeuchtigkeit angereichert, so nahm die Ozonkonzentration für reines Argon als Prozessgas mit steigender Luftfeuchtigkeit ab. Wurde dem Argon Sauerstoff beigemischt, so nahm die Ozonkonzentration bei gleicher Sauerstoffbeimischung und steigender Luftfeuchtigkeit zu. Es konnte so für 70 % rel. Luftfeuchtigkeit mehr als 210 ppm Ozon im Effluenten ermittelt werden.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen sehr deutlich, wie stark der Einfluss von Beimischungen zum Prozessgas und die Umgebungsbedingungen die ablaufende Plasmachemie beeinflussen können. Daher ist für alle weiteren biologischen und medizinischen Untersuchungen eine klare Überwachung dieser Parameter zu empfehlen.

#### Mikrobiologische Tests

Neben der Diagnostik des HF-Plasma-Jets kINPen® 09 im VUV-Spektralbereich wurden auch Behandlungen zur Inaktivierung von Mikroorganismen (*Bacillus-atrophaeus*-Sporen) unter verschiedenen Milieubedingungen durchgeführt mit dem Ziel, den Einfluss verschiedener Faktoren aufzuzeigen. Bei einer Plasmabehandlung können Bakterien durch einzelne bzw. Kombinationen von vier bekannten Faktoren (Hitze, (V)UV-Strahlung, geladene Teilchen und neutrale Radikale) abgetötet werden. Parallel dazu erfolgte ein Monitoring der spektralen Strahlungsemission im sichtbaren und im nahinfraroten Spektralbereich zur Stabilitätskontrolle mittels eines Spektrometers von Avantes (AvaSpec-2048-USB2).

Die Parameter des HF-Plasma-Jets für die Versuchsreihe waren:

- kINPen® 09 wahlweise mit Düsen aus den Kunststoffen "Vespel", PEEK und Quarz, sowie einer Nadel als Hochspannungselektrode
- Gasfluß: 5 slm Argon, expandiert in Luft, teilweise Zumischung von Sauerstoff und Stickstoff
- Einstellung auf ca. 8 mm Jetlänge mittels Wahl des Arbeitspunktes (Strom, Spannung ins Handstück)
- Abgleich des Resonanzkreises
- "Einlaufzeit" 30 min vor Versuchsbeginn
- Arretierung 8 mm über Substrat, so dass bei einer Fensterdicke von 1 mm eine entsprechend zu spülende Schicht von ebenfalls 1 mm entstand.
- Aufnahme der spektralen End-on-Emission (400 -900 nm)





Abb. 25: Relative spektrale Verteilung des kINPen 09 im UV- und VUV-Gebiet für drei unterschiedliche Gasmischungen

Abb. 25 zeigt die V/UV-Spektren der drei unterschiedlichen Gasmischungen mit denen gearbeitet bzw. behandelt wurde. Sie dienten dazu, mit einem sehr hohen VUV-Anteil (reiner Argonfluss) bzw. mit sehr hohem UV-Anteil (Ar + 10 sccm Stickstoff) die Mikroorganismen zu behandeln. Als dritte Variante wurden vermehrt reaktive oxidierende Spezies in der Form atomaren Sauerstoffs (identifiziert durch eine ausgeprägte atomare Emissionslinie bei 130 nm) erzeugt und für eine Behandlung eingesetzt.

Um das Potenzial der emittierten VUV-Strahlung aus dem Plasma-Jet richtig einschätzen zu können, wurde die Möglichkeit genutzt, aus den gemessenen absoluten Strahldichten die Bestrahlungsstärken auf der Substratoberfläche in Abhängigkeit vom Abstand zur Düsenöffnung für verschiedene eingespeiste Leistungen, angegeben durch die eingestellten Spannungswerte, zu berechnen.





Abb. 26: Abhängigkeit der VUV-Bestrahlungsstärken vom Abstand Düse des klNPen09 zur Substratoberfläche für verschiedene Betriebsspannungen

In Abb. 26 werden die über den gesamten VUV-Spektralbereich integrierten Bestrahlungsstärkewerte angegeben. Als exponierte Fläche für die gesamte auftreffende Strahlungsleistung wurde hierbei ein kreisförmiges Gebiet mit dem Durchmesser von D = 1,6 mm angenommen. Spätere Versuche zeigten, dass die bestrahlte Fläche durchaus größer sein kann (Abb 29). Die angegebenen Werte stellen somit den möglichen Maximalwert dar. Bei einem Abstand von 8 mm zum Düsenausgang ergibt sich zum Beispiel für eine 1-minütige Exposition eine maximale Dosis von 0,24 J/cm<sup>2</sup>.

Um dies noch besser zu demonstrieren, wurde ein MgF<sub>2</sub> –Fenster mit einem speziellen nur durch VUV-Strahlung anregbaren Leuchtstoff (mangandotiertes Zinksilikat,  $Zn_2SiO_4:Mn^{2^+}$ ) auf der Unterseite präpariert und dann so zusagen mit dem Plasmajet behandelt. Gasstrom und nichtstrahlende Plasmakomponenten blockte das MgF<sub>2</sub>-Fenster ab.

Abb. 27 verdeutlicht die Dimension der Reichweite von der VUV-Strahlung im austretenden Argongasfluss auftreffend auf das Fenster bzw. auf das Substrat. Die bestrahlte Fläche ist um ein vielfaches größer als der Durchmesser des Plasmajets. Dies heißt aber auch, dass die Absorption der emittierten VUV-Strahlung im Argongasstrom (5 slm) bei einem Abstand 8 mm vom Düsenausgang zum Substrat nicht so stark ist wie erwartet. Ursache dafür ist in der spektralen Abhängigkeit des Absorptionskoeffizienten von Sauerstoff und Ozon (Hauptabsorptionskomponenten) in diesem Spektralbereich zusehen.





Abb. 27: Fotos der emittierenden Leuchtstofffläche, die nur durch die VUV-Strahlung des Jets angeregt wurde (verdeutlicht durch laterales Abdecken mittels einer Quarzscheibe)

Zur Verdeutlichung, dass es sich wirklich nur um VUV-Strahlung handelt und UV-Anregung keine Rolle spielt, wurde seitlich über das MgF<sub>2</sub>- Fenster jeweils eine runde und eine eckige Quarzscheibe gelegt, welche die auftreffenden VUV-Photonen blocken, aber für UV durchlässig sind. Die Bilder zeigen eindeutig die Abschattungen, so dass nur von einer Anregung durch VUV-Strahlung auszugehen ist.

Um den Einfluss der verschiedenen Plasmakomponenten wie VUV-Strahlung, UV-Strahlung und primärer Radikale, sowie sekundärer Radikale aus dem umgebenden Milieu zu separieren wurde eine spezielle Probenkammer zur Plasmabehandlung gebaut. Abb. 28 zeigt den schematischen Aufbau.

Die Kammer bestand aus einem verschiebbaren Probenhalter, der im Abstand von 1 mm zur unteren Fensterfläche justiert war. Als Bezugsgröße oder Referenz wurde vor jeder Behandlung jeweils eine Plasmabehandlung der Mikroorganismen ohne Fenster durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgte dann die Behandlung unter geänderten Bedingungen, wie zum Beispiel via MgF<sub>2</sub>-Fenster oder Quarzfenster, wobei die Proben in der Kammer mit verschiedenen Gasen umspült werden konnten.





Abb. 28: Schematischer Aufbau der Probenkammer zur Behandlung von Bacillus-atrophaeus-Sporen unter verschiedenen Milieubedingungen

Aus mikrobiologischer Sicht wurden als Testobjekt *Bacillus-atrophaeus*-Sporen ausgewählt. Sie wurden 1:10 aus einer 10<sup>9</sup> KBE/ml Stammsuspension verdünnt und davon jeweils 1 µl mittels Vorrichtung sorgfältig mittig auf den PE-Prüfkörper getropft und angetrocknet. Die Parameter waren:

- PE-Plättchen (D=10 mm), belegte Fläche D ~ 1 mm, ca. 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> KBE/Plättchen
- 5 Proben pro Behandlungszeit; 5 Proben pro Versuch als Kontrolle

Jede Versuchsreihe startete mit einer Plasmabehandlung als Referenz für jeden Versuch bei einem Abstand von 8 mm ohne Zwischenfenster. Nach der Plasmabehandlung (PB) wurden die Proben in 10 ml PBS/Tween 0,1% ausgeschüttelt und nach dem Spatelplattenverfahren weiter ausgewertet.





Abb. 29: Vergleich der Inaktivierungskurve von *Bacillus-atrophaeus*-Sporen nach einer Plasmabehandlung in reiner Ar-Atmosphäre und nach reiner VUV-Bestrahlung aus dem Jet. Die vertikale Achse gibt die absolute Anzahl der überlebensfähigen Sporen an

Abb. 29 zeigt die Ergebnisse für das Überleben der Bac. atrophaeus Sporen, angegeben in koloniebildenden Einheiten (KBE bzw. cfu) nach der Plasmabehandlung mit dem Jet im reinem Argongasfluss und einer Behandlung mit der emittierten VUV-Strahlung aus dem Jet durch ein MgF<sub>2</sub>-Fenster, wobei die Proben sich in einer Ar-Atmosphäre befanden. Die Behandlungszeiten wurden zwischen 1 min und 5 min variiert. Die Messpunkte ergeben sich als Mittelwerte von jeweils 5 Probenbehandlungen mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. Als ein Ergebnis ist anzusehen, dass zwei Phasen für die Inaktivierung der Sporen zu unterscheiden sind. Zu Beginn der Behandlung (nach 1 min) sowohl mit Plasma als auch mit VUV-Photonen existiert eine höhere Abtötungsrate als für Zeiten danach. Dies wurde auch von anderen Autoren beschrieben. Als wesentliches Ergebnis ist aber anzusehen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Plasma- und VUV-Behandlung gefunden werden konnte. Dies bedeutet, dass der hohe emittierte VUV-Strahlungsanteil aus dem HF-Plasma-Jet, betrieben nur mit Argon, für das Abtöten der Sporen verantwortlich ist. Das Problem der vollständigen Absorption der breitbandigen Argon-Excimer-VUV-Strahlung um 126 nm auf dem Weg zum Substrat durch eindringende Umgebungsluft und hier insbesondere durch Sauerstoffmoleküle ist in diesem Falle vernachlässigbar.

Zur besseren Verdeutlichung der Wirkung des VUV-Anteils an der Strahlungsemission wurde dieses Experiment wiederholt, nur mit dem Unterschied, dass an der Stelle des MgF<sub>2</sub>-Fensters ein Quarz-Fenster aus Suprasil verwendet wurde. Dadurch wird die auf das



Substrat treffend VUV-Strahlungsemission geblockt und nur der UV-Anteil durchgelassen. Das Ergebnis ist in Abb. 30 dargestellt.



Abb. 30: Überlebenskurven von Bac. atrophaeus Sporen nach einer Plasmabehandlung in reiner Ar-Atmosphäre und nach reiner UV-Bestrahlung mit dem Jet als Strahlungsquelle

Deutlich erkennbar der Unterschied zwischen den beiden Probenbehandlungen. Die Effektivität der Inaktivierung durch die Bestrahlung mit dem Plasmajet via Quarzfenster ist wesentlich geringer, bedingt durch den geringen UV-Anteil in der spektralen Verteilung der Emission des kINPen®09 im reinen Ar-Betrieb (siehe Abb. 25)

Um den Einfluss des Probenmilieus auf das Überleben der Sporen zu testen, wurde die Probenkammer mit dem MgF<sub>2</sub>-Fenster abgedeckt und anstelle von Argon jeweils mit Luft bzw. mit Sauerstoff gespült. Abb. 31 zeigt die Ergebnisse der Exposition der Proben mit der Strahlung aus dem Jet im Vergleich zur Plasmabehandlung als Referenz.

Die höchste Effektivität erreicht die Inaktivierung bei der Bestrahlung der Proben mit VUV-Photonen in der 1 mm dicken Sauerstoffatmosphäre. Ursachen liegen u.a. in der Erzeugung von Sauerstoffradikalen (hier z. B. als atomarer Sauerstoff im O P<sup>3</sup> -Zustand und Ozon) in Probenumgebung durch die partielle Absorption der breitbandigen VUVder Excimerstrahlung. Des weiteren können Teile des emittierten VUV-Spektrums, insbesondere die vom Ar-Excimerkontinuum, die Probenoberfläche erreichen, da der Absorptionskoeffizient von Sauerstoff in diesem Spektralbereich stark mit der Wellenlänge schwankt (sogenannte Absorptionsfenster), wie durch spektral aufgelöste Messungen des Photoabsorptionsquerschnittes nachgewiesen werden konnte.





Abb. 31: Einfluss der Probenkammeratmosphäre (Sauerstoff, Luft) auf das Überleben der Bacillusathrophaeus-Sporen in Abhängigkeit von der Behandlungszeit



Abb. 32: Vergleich der zeitlichen Sporen-Inaktivierungsverläufe nach einer Plasmabehandlung und einer VUV-Behandlung unter Einsatz der Arbeitsgases Ar mit einer Zumischung von 0,12% Sauerstoff im Gasfluss des Jets. Angegeben ist die Mittelwert der überlebenden koloniebildenden Einheiten (mean cfu) mit einem normierten Ausgangswert

Mischt man zum Standardarbeitsgas Argon einen bestimmten Anteil Sauerstoff hinzu (optimal 6 sccm bzw. 0,12%), um atomaren Sauerstoff als wirkendes Radikal zu erzeugen, ergeben sich die in Abb. 32 dargestellten Inaktivierungsverläufe in Abhängigkeit von der



Expositionszeit. Die optimale Sauerstoffzumischung zur Erzeugung von atomarem Sauerstoff wurde anhand der Emission des Sauerstofftripletts O I = 130 nm ( ${}^{3}P - {}^{3}S^{\circ}$ ) ermittelt (siehe auch Abb. 20). Angegeben ist der Mittelwert der überlebenden koloniebildenden Einheiten (mean cfu) mit einem normierten Ausgangswert. Als Referenz diente wieder eine Plasmabehandlung mit reinem Argongas (ohne Zumischung). Um auch hier die Wirksamkeit, der vom Jet emittierten VUV-Strahlung, (siehe spektrale Emission in Abb. 19) zu zeigen, wurde die Behandlungskammer mit einem MgF<sub>2</sub>-Fenster abgedeckt. Die experimentellen Daten zeigen, dass die Inaktivierungseffektivität des Argon-Sauerstoff-Plasmajets besser ist als die vom Argon-Jet bzw. der VUV-Behandlung basierend auf der Emission des Argon-Sauerstoff-Plasmajets. Ursache dafür ist, dass neben der auftreffenden VUV-Strahlung auch der mit der Zumischung entstehende atomare Sauerstoff als reaktive oxidative Spezies seine Wirkung entfalten kann.

#### II.1.1.2 Volumen – DBE

In Abb. 33 ist sowohl der schematische Aufbau, als auch das Photo eines Reaktors einer dielektrisch behinderten Volumenentladung (Volumen-DBE) dargestellt. Im Prinzip besteht der Reaktor aus einem über ein Peltierelement gekühlten Edelstahlboden (geerdete Elektrode), einer darüber befindlichen Petrischale, in der sich das zu behandelnde Objekt (Flüssigkeit, Festkörper) befindet, einem Gasraum und einer gegen den Gasraum isolierten Streifenelektrode, an der die niederfrequente Hochspannung (kHz-Bereich) liegt. Über einen Gaseinlass wird Argon mit einer niedrigen Flussrate (0,2 slm) in die Petrischale geleitet und durch Anlegen einer entsprechend hohen Spannung (3-15 kV) an die Streifenelektrode ein Plasma gezündet. Der Reaktor wird mit einer sinusförmigen Spannung bei einer Frequenz von 30 kHz betrieben. Die Leistungen liegen bei Spannungen von 8,5 und 9 kV<sub>ss</sub> im Bereich von 4,7 und 6,1 Watt.

Der Reaktor ist in erster Linie für die Behandlung von Flüssigkeiten entwickelt worden. Dabei bildet die Flüssigkeit zusammen mit dem Boden der Petrischale und der Isolation vor der Streifenelektrode das Dielektrikum in dieser DBE. Sie befindet sich damit im Entladungsvolumen, weshalb die Bezeichnung "Volumen-DBE" gewählt wurde. Zur Minimierung eines Flüssigkeitsverlustes (Austrocknung) wird der Gasfluss gering gehalten, die Entladung gepulst betrieben und eine Kühlung der Petrischale über ein Peltierelement vorgenommen.





Abb. 33: Prinzip und Reaktor einer Volumen-DBE

# II.1.1.3 Oberflächen-DBE

Abb. 34 schematisch der Grundaufbau dielektrisch behinderten In ist der Oberflächenentladung (Oberflächen-DBE) gezeigt. Die Elektroden dieser Anordnung befinden sich jeweils auf einer Seite eines flächigen Dielektrikums. Eine der Elektroden ist als Streifenmuster (Ringmuster) und die andere als geschlossene, flächige Elektrode ausgebildet. Wird zwischen beiden Elektroden eine genügend hohe Wechselspannung angelegt, kommt es auf den freien Flächen der "Streifenmuster"-Elektrode zur Ausbildung einer Entladung und damit eines Plasmas mit einer geringen Ausdehnung (≤ 1mm). Über Abstandshalter (in der Abb. 36 Adaptor screw (1)) kann dann diese Anordnung über das zu behandelnde Medium positioniert werden. Betrieben wird die Entladung mit niederfrequenten Wechselspannungen (2kHz, 6-10 kV, auch gepulst) vorzugsweise an Luft als Entladungsmedium.





Abb. 34: Schematischer Aufbau der Oberflächen-DBE

#### II.1.1.4 Mono-Elektroden-DBE

In Abb. 37 ist im rechten Teil der Abbildung schematisch die Mono-Elektroden-DBE und im linken Teil ein Photo der Elektrode mit dem sich ausgebildeten Luft-Plasma über einem bebrüteten Ei im HET-CAM-Test gezeigt. Die Elektrode besteht aus einem 2 mm starken Kupferdraht, der von einer SiO<sub>2</sub>-Keramik (4mm Außendurchmesser) umgeben ist. Eine ähnliche Elektrode ist für Untersuchungen in der Gruppe von Fridman an der Drexel University, Philadelphia, USA (schwarze Zahlen in Abb. 35 rechts) eingesetzt worden.

Bei einer solchen Anordnung fungiert das zu behandelnde Target als Gegenelektrode. Betrieben wird diese DBE bei 31-33 kHz mit Spannungen zwischen 11 und 13  $kV_{ss}$ , sowohl im kontinuierlichen als auch im gepulsten Modus.

In Tabelle 1 sind für einen Abstand von 0,5 mm zwischen Elektrode und einer metallischen Gegenelektrode in Abhängigkeit von der Elektrodenspannung die in das Plasma eingekoppelte elektrische Leistung, die umgesetzte thermische Leistung und die Temperaturen angegeben.



Tab. 1 Elektrische Leistung, thermische Leistung und Temperaturen in Abhängigkeit von	der
Elektrodenspannung bei einem Elektrodenabstand von 0,5mm	

U <sub>ss</sub> / kV	T /°C	P <sub>therm</sub> /W	P <sub>elektr.</sub> / W
11	58	0,105	0,74
12	69	0,184	1,17
13	80	0,221	1,62





Quelle: G. Fridman et al., Plasma Chem Plasma Process 26 (2006)

Abb. 35: Mono-Elektroden-DBE ( schematisch und im HET-CAM-Test)

#### II.1.1.5 Hohlelektroden-DBE

Zur Behandlung von Objekten in z.B. 96-Well-Mikrotiterplatten wurde eine dielektrisch behinderte Entladung (DBE) mit 6 parallel geschalteten Hohlelektroden entwickelt. Diese auf hohem Potential liegenden Elektroden bilden mit dem Boden der Mikrotiterplatte und einer darunter angeordneten, über ein Peltierelement kühlbaren Kupferplatte als geerdete Elektrode eine DBE-Anordnung. Durch die Hohlelektrode wird Ar-Gas mit einer Flussrate von 6 slm in die Kammern geleitet, so dass die Entladung in diesem Medium stattfindet. Angesteuert werden die Entladungen über einen Generator und einem Hochspannungstrafo bei einer Frequenz von 37 kHz und 8kV<sub>ss</sub>. Bei Spannungen von 8,5 bis 9,5 kV<sub>ss</sub> variiert die elektrische Leistung zwischen 3,9 und 4,8 W.



In Abb. 36 ist auf der linken Seite ein Photo des Reaktors zu sehen. Auf der rechten Seite sind die Entladungskanäle bei unterschiedlichen Eindringtiefen (Elektrodenabständen) gezeigt.





Abb. 36: Hohlelektroden-DBE



#### II.1.1.6 Flächen-DBE (Conplas)

In Abb. 37 ist schematisch der Grundaufbau des auf dem Prinzip einer dielektrisch behinderten Entladung (DBE) basierenden Conplas-Plasmas dargestellt. Eine isolierte Hochspannungselektrode ist zum Teil von einer geerdeten Elektrode umgeben. Das Trägergas wird seitlich in das unbedeckte Gebiet herangeführt und erzeugt bei einer genügend hohen Spannung ein Plasma in diesem Bereich.

In Abb. 38 ist jeweils ein Photo der Elektrodenanordnung, sowie des Conplas-Handgerätes gezeigt.



Abb. 37: Schematischer Grundaufbau des Conplas-Plasmas



Abb. 38: Elektrodenanordnung und Conplas-Handgerät

Die Spannungsversorgung der Hochspannungselektrode erfolgt über einen Sinusgenerator und einem entsprechendem Hochspannungstrafo. Die Frequenz der Hochspannung (1 kV<sub>ss</sub> bis 12 kV<sub>ss</sub>) liegt im kHz-Bereich. Ein Betrieb im burst-mode ist ebenfalls möglich. Leistungsmessungen nach der Lissajous-Methode ergaben folgende Ergebnisse: Bei einer Frequenz von 30 kHz und einer Hochspannung von 8 kV<sub>ss</sub> werden 12,25 W zur Erzeugung des Plasmas umgesetzt. Bei einem burst-mode von 250 ms "an" und 750 ms "aus" sind es bei gleicher Spannung 3,06 W.



Bei U = 7,4 kV	P = 10,4 W	$P_{burst}$ = 2,6 W
Bei U = 7 kV	P = 8,7 W	P <sub>burst.</sub> = 2,18 W

Als Betriebsgase fungieren in der Hauptsache Luft, N<sub>2</sub>, Ar, Formiergas (N<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>) und Varigon (Ar+ H<sub>2</sub>) bei Durchflussraten von 2 slm bis 30 slm.

# II.1.1.7 DC-Koronaentladung (hairlIN<sup>e</sup>Plasma)

Die nach dem physikalischen Prinzip einer Gleichspannungs-Koronaentladung arbeitende Plasmaguelle (*hairl*IN<sup>e</sup>P*lasma*) ist in der schematischen Darstellung in Abb. 39 gezeigt.





- Spannung: U = 5 14 kV neg. DC
- Strompuls: Imax = 0.4 2.3 Å, FWHM = 9.8 ns
- Gasfluss: Q = 150 500 sccm Argon
- ➢ Frequenz: f = 0,5 − 3 kHz
- mittlere Leistung: P = 0.1 0.5 W

Abb. 39: Prinzipaufbau des hair/IN<sup>e</sup>Plasmas und technische Daten

Die Kanüle einer Injektionsspritze ist mit dem Minuspol einer hochohmigen Hochspannungsquelle verbunden und stellt somit die Katode in diesem System "Spitze gegen Platte" dar. Die Anode (Platte) ist entweder eine metallische, geerdete Platte oder die Hautoberfläche des menschlichen Körpers. Die Katode steckt in einer Kapillare, die einen Gaskanal darstellt. Argon diente zunächst als Trägergas und wird mit einer Durchflussrate



von 150 – 500 sccm durch die Kanüle geleitet. Bei Katodenspannungen von 5 – 14 kV entsteht ein Plasmafaden mit einer sehr geringen radialen Ausdehnung von etwa 30 µm und ist somit besonders prädestiniert in enge Kavitäten, wie z. B. Zahnwurzelkanäle (siehe Abb. 42), einzudringen. Der inhärente Mechanismus dieser negativen Koronaentladung bedingt, trotz Betrieb mit einer Gleichspannung, eine gepulste Entladung im Frequenzbereich – abhängig vom Elektrodenabstand, und zur Höhe der Versorgungsspannung - zwischen 0,5 und 3 kHz mit Stromhalbwertsbreiten von 10 ns und Impulsströmen von 0,4 bis 2,3 A. Diese Quelle wurde umfänglich charakterisiert. In Abb. 40 sind beispielhaft ein Spektrum und der Verlauf des Stromimpulses gezeigt.



Abb. 40: Spektrum und Stromimpuls des hairlIN<sup>e</sup>Plasmas

Bedingt durch die geringe Temperatur des Plasmas (304 K siehe Abb. 41) und dem geringen Leistungseintrag kommt es bei Berührung mit der menschlichen Haut zu keinen Irritationen. Eine antimikrobielle Wirkung konnte mit dem Testkeim *Escherichia coli* nachgewiesen werden. Das Labormuster (Vorrichtung) (siehe Abb. 42) wurde zum Patent angemeldet.





Abb. 41: Temperaturbestimmung aus Linienintensitäten.





Abb. 42: Labormuster des *hairl*IN<sup>e</sup>P*lasma*s und *hairl*IN<sup>e</sup>P*lasma* imWurzelkanal eines aufgeschnittenen Zahns



# II.1.1.8 HF-Kanülen - Kapillarentladung (six-pINPlas-net, six-pINPlas-bat)

Mit der Forderung nach einem flächigen Plasma wurde eine Quelle entwickelt, die aus 6 nebeneinander angeordneten Kapillaren besteht. Der grundsätzliche Aufbau ist in Abb. 43 dargestellt.



Der angeschliffene Teil einer 2,5 mm starken Edelstahlkanüle ragt in den 4mm langen Kanal (Durchmesser 1,6 mm) einer Kunststoffkapillare (PEEK). Die Edelstahlkanüle fungiert als Hochspannungselektrode, eine geerdete Ringelektrode auf dem Dielektrikum bildet die Gegenelektrode. Mit einer Versorgungsspannung von 2 kV<sub>ss</sub> und 860 kHz entsteht an der Spitze der angeschliffenen Elektrode 1 ein Plasma, welches dann mit dem Gasstrom aus der Kapillare austritt. Die Ansteuereinheit ist ähnlich der, die für den kINPen eingesetzt wird. Jede der sechs Kapillarentladungen wird einzeln angesteuert. Der Gasverbrauch liegt bei 8 bis 10 slm Argon. Ein gepulster Betrieb ist ebenfalls möglich. In Abb. 44 ist ein Labormuster der *six*-pINP*las-net* - Quelle gezeigt.



Abb. 44: Labormuster der six-pINPlas-net - Quelle

Campus PlasmaMed I Abschlussbericht



Eine batteriebetriebene mobile Version (*six*-pINP*las-bat*), allerdings mit einer Paralellansteuerung der Elektroden, ist in Abb. 45 gezeigt. Mit einem Lithium-Polymer-Akku (2100mAh, 12V) ist ein Betrieb über 2 Stunden möglich.



Abb. 45: Labormuster der six-pINP las-bat - Quelle

## II.1.1.9 HF- Maxi-Plasma-Jet (paINPlas)

Nach einem ähnlichen Prinzip, wie die unter II.1.1.8 beschriebene Quelle, arbeitet der HF-Maxi-Plasma-Jet (*pa*INP*las*). In einer Keramikhülse ( $\emptyset_{innen} = 4,5 \text{ mm}$ ,  $\emptyset_{außen} = 7,5 \text{ mm}$ ) ist zentriert ein 0,5 mm dicker Edelstahldraht gehaltert, der als Hochspannungselektrode fungiert. Als Gegenelektrode dient wiederum ein geerdeter Ring am Ende auf der Hülse. Die Quelle arbeitet mit den Edelgasen Argon und Helium (15 – 20 slm) und ist auch gepulst zu betreiben. Bei Spannungen von 2,5 bis 3,5 kV und einer Frequenz von 900 kHz entsteht ein Jet mit einer Länge von 4 cm.

In Abb. 46 ist ein Photo der Quelle und des Effluenten gezeigt.





Abb. 46: Labormuster vom HF- Maxi-Plasma-Jet (palNPlas)



## II.1.1.10 LF-Elektrodenlose-Kapillarentladung (*I*IN<sup>e</sup>P*las*)

Das Grundprinzip einer flächigen, elektrodenlosen (Elektroden haben keinen Kontakt mit dem Plasma) im niederfrequenten (LF - low frequency) Bereich arbeitenden Plasmaquelle ( $IN^ePIas$ ) ist in Abb: 47a dargestellt. 29 SiO<sub>2</sub> - Kapillaren sind nebeneinander versetzt in zwei Edelstahl-Elektrodenstreifen (52 × 8 × 2 mm<sup>3</sup>) angeordnet. Ein 5 mm dickes Dielektrikum (PEEK) isoliert die beiden Elektroden gegeneinander. Über einen Hochspannung erzeugenden Zeilentrafo und einem entsprechender Generator werden die Kapillaren im Kiloherzbereich (15-30kHz) mit einer Sinusspannung angesteuert. Arbeitsgase sind Helium und Helium-Molekülgasgemische. Die Quelle ist auch gepulst (burst-mode) zu betreiben. Bedingt durch diese "elektrodenlose" Anordnung sind die Elektroden vom Gasraum getrennt, so dass es zu keiner Elektrodenerosion kommen kann. Abb. 47b zeigt ein Photo dieser Quelle.



Abb. 47: Prinzip (a) und Photo (b) von der IN<sup>e</sup>Plas – Plasmaquelle

#### II.1.1.11 LF-Elektrodenlose-Kapillar-DBE-Entladung (joINPlas)

In etwas abgewandelter Art zu der unter II.1.1.10 beschriebenen Kapillarentladung wurde eine Quelle entwickelt, die sowohl im Bereich der Kapillarentladung, als auch im vorderen Teil der Elektrode  $E_2$  eine DBE darstellt (Abb. 48). Es sind hier 13 SiO<sub>2</sub> – Kapillaren kreisförmig zwischen zwei Elektrodenscheiben  $E_1$ ,  $E_2$  ( $\emptyset$  = 30mm) angeordnet. Beide Elektroden sind durch ein 5 mm starkes Dielektrikum voneinander isoliert. Ein zusätzliches Dielektrikum befindet sich auf der Elektrode  $E_2$ , auf dem ein Ring als Abstandshalter aufgebracht ist. Über einen Schalter sind drei Betriebsarten an dieser Quelle einstellbar. Wechselseitig sind die Elektroden geerdet oder liegen auf Hochspannungspotential. In der Schalterstellung 0 liegen beide Elektroden hoch, wobei ihre Sinusspannungen um 180° phasenverschoben sind. In diesem Modus bildet sich dann ein Plasma zwischen  $E_2$ , dem Dielektrikum auf  $E_2$  und einem davor befindlichen, geerdeten Körper aus. Der Ring auf dem



Dielektrikum wirkt zum einen als Abstandshalter, zum anderen verursacht er, wenn der geerdete Körper dicht genug platziert ist, einen Gasstau des verwendeten Arbeitsgases, so dass sich hier die DBE zwischen E<sub>2</sub> und dem geerdeten Körper effizienter ausbilden kann. Betrieben wird diese Quelle wiederum über einen Generator und Zeilentrafo im Kiloherzbereich (13 kHz). Helium und Helium-Molekülgasgemische werden als Betriebsgase eingesetzt.



Abb. 48: Prinzip (a) und Photo (b) von der joINPlas- Plasmaquelle

# II.1.1.12 Mikrowellen-Quelle des FBH

In Abb. 49a ist ein Photo von der Mikrowellenquelle des Ferdinand-Braun-Institutes, Leibniz-Institut für Höchstfrequenztechnik Berlin (FBH) zu sehen. Sie arbeitet bei 2,45 GHz und wird mit einem 24V-Netzteil betrieben. Vom INP wurde das in Abb. 49a gezeigte Labormuster emissionsspektroskopisch im UV und VIS-Bereich für die Gase Stickstoff und Argon untersucht. Ebenfalls erfolgten axiale und radiale Temperaturmessungen im Effluenten des N<sub>2</sub>-Plasmas. Im Fall von Argon als Betriebsgas bildete sich kein Plasma außerhalb des Resonators aus.

In Abb. 51b werden die Spektren für Argon und Stickstoff von 300 bis 900 nm für eine Gasdurchflussrate von 1 slm gezeigt. Das Ar- Spektrum bezieht sich auf das Plasma innerhalb des Resonators, da sich kein Jet ausbildete. Identifiziert wurde das angeregte OH-Radikal bei 308 nm und Ar - Linien im nahen Infrarot. Im Falle vom Stickstoff werden insbesondere die  $N_2$ -Banden im UVA und UVB detektiert.

In Abb. 50 sind die axialen und radialen Temperaturverläufe für Stickstoff bei Variation der vom Gleichspannungsnetzteil gelieferten Leistung gezeigt.





Abb. 49: a) Foto FBH-Quelle, b) Spektren in Ar und N2



Abb. 50: Axialer (a) und radialer (b) Temperaturverlauf in Abhängigkeit von der Netzteilleistung



# II.1.1.13 Zusammenfassung

Im Ergebnis der im Leitthema PlasmaQuellen koordinierten Arbeiten wurden mehrere unterschiedliche Plasmaquellen entwickelt, gebaut und den Partnern im Campus PlasmaMed in einem neu im INP errichteten plasmamedizinischen Labor zur Verfügung gestellt. Einige dieser Quellen basieren auf der Erzeugung eines HF-Plasma-Jets (kINPen® 08/09, HF- Maxi-Plasma-Jet (*pa*INP*las*), wobei diese auch gepulst betrieben werden können (burst-mode) und damit der mittlere Energieeintrag in das zu behandelnde Objekt steuerbar ist. Die anderen Quellen (Volumen-DBE, Oberflächen-DBE und CONPLAS, Mono-Elektroden-DBE, Hohlelektroden-DBE, HF-Kanülen - Kapillarentladung (*six*-pINP*las-net, six*-pINP*las-bat*), LF-Elektrodenlose-Kapillar-DBE-Entladung (*jo*INP*las*) funktionieren auf dem Prinzip der dielektrisch behinderten Entladung (DBE) im kHz-Bereich.

Eine weitere Plasmaquelle (Hairline-Plasma) konnte entwickelt werden, die nach dem physikalischen Prinzip einer Gleichspannungs-Koronaentladung arbeitet. Dieses Plasma zeichnet sich durch eine sehr geringe radiale Ausdehnung (30µm) aus und ist besonders prädestiniert in enge Kavitäten, wie z. B. Zahnwurzelkanäle, einzudringen. Diese Quelle wurde umfänglich charakterisiert. Bedingt durch die geringe Temperatur des Plasmas und den geringen Leistungseintrag kommt es bei Berührung mit der menschlichen Haut zu keinen Irritationen. Eine antimikrobielle Wirkung konnte mit dem Testkeim *Escherichia coli* nachgewiesen werden. Das Labormuster (Vorrichtung) wurde zum Patent angemeldet.

Des Weiteren wurde ein Reaktor zur Behandlung von Mikroorganismen unter verschiedenen Umweltbedingungen entwickelt und mit ersten Vorversuchen begonnen. Diese Studie dient der Aufklärung des Einflusses von verschiedenen Jetkomponenten, wie VUV-, UV-Strahlung sowie primärer bzw. sekundärer Radikale auf das Überleben von Mikroorganismen (*Escherichia coli, Bacillus-atropheus*-Sporen). Es konnte gezeigt werden, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Behandlung mit einem Jet-Plasma oder nur mit der VUV-Strahlung aus dem Jet gibt.

Zur Reduktion von Sporen von *Bacillus atropheus* wurde eine spezielle Oberflächen-DBE -Anordnung eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Keime stark von der Luftfeuchtigkeit abhängig war und mit steigender Luftfeuchtigkeit zunahm. Oberhalb von 50% rel. Luftfeuchtigkeit konnte ein deutlicher Anstieg des Reduktionsverhaltens verzeichnet werden, was auf die vermehrte Bildung von Hydroxylradikalen zurückzuführen ist. Die in das Plasma dieser Anordnung eingekoppelte Leistung wurde mittels der Lissajou-Methode bestimmt. Die Zyklusenergie bei 24 kV<sub>SS</sub> betrug 5,5 mJ was für das verwendete Pulsmuster einer mittleren Plasmaleistung von rund 100 mW/cm<sup>2</sup> entspricht. Unter den somit



verwendeten Bedingungen konnte die Temperatur des Substrates unter 30°C gehalten werden.

Zur Charakterisierung der generierten Plasmen wurden die optische Emissionsspektroskopie vom VUV- bis in den nahen Infrarotbereich, FTIR, Kurzzeitphotographie sowie verschiedene Temperatur- und elektrische Messtechniken eingesetzt.

Ein wichtiges Ergebnis dabei ist, dass über kalorimetrische Messungen in der Plasmaspitze des Atmosphärendruck-Plasmajets Wärmeenergien in Höhe von 150 mW nahezu unabhängig von der Eingangsleistung (2-5 W) gemessen wurden. Ein gleiches Verhalten zeigten die Temperaturwerte in der Spitze des Plasma-Jets, wo im nicht gepulsten Plasma Temperaturen um die 48°C ermittelt wurden. Durch Pulsung des Jets konnte die Plasmatemperatur auf unter 30°C gesenkt werden. Damit konnte eine wichtige Forderung der potentiellen Anwender aus dem medizinischen Bereich erfüllt werden.

Die spektroskopischen Messungen zeigten, dass im Ar-Jet im VUV-Bereich insbesondere Strahlung des gebildeten Ar-Excimers bei 126 nm auftritt und im UV-Bereich, bedingt durch Wasser im Trägergas oder dadurch, dass der Jet mit der Umgebungsluft in Wechselwirkung tritt, angeregte OH-Moleküle entstehen, die Strahlung bei einer Wellenlänge um 309 nm aussenden. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass durch Zumischen von anderen Gasen zu dem eigentlichen Trägergas Argon, das gesamte Spektrum vom VUV bis ins nahe Infrarot im gewissen Maße modifizierbar ist.

So konnte gezeigt werden, dass die Zumischung von Sauerstoff das Ar-Excimer quencht und die Emission des atomaren Sauerstoffs bei 130 nm ein Maximum zwischen 0.1 % und 0,2 % durchläuft. Eine Stickstoffzumischung verstärkt die atomaren Stickstofflinien bei 120 nm, 149 nm und 175 nm. Die absolute Strahldichte im gesamten VUV-Spektralbereich hängt stärker vom Abstand Jetausgang-Substratoberfläche ab, als von der ins Handstück eingespeisten Leistung und wurde für Argon an Luft bei 4 mm Abstand mit 4,5 mW/mm<sup>2</sup> sr bestimmt.

Um die für die Applikation, besonders im dermatologischen Bereich, wichtige Größe der Bestrahlungsstärke (W/cm<sup>2</sup>) auch im VUV-Spektralbereich zu ermitteln, ist normalerweise eine kalibrierte VUV-Lampe notwendig. Da alle bisher bekannten Bestrahlungsstärkenormale als untere Wellenlängegrenze 200 nm angegeben, musste aus der gemessenen absoluten Strahldichte die Bestrahlungsstärke für die Kombination Jetausgang-Substrat berechnet werden. Mittels eines einfachen Modells konnte so die VUV-Bestrahlungsstärke im Bereich von 115 nm bis 180 nm ermittelt werden. Die berechneten VUV-Bestrahlungsstärken liegen in Abhängigkeit von der eingespeisten Leistung und dem



Abstand zwischen Jetausgang und Substratoberfläche im Bereich von 2 mW/cm<sup>2</sup> bis 9 mW/cm<sup>2</sup>.

Ein anderer Schwerpunkt im Bereich der emissionsspektroskopischen Untersuchungen im UV-Bereich am kINPen® war die Charakterisierung der UV-Emission des OH-Radikals, welches eine große Rolle in einer Vielzahl physiologischer Vorgänge spielt. In den vorangegangenen Untersuchungen war eine deutliche Verminderung der OH-Emissionsintensität (308 nm) während des Betriebs des Jets mit reinem Argon festgestellt worden. Es konnte nun gezeigt werden, dass durch Beimischung geringer Mengen von Sauerstoff die Bildung von angeregtem OH stark reduziert wird. Auf der anderen Seite lässt sich durch gezielte Befeuchtung des Argon - Gasstromes eine Stabilisierung der OH-Emission auf einem hohen Niveau erzielen. Damit ist die Möglichkeit gegeben, einen stabilen Betrieb des kINPen® zu gewährleisten.

Die Bestimmung der UV-Bestrahlungsstärke am Ort der Plasma-Applikation stellte eine weitere Aufgabe im Rahmen einer Risikoabschätzung dar. Hierzu wurden die Bestrahlungsstärken in Abhängigkeit von der Gaszusammensetzung (Argon und Beimischungen von Stick- und Sauerstoff), von der ins Plasma eingekoppelten Leistung, sowie vom Abstand zwischen kINPen® und Substrat ermittelt.

Des Weiteren erfolgte eine emissionsspektroskopische Temperaturbestimmung am Effluenten des kINPen®. Diese Methode kann zur Ergänzung der faserspektroskopischen bzw. Sonden-basierten Temperaturmessung dienen und bietet insbesondere Vorteile bei kleinen Temperaturunterschieden zwischen dem Effluenten und der Umgebungsluft.

Mittels FTIR-Analytik konnten am kINPen®, die durch das Plasma gebildeten stabilen Spezies wie zum Beispiel Ozon und Stickstoffoxide in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen quantitativ bestimmt werden. In trockener Umgebungsluft konnten in der Nähe der Spitze (Abstand ca. 10mm) des aus einem Ar-Jet austretenden Plasmas bis zu 55 ppm Ozon nachgewiesen werden. Wird der Ar-Jet in feuchter Umgebungsluft (30-70 % rel. Luftfeuchte) betrieben, so sinkt die maximale Konzentration an Ozon in der Spitze auf 15 bis 22 ppm ab, was auf eine Veränderung der im Plasma stattfindenden Chemie hindeutet.

Es konnten mit weniger als 2 ppm sehr geringe Konzentrationen an Stickstoffdioxid nachgewiesen werden, was auf die geringe Temperatur des Ar-Jets zurückzuführen ist



# II.1.2 Leitthema PlasmaPharm

Im Leitthema PlasmaPharm sollten Plasmaverfahren für die schonende Behandlung von pharmazeutischen Schüttgütern (z.B. getrockneten Arzneidrogen) und kleinen Flüssigkeitsvolumina erarbeitet werden. Auf dem Gebiet der Schüttgüterdekontamination hat sich gezeigt, dass der Forschungsbedarf hier deutlich höher als erwartet ist und ein kurzfristig verwertbares Dekontaminationsverfahren nicht erwartet werden konnte. Mit dem Zwischenmeilenstein im November 2009 wurde daher vom Projektträger empfohlen, dieses Gebiet im Sinne einer Fokussierung des Campus PlasmaMed nicht weiter zu bearbeiten. Aufgrund des generellen Interesses für den gesamten Campus PlasmaMed sollten sich im verbleibenden Förderzeitraum die Arbeiten auf die Flüssigkeitsbehandlung konzentrieren. Die Vertiefung der Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen Plasma und Flüssigkeit wurde aufgrund der starken inhaltlichen Kopplung im Leitthema PlasmaSept fortgeführt. Das Leitthema PlasmaPharm wurde mit Beginn des Jahres 2010 als selbständiges Leitthema aufgelöst. Daher werden an dieser Stelle nur die bis zum Zwischenmeilenstein erarbeiteten Ergebnisse zur Schüttgüterdekontamination berichtet. Die Ergebnisse zu Plasma-Flüssigkeits-Wechselwirkungen finden sich unter den Resultaten zum Leitthema PlasmaSept (II.1.3).

Für die Plasmabehandlung von Schüttgütern bieten sich vor allem Systeme an, die auf dem Prinzip der Barrierenentladung basieren. Dieser Entladungstyp erzeugt ein ausgeprägt nichtthermisches Plasma bei Atmosphärendruck und stellt damit einerseits die spätere Prozessintegration als auch die schonende Behandlung bei geringen Gastemperaturen sicher. Hier wurde in erster Linie eine Sonderform der Barrierenentladung, die sog. Oberflächenentladung (Abb. 51a) genutzt. Die Behandlung der Schüttgüter kann auf zwei Arten erfolgen. Bei der direkten Behandlung (Abb. 51b) werden die Partikel über die Elektrode durch das Plasma transportiert, bei der indirekten Behandlung laufen sie z.B. unter dem Plasma hindurch (Abb. 51c).





Abb. 51: Oberflächen-Barrierenentladung (OBE) zur Schüttgutbehandlung; (a) Schematischer Aufbau einer OBE; (b) direkte Behandlung; (c) indirekte Behandlung

Beide Methoden zur Behandlung der Schüttgüter mit Oberflächen-Barrierenentladung wurden im INP Greifswald erarbeitet und eingesetzt. Ziel war es einerseits, unterschiedliche Verfahrensansätze miteinander zu vergleichen und andererseits eine verwertungsorientierte Verfahrenserarbeitung durchzuführen. Zum einen wurden die Schüttgüter indirekt stationär behandelt. Dazu befindet sich das Schüttgut in einer Petrischale und die OBE-Anordnung wird von oben an das Schüttgut herangeführt. Ein Abstandshalter (4 mm dick) zwischen der OBE-Anordnung und dem Boden der Petrischale stellt einen ausreichenden Abstand zwischen Schüttgut und Plasma sicher. Vorteil dieser Behandlung ist die definierte Behandlungszeit. Nachteilig ist, dass das Schüttgut während der Behandlung nicht bewegt wird und die Teilchen möglicherweise nur von einer Seite behandelt werden. Zum anderen konnte eine direkte Plasmabehandlung mit Probentransport und Probendurchmischung mit dem sog. Schüttelreaktor des INP (Abb. 52) realisiert werden. Bei diesem ist die OBE-Anordnung auf einem Schütteltisch aufgebracht und die Probe wird durch die Schüttelbewegung über die OBE-Anordnung transportiert. Auch hier ist eine stationäre Behandlung möglich (Schütteltisch ausgeschaltet), so dass direkte und indirekte Behandlung auch miteinander verglichen werden können. Die Plasmen wurden in der Regel in Luft betrieben. Der Einsatz eines anderen Prozessgases wäre bei den hier zu behandelnden nicht preisintensiv sind, nicht gerechtfertigt. Proben, die Dennoch wurde zu Vergleichszwecken auch mit Argon als Prozessgas gearbeitet.





Abb. 52: Schüttelreaktor; links: Schematischer Aufbau; rechts: Blick auf die Oberflächenentladung

In der Folge der Arbeiten wurde das Spektrum der Plasmaquellen erweitert, wobei mit allen Plasmaquellen bereits im Vorfeld signifikante antimikobielle Effekte erzielt werden konnten (Brandenburg e. al, Contrib. Plas. Phys. (2007); M. Hähnel et al. Plas. Proc. And Polymers 2009). Als weiterer Entladungstyp wurde die klassische Volumen-Barrierenentladung ebenfalls in Luft eingesetzt (Abb.55 links). Bei diesem Entladungstyp ist mindestens eine der beiden Elektroden mit einem Dielektrikum bedeckt, wobei das Schüttgut auf die untere, mit dem Dielektrikum bedeckte Elektrode gegeben wird. Damit ist nur eine direkte Behandlung möglich. Neben der OBE wurde der Argon-Plasmajet kiNPen® 09 zu Vergleichszwecken eingesetzt (Abb.53 rechts). Zur Schüttgutbehandlung befand sich der Plasma-Jet in Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen. Am Grund des Gefäßes befand sich das Probengut. Aufgrund der Ummantelung konnte der Gasstrom des Plasmajets gleichzeitig für eine Durchmischung und Verwirbelung der Proben genutzt werden.





Abb. 53: Links Foto und Schema einer Volumen-Barrierenentladung; rechts Probenbehandlung mit dem Plasmajet



Als Untersuchungsobjekt wurden als Arzneidrogen die getrockneten Blätter der Pfefferminze (*Mentha x piperita* aus der Familie der *Lamiaceae*) und Fenchelfrüchte (*Foeniculum vulgare, Apiaceae*) verwendet. Als Vergleichsmaterialien wurden außerdem feinkörniger Sand (Strand Dueodde; Ostseeinsel Bornholm/Dänemark) und Kreide (Kreidewerk Rügen GmbH, Sassnitz) eingesetzt. Die Schüttgut-Transporteigenschaften des Schüttelreaktors wurden charakterisiert (Bestimmung der mittleren Transitzeit und der Massebilanz). Es konnte damit gezeigt werden, dass die verwendeten Schüttgüter Sand, Fenchel und Pfefferminzblätter mit einem geringen Materialverlust im Schüttelreaktor transportiert werden. Kreide bildet Agglomerate, zeigt deshalb einen relativ hohen Verlust beim Transport und wurde daher nicht weiter verwendet.

Mittels eines Elektroskops wurde die Aufladung der Schüttgutpartikel durch die Behandlung untersucht. Es zeigt sich, dass beim Transport über die OBE-Elektrode (bei direkter Behandlung) das Schüttgut entsprechend der tribologischen Reihe durch Reibungselektrizität beim Transport aufgeladen wird (Sand negativ, Pfefferminzblätter positiv). Im Plasma erfahren sie zusätzlich durch die positiven Ionen des Plasmas eine weitere, positive Aufladung. Die Aufladung kann zu Problemen in der Produktverarbeitung führen, denn ein Teil der Probe kann auf den Elektroden haften bleiben. Diese Anlagerung führt zu einer Stauung der Probe und damit zu einer möglichen Verstopfung des Schüttelreaktors. Andererseits können geladene aktive Spezies des Plasmas durch die elektrostatisch geladenen Prüfmaterialien abgeschirmt werden. Dieses Problem wird im Falle der indirekten Behandlung umgangen wenn die Transportfläche aus Metall ist und geerdet werden kann. Es zeigt sich aber auch, dass das Material sorgfältig ausgesucht werden muss. Andernfalls wird die Transportplatte durch das im Plasma gebildete Ozon angegriffen.

In Zusammenarbeit mit der Hochschule Neubrandenburg, Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften sowie dem Institut für Pharmazie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald wurde zunächst nach Prüfmethode 2.6.12 "Mikrobiologische Prüfung nicht steriler Produkte: Zählung der gesamten vermehrungsfähigen Keime" des Europäischen Arzneibuchs der mikrobiologische Status bestimmt. Die Kontamination war z.T. höher als nach dem Europäischen Arzneibuch zugelassen (mikrobiologische Qualität der Kategorie 4A). In der Folge wurden gemeinsam Methoden zur gezielten Kontamination von Sand, Pfefferminzblättern und Fenchelfrüchten erarbeitet und auf plasmabehandelte Proben angewandt. Mikrobiologische Untersuchungen erfolgen am INP und der Hochschule Neubrandenburg, analytische Qualitätsbestimmung Arzneidrogen die der nach Plasmabehandlung (sensorische Dreiecksprüfung, Gehaltbestimmung ätherischer Öle)



wurden an der Hochschule Neubrandenburg und am Institut für Pharmazie Greifswald durchgeführt.

Mittels indirekter Behandlung konnte nach fünfminütiger Behandlung eine temporäre Reduktion des Ausgangsspektrums der Mikroorganismen um eine Zehnerpotenz erreicht werden. Diese weist auf eine Verzögerung des Keimwachstums und damit eine Beeinträchtigung der Mikroorganismen auf den Pfefferminzblättern durch Plasmabehandlung hin. Bessere Ergebnisse werden bei der Dekontamination von gezielt kontaminiertem Sand (Enterobakterium *E. coli* NCTC 10538) im stationären indirekten Reaktor erreicht. Vor allem bei den Mikroorganismen aus dem natürlichen Keimspektrum der Pfefferminzblätter zeigt sich eine deutlich Wirksamkeit der Plasmabehandlung im indirekten Reaktor gegen Enterobakterien. Innerhalb von 20 min ist hier eine vollständige Inaktivierung erreichbar. Demgegenüber wurde die Gesamtzahl aerober Keime nur um ca. eine halbe Zehnerpotenz reduziert. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine unterschiedliche Resistenz von Mikroorganismen auch gegenüber dieser hier getesteten Plasmabehandlung.





	Behandlungszeit (in min)	Mittelwert KbE/g	Mittelwert KbE / g (logarithmisch)	Reduktions- faktor (logarithmisch)	Standard- abweichung			Behandlungszeit (in min)	Mittelwert KbE/g	Mittelwert KbE / g (logarithmisch)	Reduktions- faktor (logarithmisch)	Standard- abweichung
	Kontrolle (0)	7,94*10 <sup>6</sup>	6,82	-	0,41		Vorsuch 1	Kontrolle (0)	3,49*10 <sup>7</sup>	7,44	-	0,37
Versuch 1	30	2,04*10 <sup>6</sup>	6,29	0,52	0,25		versuchi	30	8,81*10 <sup>6</sup>	6,88	0,56	0,28
Versuch 2	Kontrolle (0)	4,86*10 <sup>6</sup>	6,58	-	0,41		Versuch 2	Kontrolle (0)	1,57*10 <sup>7</sup>	7,13	-	0,32
	30	1,19*10 <sup>6</sup>	5,95	0,64	0,40			30	5,05*10 <sup>6</sup>	6,54	0,58	0,44
Versuch 3	Kontrolle (0)	4,08*10 <sup>6</sup>	6,55	-	0,28	Vers	Varsuch 2	Kontrolle (0)	7,18*10 <sup>7</sup>	7,79	-	0,26
	30	5,19*10 <sup>4</sup>	4,71	1,84	0,13		versuch 3	30	2,04*10 <sup>7</sup>	7,25	0,54	0,26

# Abb. 54: Ergebnisse der Plasmabehandlung von realen Schüttgütern (Schüttelreaktor, Luftplasma, Plasmaleistungsdichte ca. 405,9 mW/cm<sup>2</sup>.

In den Untersuchungen mit den Pfefferminzblättern und Fenchelfrüchten im Schüttelreaktor wurden tendenziell schlechtere Ergebnisse erzielt. Den besten antimikrobiellen Effekt im Schüttelreaktor zeigte wiederum gezielt kontaminierter Sand. So wurde mit einer



fünfminütigen Plasmabehandlung im DBE-Schüttelreaktor eine Reduktion von *E. coli* um 3 Log-Stufen erreicht. Die im relaxierenden Plasma vorhandenen reaktiven Spezies sind offensichtlich für die antimikrobiellen Effekte verantwortlich.

An realen Schüttgütern konnte mit keiner der eingesetzten Plasmaquellen eine Keimreduktion größer als 2 Log-Stufen erreicht werden. In den meisten Fällen werden selbst nach einer 30-minütigen Plasmabehandlung nicht mehr als ca. 0,5 Log-Stufen erreicht. Den besten Effekt zeigt die indirekte Behandlung im Schüttelreaktor mit 1,84 Log-Stufen.

Die unterschiedlichen Effekte auf Sand einerseits und den realen Schüttgütern andererseits müssen offensichtlich auf die Oberflächenstruktur der Blätter zurückgeführt werden. Wie die Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop in Abb. 55 zeigen, ist die Oberfläche der Pfefferminzblätter mit vielen Haaren und Drüsenschuppen übersät. Mikroorganismen können sich in Spalten und Poren des getrockneten Pflanzenmaterials befinden und der Plasmaeinwirkung nur eingeschränkt zugänglich sein. Die für den antimikrobiellen Effekt notwendigen Spezies des Plasmas erreichen die Bakterien also nur unzureichend und werden bereits an den herausragenden Zellen der Haare und Drüsenschuppen abgefangen. Viele Bestandteile der Zellmembran besitzen Radikalfängereigenschaften, die für den Schutz der Mikroorganismen verantwortlich gemacht werden Dieser können. Schutzmechanismus ist auf der weniger komplexen Oberfläche der Sandkörner nicht gegeben. Daher ist die mikrobiologische Dekontamination auf Sand erfolgreicher. Auf den Fenchelkörnern wird ebenfalls eine komplexe Morphologie der Oberfläche beobachtet, die die Möglichkeit zur Abschattung der Mikroorganismen von den aktiven Spezies des Plasmas bieten.



Abb. 55: Pfefferminzblätter (links) und Fenchelfrüchte (rechts) unter dem Elektronenmikroskop (REM)



Insgesamt wurden bei der Schüttgutbehandlung keine negativen Beeinflussungen der Produkteigenschaften durch Plasmabehandlung hervorgerufen. Es konnten auf realen Schüttgütern trotz eines breiten Spektrums an Plasmaguellen keine verwertbaren antimikrobiellen Effekte erzielt werden. Die Keimreduktion lag mit max. 2 log-Stufen unter den Anforderungen an einen industriell eingesetzten Prozess. Auf Sand hingegen wurden gute Ergebnisse erzielt, was offensichtlich auf die Oberflächenstruktur zurückzuführen ist. Hauptrisiko der Behandlung empfindlicher pharmazeutischer Güter ist die Selektivität der Plasmaeffekte, die eine antimikrobielle Wirkung aber keine produktverändernden Prozesse zeigen müssen. Dies muss nach aktuellem Stand der Erkenntnisse immer für den konkreten Fall geprüft werden, da die Eigenschaften des zu behandelnden Gutes auf die Wechselwirkung und damit den Behandlungserfolg erheblichen Einfluss nehmen können. Durch das Plasma wird eine komplexe Chemie induziert und es muss im Einzelfall geprüft werden, ob diese entsprechend den Verfahrensanforderungen gezielt gesteuert und eingesetzt werden kann. Die Fragestellung der Schüttgüterdekontamination zeigte weiteren Forschungsbedarf auf, der aber im Sinne einer Fokussierung des Campus PlasmaMed nicht mehr im Leitthema PlasmaPharm geleistet werden konnte. Es sind Anwendungsszenarien zu suchen, die einen höheren technischen Aufwand rechtfertigen würden. Dieses Gesamtergebnis führte zur Entscheidung, die Bearbeitung dieser Thematik im Rahmen des Campus PlasmaMed zu beenden.

#### II.1.3 Leitthema PlasmaSept

Nach ursprünglicher Planung sollte der Fokus des Leitthemas PlasmaSept auf Forschungsarbeiten zur Anwendung von Atmosphärendruckplasmen zur selektiven antiseptischen Behandlung von Wunden liegen. Ziel der Arbeiten war die systematische laborexperimentelle Ergänzung und Flankierung der klinisch orientierten Leitthemen. Auf der Basis von In-vitro-Untersuchungen mit Zellkulturmodellen sollte die Wirksamkeit einer Wundbehandlung mit Atmosphärendruck-Plasma lokalen zur Verkürzung des Wundheilungsprozesses sowie zur Verhinderung einer Chronifizierung der Wunden sowie deren Unschädlichkeit für das regenerationsfähige Gewebe nachgewiesen werden. Im Verlaufe der Arbeiten wurde die die strenge Fixierung auf Wundheilungsprozesse hin zu einer generellen Charakterisierung biologischer Plasmaeffekte unter Verwendung von Invitro-Modelle mit Zellkulturen und Mikroorganismen erweitert.

Aufgrund der Bedeutung von Plasmaeffekten auf (physiologische) Flüssigkeiten zur Abschätzung möglicher Beeinflussungen des flüssigen Lebensumfeldes (vital environment) von Zellen und Geweben wurden die ursprünglich im Leitthema PlasmaPharm auf die



Dekontamination kleiner Flüssigkeitsvolumina ausgerichteten Arbeiten zu Plasma-Flüssigkeits-Wechselwirkungen im Rahmen des Leitthemas PlasmaSept mit dem Ziel der biologischen Charakterisierung von Plasmaquellen im INP Greifswald weitergeführt. Darüber hinaus konzentrierten sich die Arbeiten im INP Greifswald auf die Erstellung und Nutzung von In-vitro-Wundmodellen zur Prüfung der Plasmawirksamkeit, einen Teil der Untersuchungen zur Beeinflussung der Vitalität von kultivierten Zellen durch Plasmabehandlungen sowie die Erfassung antimikrobieller Plasmaeffekte. Weiterhin wurden in Zusammenarbeit mit der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenkrankheiten (HNO) des Klinikums der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald Untersuchungen zur Beeinflussung des Zellproteoms durch Plasmabehandlung durchgeführt.

Im Institut für Pharmazie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald wurden detaillierte Untersuchungen zur Beeinflussung spezieller Zellfunktionen durchgeführt (u.a. Einwirkungen auf die Zell-DNA, intrazelluläre Generierung reaktiver Sauerstoffspezies, Beeinflussung von Zell-Oberflächenproteinen). Der Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften der Hochschule Neubrandenburg war mit Untersuchungen zur Inaktivierung von Bakterienendotoxinen sowie zur Erfassung des mutagenen Potenzials von plasmabehandelten Flüssigkeiten in das Leitthema PlasmaPharm einbezogen.

Im Rahmen des Leitthemas PlasmaSept kamen überwiegend die folgenden Plasmaquellen zum Einsatz:

- Atmosphärendruckplasmajets (APPJ) der kINPen®-Reihe mit Argon sowie Argon-Sauerstoff-Mischungen als Arbeitsgasen
- Dielektrisch behinderte Oberflächenentladung (Oberflächen-DBE) unter Atmosphärenbedingungen in Luft sowie in Argon- und Argon-Sauerstoff-Gemischen

Diese Atmosphärendruck-Plasmaquellen wurden im Berichtszeitraum an ausgewählten Proben angewandt und untersucht. Dies beinhaltete die Erarbeitung eines umfangreichen Methodenspektrums aus chemischer, physikalischer und mikrobiologischer Analytik zur quantitativen Bewertung der Plasmawirkung.

Für die biologische Charakterisierung von Plasmaquellen ist es zunächst notwendig die Effekte auf (physiologische) Flüssigkeiten zur Abschätzung möglicher Beeinflussungen des flüssigen Lebensumfeldes (vital environment) von Zellen und Geweben genau zu untersuchen. Hierbei steht die Analytik entstehender reaktiver Spezies (Protonen, Wasserstoffperoxid, Nitrat, Nitrit, u.a.) in wässrigen Medien im Mittelpunkt.

Die Erfassung der Inaktivierung von Mikroorganismen in Flüssigkeiten durch Behandlung Atmosphärendruckplasmaquellen ist ein einfaches Modell zur Charakterisierung biologischer


Plasmaeffekte. Hier konnte an die Arbeiten aus dem zwischenzeitlich beendeten Leitthema PlasmaPharm zur Dekontamination kleiner Flüssigkeitsvolumina angeknüpft werden.

Mit Hilfe von spezifisch angepassten Zellkulturmodellen wurde die Regenerationsfähigkeit von Zellen nach Plasmabehandlung untersucht, um damit erste Hinweise auf die Möglichkeit einer plasmabasierten Stimulation der Wundheilung zu erlangen.

Infolge einer Plasmabehandlung können je nach Atmosphärengas in Anwesenheit von Wasser verschiedene reaktive Spezies entstehen, z. B. Nitrit  $(NO_2^{-})$ , Nitrat  $(NO_3^{-})$  und Wasserstoffperoxid  $(H_2O_2)$ . Um deren Entstehen qualitativ und quantitativ nachweisen zu können, wurden geeignete photometrische Nachweisverfahren entwickelt und methodisch etabliert.

Die Nachweismethoden der drei Spezies wurden in unterschiedlichen Kombinationen nebeneinander getestet um Störungen und gegenseitige Beeinflussung auszuschließen. Im sauren Milieu traten in Anwesenheit von Nitrit und Wasserstoffperoxid Wechselwirkungen auf. Nach anschließender Analyse der Gesamtspektren, Absorptionsmaxima und im Vergleich mit Literaturguellen kann durch Reaktion dieser Komponenten Peroxynitrit/Pernitrosäure entstehen, welches zu Salpetersäure isomerisiert und eine Ansäuerung des Mediums hervorruft. Die photometrische Analytik von Nitrat-, Nitrit-Ionen und Wasserstoffperoxid wurde in plasmabehandeltem destilliertem Wasser durchgeführt. Die Messungen wurden auch in physiologischer Kochsalzlösung (0,85 %) und Phosphatpuffer nach Sörensen (PBS) durchgeführt, da diese Medien bei der Behandlung von Mikroorganismen anstelle von reinem Wasser verwendet wurden um osmotische Effekte auf die Zellen auszuschließen. Die Nachweise der drei Ionen/Moleküle wurden teilweise durch die hohen Chlorid-/Phosphat-Konzentrationen in den Medien beeinträchtigt. Der pH-Wert wurde mit einer pH-Elektrode bestimmt. Dieser konnte sowohl in Wasser als auch in physiologischer Kochsalzlösung (0,85 %) und Phosphatpuffer ermittelt werden.

Für die Plasmabehandlung von Mikroorganismensuspensionen wurden als gram-negativer Keim *E. coli*, als gram-positiver Keim *S. aureus* und als Sporenbildner *B. atrophaeus* verwendet.

Zur Behandlung kleiner Flüssigkeitsvolumina (2,5; 5,0; 7,5; 10,0 ml) wurde zunächst das Prinzip der dielektrisch behinderten Oberflächenentladung (Oberflächen-DBE) angewendet. Die Flüssigkeit befand sich dazu in einer Petrischale (60 mm Durchmesser) in deren Deckel die Elektrodenanordnung eingebracht ist. Das Plasma wurde in Luft betrieben. Die Flüssigkeitsoberfläche entsprach in diesem Behältnis etwa 23,8 cm<sup>2</sup> (Abb. 56).





Abb. 56: links: Elektrode; mittig: Schematischer Aufbau; rechts: Elektrode (Plasma-on)

Mit zunehmender Plasmabehandlungszeit von Wasser sowie NaCI-Lösung fand eine signifikante Ansäuerung statt (pH-Wert 2,7 – 3,3). In PBS veränderte sich der pH-Wert nicht. Die Nitrat-Konzentration stieg auf Werte bis zu 190 mg/l an, die Nitrit-Konzentration bewegte sich im Bereich unter 3 mg/l und die Wasserstoffperoxid-Konzentration erreichte maximal 20 mg/l (Abb. 57).



Abb. 57: pH und Konzentrationen von Nitrat, Nitrit und Wasserstoffperoxid nach Plasmabehandlung mittels DBE (Luft) in Wasser

Um theoretische Reaktionswege, die zur Entstehung der detektierten von Protonen, Nitrat, Nitrit und Wasserstoffperoxid führen, aufzustellen, wurde die Plasma/Gasphase mittels FT-IR, OES und MS untersucht. Es wurden Banden des 2. positiven Systems von N<sub>2</sub> und des 1.



negativen Systems von N<sub>2</sub><sup>+</sup> detektiert, jedoch keine NO<sub>γ</sub>-Banden und OH-Emission gefunden (OES). Im FT-IR-Spektrum wurden die Moleküle Kohlenstoffdioxid, Distickstoffmonoxid, Ozon und Salpetersäure/Pernitrosäure gefunden. Das Massenspektrum zeigte die Massen der Luftbestandteile in Molekülform, angeregtem Zustand und in atomarer Form. Neue Massenzahlen (und die vermuteten dazugehörigen Summenformeln) waren 17 (NH<sub>3</sub>/OH), 27 (HCN) und 43 (HNCO).

Weiterhin wurden Gesamtspektren (photometrisch) von plasmabehandeltem Wasser und NaCl-Lösung aufgenommen. Diese zeigten Absorptionsmaxima bei 227 nm und 302 nm. Ersteres wird laut Literatur und eines selbst aufgenommenen Spektrums der Salpetrigen Säure (HNO<sub>2</sub>) zugeordnet, letzteres Pernitrosäure (ONOOH). Auch die pH-Wert-Erniedrigung auf 2,78 nach der Plasmabehandlung in ungepuffertem Medium bekräftigt die Entstehung von Salpetriger Säure mit einem pK<sub>a</sub>-Wert von 2,8  $\pm$  0,1 (lt. Literatur).

Um das analytischen Spektrum zu erweitern, wurden Kontakte zum Institut für Pharmazie der Universität Greifswald (Pharmazeutischen/Medizinischen Chemie) geknüpft. Dort wurde begonnen eine neue Methode zur Radikaldiagnostik von Wasser nach Plasmaeinwirkung mittels LC/MS zu testen. Hierbei wurde versucht mittels des stabilen Radikals (DPPH, Diphenylpicrylhydrazil  $C_{18}H_{12}N_5O_6$ , 394,0788 g/mol) mögliche, in der Flüssigkeitsphase befindliche, Radikale abzufangen und diese neu entstandenen Verbindungen mittels LC/MS zu detektieren und zu identifizieren. Es wurden unter anderem molare Massen von 410,0719; 411,0810 und 439,0641 g/mol detektiert, welche auf die Anlagerung von O, OH und NO<sub>2</sub> hindeuten. Weitere Untersuchungen waren bis zum Projektende noch nicht abgeschlossen.

Bei einem Volumen von 5 ml Bakteriensuspension in Kochsalzlösung werden die vegetativen Mikroorganismen nach einer sieben- bis zehnminütigen Plasmabehandlung vollständig inaktiviert. Die Inaktivierung von *S. aureus* bewegt sich auch bei Verdoppelung des Volumens (10 ml) im gleichen Zeitfenster. Bei *E. coli* hingegen liegt die Anzahl der koloniebildenden Einheiten erst nach fünfzehnminütiger Plasmaeinwirkung unter der Nachweisgrenze (Abb. 58). Liegt Phosphatpuffer als Medium vor (5 und 10 ml), wird die Anzahl der koloniebildenden Einheiten auch nach einer Plasmabehandlungszeit von 30 min kaum vermindert. Die Sporen zeigen in beiden Medien nur eine sehr geringe Verringerung der Koloniezahl.





Abb. 58: Inaktivierung von E. coli nach DBE-Behandlung (Luft)

Weiterhin wurden 5 ml physiologische Kochsalzlösung über verschiedene Zeiten mit der Oberflächen-DBE behandelt. Eine Hälfte des Mediums wurde sofort nach der Behandlung auf E. coli gegeben, die andere nach 30 min. Es wurde 15 min mit dem behandelten Medium inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der koloniebildenden Einheiten ermittelt. Die Zugabe plasmabehandeltem Mediums zeigte sofortige des im Vergleich zur Plasmabehandlung der E. coli-Suspension (s. o.) ähnliche inaktivierende Effekte, nach siebenminütiger Plasmabehandlung liegt auch bei dieser Variante die Anzahl der koloniebildenden Einheiten unter der Nachweisgrenze. Die 30 min verzögerte Zugabe des plasmabehandeltem Mediums resultierte in einer Reduktion von ca. 4 log-Stufen (Abb. 59).



Abb. 59: Inaktivierung von *E. coli* nach DBE-Behandlung und Zusatz von plasmabehandelter NaCl-Lösung



Weiterhin wurden die Einflüsse von Nitrat- und Nitrit-Ionen, Wasserstoffperoxid und pH-Erniedrigung - einzeln und in Kombination - auf die Mikroorganismen getestet. Es wurden nur geringe Reduktionen der Keimzahlen im Vergleich zur Plasmaeinwirkung festgestellt.

Der Einfluss einer Begasung mit Stickstoffmonoxid wurde durchgeführt. Es wurden der pH-Wert, die Konzentrationen von Nitrat-, Nitrit-Ionen und Wasserstoffperoxid bestimmt. Bei zur Plasmabehandlung vergleichbaren Nitrat- und Nitrit-Konzentrationen wurden ähnliche pH-Absenkungen festgestellt, jedoch die antimikrobielle Wirksamkeit war geringer als die der DBE-Behandlung. Eine Wasserstoffperoxidbildung blieb bei diesen Versuchen aus.

Um die antimikrobielle Wirkung von möglicherweise aus den in Kochsalzlosung vorhandenen Chlorid-Ionen (CI<sup>-</sup>) oxidativ entstehendem Chlor (Cl<sub>2</sub>) ausschließen zu können wurden nach der DBE-Behandlung von NaCI-Lösung Chlorid-Ionen (Titration nach Mohr) bestimmt. Die Chloridkonzentrationen waren vor und nach der Plasmabehandlung identisch. Dieser mikrobizide Faktor konnte somit ausgeschlossen werden.

Zur Charakterisierung von Plasma-Flüssigkeits-Wechselwirkungen, speziell zur Visualisierung von Reaktionen an der Grenzfläche zwischen Gas- und Flüssigkeitsphase und der anschließenden Ausbreitung der reaktiven Spezies in der Flüssigkeit, wurden Tests mit verschiedenen Indikator-Lösungen durchgeführt. Hierfür wurden zwei verschiedene DBE-Elektroden genutzt. Die flächige Elektrode wurde für ein Volumen von 100 ml (Behandlung in einem Becherglas) genutzt und eine punktuelle Anordnung für ein Volumen von 3 ml (Behandlung der Flüssigkeit in einer Küvette, siehe Abb. 60).



Abb. 60: Punktförmige DBE für Flüssigkeitsbehandlung in Küvetten (Volumen 3 ml)

Methylorange kam als pH-Indikator zum Einsatz. Dieser ist in neutralem Medium orange und verfärbt sich rot in einem pH-Umschlagsbereich von 4,4 - 3,1. Als Redox-Indikator wurde Kaliumpermanganat (KMnO<sub>4</sub>, violett) verwendet, welches an der Flüssigkeitsoberfläche zu Mangan(II)-Ionen (farblos) und Mangan(IV)-oxid (braun) reduziert werden kann. Auch die



Nachweisreagenzien des Nitrittests wurden für diese Versuche verwendet (farblos => pink, Abb. 61).



Abb. 61: Grenzflächenreaktion der reaktiven Spezies des Plasmas (links: Farbumschlag von Methylorange im Becherglas; Mitte: schematische Darstellung der Reaktionen mit KMnO4; rechts: Nitrit-Test in der Küvette)

In allen Versuchen wurde festgestellt, dass sich die Farbumschläge von der Grenzfläche her in die Flüssigkeit hinein ausbreiten (Abb. 62). Die im Plasma gebildeten reaktiven Spezies reagieren also an der Oberfläche mit den Wassermolekülen (a), breiten sich dann durch Diffusion in tiefere Schichten aus (b). Diese Diffusion wird dann durch verschiedene Gradienten beeinflusst, z. B. Temperatur oder Magnetfelder. Es bilden sich anfangs eine tropfenförmige (c) und anschließend eine gradientengetriebene Struktur aus (d).



Abb. 62: Ausbreitungsphasen von plasmagenerierten Spezies in der Flüssigkeit

Die bisher geschilderten Untersuchungen fanden mit an atmosphärischer Luft generiertem Plasma statt. Zum Vergleich sowie zu weiteren Aufklärung von Wirkungsmechanismen wurden Flüssigkeitsvolumina von 5 ml hinsichtlich chemischer Veränderungen (pH,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$  und  $H_2O_2$ ) sowie der antimikrobiellen Effektivität nach Oberflächen-DBE-Plasmabehandlung in Argonatmosphäre untersucht. Um einen Gasaustausch mit der Raumluft zu vermeiden wurde der in Abb. 63 dargestellte Versuchsaufbau genutzt.





Abb. 63: Versuchsaufbau für die DBE-Argonbehandlung

Die Versuche wurden nach Vorspülen mit Argon mit strömendem (5 min, 500 ccm/min) und stationärem Arbeitsgas durchgeführt. Die anschließenden analytischen Ergebnisse in strömender Atmosphäre zeigten im Vergleich zu Luft eine geringere pH-Wert-Absenkung (pH ca. 4) und geringere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen (7 mg/l), Nitrat- und Nitrit-Ionen waren nur in Spuren nachweisbar. In stationärer Argonatmosphäre waren die Spezies-Konzentrationen erwartungsgemäß höher, da restliche Luft und andere in der Gasphase entstehende Spezies nicht abgeführt wurden. Dies hatte auch Auswirkungen auf die antimikrobielle Effektivität. In strömendem Argon zeigte sich weder in NaCI-Lösung noch in PBS eine antimikrobielle Wirkung auf vegetative Keime nach 30minütiger Plasmabehandlung (Abb. 64). Hingegen wurde in stationärer Argonatmosphäre in ungepuffertem Medium innerhalb von 30 min eine Reduktion um bis zu einer log-Stufe erreicht. Bakteriensporen zeigten bei allen Variationen keine Reaktion.

In einer weiteren Testreihe wurden Flüssigkeiten mit der Oberflächen-DBE in Argon-Sauerstoff-Atmosphäre behandelt. Dabei wurde ebenfalls mit der in Abb. 63 dargestellten Versuchsanordnung gearbeitet, wobei dem Arbeitsgas Argon verschiedenen Anteile Sauerstoff (1 - 40 %) zugemischt wurden (Vorspülen: 5 min; Gesamtgasfluss: 500 ccm/min). Es wurden Volumina von 5 ml hinsichtlich der pH-Absenkung sowie der Bildung von NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowie die antimikrobiellen Effektivität untersucht. Der pH-Wert sank auf 3,0 – 3,6 nach 30 min Plasmabehandlung ab (in Wasser). Die  $H_2O_2$ -Konzentrationen stiegen auf 13 - 17 mg/l an. Nitrat und Nitrit waren nur in Spuren detektierbar. E. coli wurde innerhalb von 5 min Plasmabehandlung in ungepuffertem Medium inaktiviert, in PBS wurden mindestens benötigt (einige **Beispiele** Abb. 64 20 min in dargestellt). Ein Inaktivierungsmaximum lag bei einer Sauerstoffbeimengung von 4 - 5 %.





Abb. 64: Inaktivierung von *E. coli* nach Oberflächen-DBE-Behandlung in Argon und Argon-Sauerstoff-Gemischen

Untersuchungen zu Plasma-Flüssigkeits-Wechselwirkungen wurden auch mit dem Atmosphärendruckplasmajet (APPJ; kINPen) durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 65 links dargestellt.

Es wurde jeweils 5 min mit dem jeweiligen Arbeitsgas bzw. Arbeitsgasgemisch (Argon 5 sl/min, Argon + Beimischungen von 0,2 % Sauerstoff) vorgespült, um die Luft aus dem die zu behandelnde Flüssigkeit enthaltenden Zentrifugenröhrchen zu verdrängen. Die anschließende Analytik ergab eine pH-Wert-Absenkung unter pH 4,5 in ungepuffertem Medium (nach 20 min Plasmajet-Behandlung). In PBS blieb der Ausgangs-pH-Wert konstant. In Wasser wurden Endkonzentrationen von ca. 17 mg/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detektiert. Nitrat- und Nitrit-Ionen konnten nicht nachgewiesen werden. In PBS zeigte sich weder bei Bakteriensporen noch bei vegetativen Mikroorganismen eine antimikrobielle Effektivität. In physiologischer Kochsalzlösung hingegen wurde inaktivierende Wirkung nachgewiesen. Die koloniebildenden Einheiten von *E. coli* lagen nach 15minütiger Plasmajet-Behandlung (Argon) unter der Nachweisgrenze und von *S. aureus* nach 20 min (Abb. 65 rechts). In den



Versuchen mit den Sauerstoffbeimischungen war dieser inaktivierende Effekt um ca. 5 log-Stufen verringert.



Abb. 65: links: Versuchsaufbau Atmosphärendruckplasmajet klNPen; rechts: Inaktivierung von *E. coli* nach klNPen-Behandlung (Argon)

Im Ergebnis dieser Untersuchungen Flüssigkeitsbehandlungen zu mit Atmosphärendruckplasma unter verschiedenen Bedingungen konnte zusammenfassend festgestellt werden, dass eine antimikrobielle Wirksamkeit in flüssigen Medien offenbar an eine Absenkung des pH-Wertes gebunden ist, mit einer Ansäuerung allein allerdings keine adäquate Bakterieninaktivierung erreicht werden konnte. Die bisher durchgeführte einfache chemische Analytik plasmabehandelter Flüssigkeiten unter Verwendung von Farbreaktionen und fotometrischer Detektion ergab die Bildung von Nitrat, Nitrit und Wasserstoffperoxid, wobei die Entstehung dieser Spezies vor allem von den verwendeten Arbeitsgasen abhing. Generell können diese einfachen Nachweisreaktionen als Sammelparameter für die Bildung reaktiver Stockstoffspezies (Nitrit, Nitrat) bzw. reaktiver Sauerstoffspezies (Wasserstoffperoxid) angenommen werden. Für eine detaillierte Aufklärung von sind differenziertere Untersuchungen Reaktionsmechanismen beispielsweise unter Verwendung der Ionenchromatografie als Analysenverfahren erforderlich.

Die chemische Analytik von plasmabehandelten Flüssigkeiten taugt generell als Verfahren zur basalen Charakterisierung der chemischen Reaktivität von Plasmaquellen. Die Untersuchung der Inaktivierung von in Flüssigkeiten suspendierten Mikroorganismen ist eine einfache Methode zu zeigen, ob bzw. inwieweit biologische Plasmaeffekte in flüssigen



Medien realisierbar sind. Darüber hinaus ergeben sich daraus prinzipiell Möglichkeiten der spezifischen Dekontamination von Flüssigkeiten unter Verwendung von Atmosphärendruckplasma.

Ausführliche Arbeiten zur differenzierten Untersuchung von Plasma-Zell-Wechselwirkungen wurden im Institut für Pharmazie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald sowie im Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften der Hochschule Neubrandenburg realisiert.

In Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenkrankheiten, Kopf- und Halschirurgie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald wurde darüber hinaus eine erste Studie zur Beeinflussung der Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle (Proteom) realisiert. Dazu wurden humane Keratinozyten (Hautzellen der HaCaT-Linie) 60 s in Suspension mit einem Atmosphärendruck-Plasmajet kINPen® mit Argon als Arbeitsgas behandelt und anschließend sofort fixiert. Im Vergleich wurden weitere Zellen nur mit Argon behandelt, als Kontrolle dienten unbehandelte Keratinozyten. Zur Untersuchung des Proteoms der Zellen wurde die 2D-Gelelektrophorese angewendet. Erste Ergebnisse lassen horizontale Verschiebungen von Proteinen erkennen, d.h. die Ladungen der Proteine haben sich z.B. aufgrund von Oxidationen oder Veränderungen funktioneller Gruppen verschoben. Veränderungen wie Fragmentierungen, Degradationen oder Komplexbildungen offenbar nicht auftraten. Die Gasbehandlung zeigte im Vergleich zu der Kontrolle keine Verschiebung von Proteinen. Diese ersten Ergebnisse wurden in einer Campus-internen Kurzmitteilung allen Campus-Partnern zur Kenntnis gegeben.

Erste massenspektrometrische Analysen haben eine Ladungsveränderung von Peroxiredoxin (Antioxidansprotein 2) gezeigt. Dieses verhindert oxidative Schäden, die durch Peroxide und Alkylhydroperoxide in der Zelle entstehen. Dieses Ergebnis könnte auf entstandene Radikale, gebildet oder induziert durch Plasma, zurückzuführen sein. Weiterhin konnte die Beeinflussung einer Serin-Threonin-Proteinphosphatase 1 nachgewiesen werden. Das Enzym dephosphoryliert Phosphoproteine. Eine Dephosphorylierung des Retinoblastom Genproduktes führt zur Inaktivierung dieses Onkogens und somit zur Zellwachstumshemmung. Es erfolgt vermutlich ein Eingriff in die Zellteilung.

Die Untersuchung des Gesamtproteoms von Zellen durch 2D-Gelektrophorese wurde durch den Campus PlasmaMed im Rahmen des Leitthemas PlasmaSept weltweit erstmalig für die Untersuchung von Plasma-Zell-Wechselwirkungen eingesetzt. Daraus ergibt sich ein wichtiges Alleinstellungsmerkmal des Campus PlasmaMed, welches aufgrund der an der



Universität Greifswald vorhandenen Expertise auf dem Gebiet der Proteomanalytik in dieser Art nur am Wissenschaftsstandort Greifswald zu realisieren ist.

Wesentliches Ziel des Leitthemas PlasmaSept war die Etablierung von stabilen und reproduzierbaren *In-vitro*-Testsystemen, die als einfache Modelle kontaminierter bzw. infizierter Wunden dienen können und mit deren Hilfe es möglich ist,

- selektive antimikrobielle Wirkungen von Atmosphärendruckplasmen nachzuweisen,
  d.h. eine effektive Inaktivierung von Kontaminationskeimen zu erreichen, ohne die Regenerationsfähigkeit des in unmittelbarer Umgebung der Infektion lokalisierte Gewebes nachhaltig zu beeinträchtigen und
- zusätzliche Möglichkeiten der Stimulation der Regenerationsfähigkeit durch Plasmabehandlung systematisch zu untersuchen.

Dazu wurden zunächst konventionelle zweidimensionale (2D) Zellkulturmodelle auf ihre Einsatzfähigkeit für diese spezielle Anwendung geprüft werden. Mit dem Aufbau dreidimensionaler (3D) Zellkulturen sollten Epidermismodelle etabliert werden, mit denen einfache Hautläsionen modelliert und beobachtet werden können. Als Zellmodell wurden für die Untersuchungen bisher nur humane Keratinozyten (Hautzellen der HaCaT-Linie) verwendet.

In einem dem Campus-Leitthema vorgelagerten Projekt sowie im Rahmen des Vorhabens Plasmasept wurden die Grundlagen für ein In-vitro-Zellkulturmodell auf der Basis von (HaCaT-Zellen) geschaffen, das Keratinozyten für eine Co-Kultivierung mit Mikroorganismen geeignet ist und an die speziellen Bedingungen der Behandlung mit einem APPJ angepasst wurde. Eine Monolayer-Keratinozyten-Zelllinie, konfluent auf einer Fläche von 22,1 cm<sup>2</sup> gewachsen, wird durch eine mechanische "Wunde" mittels Zellschaber geschädigt (scratching assay). Zum Schutz vor einer durch den Gasstrom des APPJ verursachten Austrocknung wurden die Zellen mit einer dünnen Agaroseschicht geschützt. Eine Kontamination mit dem hautrelevanten Testmikroorganismus Staphylococcus epidermidis behindert den Verschluss der mechanischen "Wunde", nach Plasmabehandung wird dieser Effekt partiell reduziert (Abb. 66). Damit ist die Möglichkeit der selektiven antiseptischen Behandlung durch Atmosphärendruckplasma grundsätzlich in einem In-vitro-Modell gezeigt worden.





Abb. 66: Verschlussrate mechanisch erzeugter "Wunden" in mit Agarose bedeckten und mit S. epidermidis kontaminierten Keratinozyten ohne (MO) und mit APPJ-Behandlung über 60 s (MO + 60 sec PB) im Vergleich zu einer nicht abgedeckten, nicht kontaminierten und nicht plasmabehandelten Kontrolle (K)

Somit konnte unter Verwendung des 2D-Zellkulturmodells mit dem APPJ nachgewiesen werden, dass unter Behandlungsbedingungen, die eine Inaktivierung von Mikroorganismen bewirken, die Regenerationsfähigkeit von Hautzellen nicht nachhaltig beeinträchtigt wird. Die 2D-Zellkultur hat sich somit als geeignetes einfaches Testmodell für die Untersuchung grundsätzlicher Plasmawirkungen (Vitalität, Regenerationsfähigkeit etc.) erwiesen. Eine Grenze dieses Modells liegt in der eingeschränkten Anwendungsfähigkeit zur Prüfung einer Plasmaquelle wie dem APPJ, dessen Funktion an einen Gasstrom gebunden ist. Dadurch kommt es zu zellschädigenden Austrocknungseffekten, die nur durch eine zusätzliche Überlagerung der konfluenten Zellkultur mit einer Agaroseschicht verhindert werden konnten. Damit wird das Modell komplizierter und die Anwendung des scratching assay schwieriger.

Eine weitere Einschränkung betrifft die Möglichkeit der lokal begrenzten Infektion einer solchen Kultur. Zweidimensional auf dem Boden eines Kulturgefäßes konfluent wachsende Zellen müssen ständig mit flüssigem Nährmedium überschichtet bleiben, um ein Austrocknen zu verhindern. Damit ist zwar das Setzen einer lokalen Schädigung ("Wunde") möglich, eine Mikroorganismen-Infektion lässt sich jedoch nicht auf diesen "Wundbereich" beschränken, da sich die Kontaminationskeime über das Nährmedium sofort auf die gesamte Kultur verteilen. Somit ist die Wirksamkeit einer lokalen Plasmabehandlung auf den



Verschluss der "Wunde" nur sehr eingeschränkt und mit hohem experimentellem Aufbau verbunden, womit die Aussagefähigkeit und Reproduzierbarkeit der gefundenen Resultate weiter eingeschränkt wird.

Als Konsequenz aus diesen Erfahrungen werden die *In-vitro*-Untersuchungen zur Prüfung des APPJ zukünftig entweder mit in Nährmedium suspendierten Zellen durchgeführt, deren Wachstum und Vitalität durch anschließendes Aussäen geprüft werden kann. Weiterhin wird das in Entwicklung befindliche 3D-Epidermismodell die Einschränkungen im Hinblick auf Austrocknungsgefahr und lokal begrenzte Infektionsmöglichkeit nicht mehr aufweisen (siehe unten). Die inzwischen etablierte 2D-Keratinozytenkultur einschließlich scratching assay ist jedoch sehr gut zur Untersuchung von regenerationsfördernden Effekten von Plasmaquellen geeignet, deren Funktion nicht an ein strömendes (und damit austrocknendes) Gas gebunden ist, z.B. die Oberflächen-DBE.

Daher wurden unter Verwendung der Oberflächen-DBE unter Atmosphärendruck mit Luft als Arbeitsgas ausführliche Untersuchungen unter Verwendung des scratch assay durchgeführt. Dabei konnte zunächst gezeigt werden, dass Keratinozyten in 2D-Kultur eine stärkere Widerstandsfähigkeit gegenüber Plasmabehandlung als Mikroorganismen (*E. coli*) zeigen, womit die Selektivität einer Plasmabehandlung grundsätzlich zu gewährleisten sein sollte.

Eine Monolayer Keratinozyten-Zelllinie, konfluent auf einer Fläche von 22,1 cm<sup>2</sup> gewachsen, wurde durch eine mechanische "Wunde" mittels Zellschaber geschädigt (scratching assay). Anschließend wurden die mit 0,6 ml Wachstumsmedium überschichteten Zellen mit einer dielektrisch behinderten Entladung (DBE) 20, 40 und 60 s behandelt. Aufgrund des fehlenden Gasstroms bei dieser Plasmaquelle war eine Überschichtung mit Agarose nicht erforderlich. Der Zuwachs der "Wunde" wurde über die Zeit bestimmt. Bei einer Plasmabehandlung von 20 s verhielt sich das Wachstum der Zellen völlig identisch zu der unbehandelten Kontrolle, wohingegen die 40 s behandelten Zellen bis 120 Stunden nach Behandlung ein langsameres Wachstum aufwiesen. Der Verschluss der "Wunde" erfolgte jedoch bei allen 3 Ansätzen zum gleichen Zeitpunkt. Bei einer Behandlung von 60 s mit Plasma war die "Wunde" 20 Stunden später als die Kontrolle geschlossen.

Zum Vergleich dazu wurde das Bakterium *E. coli* ebenso behandelt wie die Keratinozyten-Zellkultur. Hier konnte im Gegensatz zu den Hautzellen schon nach 20 s Plasmabehandlung eine deutliche Inaktivierung im behandelten Bereich beobachtet werden.

Weiterhin erwies sich die 2D-Keratinozyten-Kultur als geeignetes Modell, um Schwellendosen für letale Effekte von Plasmabehandlungen mit einer Oberflächen-DBE zu ermitteln. Plasmabehandlungszeiten bis 30 min zeigten bei ausreichender Überschichtung der Zellen mit Nährmedium keine Auswirkungen auf die Zellvitalität.



Keratinozyten wurden mit einer Zellzahl von 5.000/cm<sup>2</sup> bzw. 18.000/cm<sup>2</sup> in 22 cm<sup>2</sup>-Zellkulturschalen (*TPP*, Schweiz) ausgesät und über 4 Tage im Brutschrank bei 37°C unter 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 95 % Luftfeuchte gezüchtet. Die Versuche wurden mit Zellen in zwei verschiedenen Wachstumsstadien (exponentiell und stationär) durchgeführt, um mögliche Unterschiede in der Reaktion auf eine Plasmabehandlung zu erkennen.

Die Plasmabehandlung der Zellen erfolgte unter variierenden Bedingungen.

· Oberflächen-DBE an Luft bzw.

• Oberflächen-DBE unter Argon-Atmosphäre (vorheriges 2-minütiges Spülen, um eine reine Argon-Atmosphäre zu schaffen).

Des Weiteren erfolgten die Experimente mit drei Nährmedien/Puffern (RPMI, IMDM, HBSS) und mit verschiedenen Flüssigkeitsüberständen von 1,0, 2,25 und 4,0 ml. Anschließend wurden die Zellen morphologisch betrachtet und mit Propidiumiodid angefärbt (Abb. 67).



Abb. 67: a) morphologisch (Lichtmikroskop), b) Propidiumiodid-Färbung (Totfärbung: Farbstoff diffundiert durch die Zellmembran abgestorbener Zellen und zeigt bei UV-Detektion 302 nm violette Fluoreszenz).

Ein Vergleich zwischen mit Luft bzw. Argon als Arbeitsgas behandelten Zellen zeigte, dass der Zelltod der Keratinozyten an Luft schneller auftrat als unter Argonbedingungen. Weiterhin war zu beobachten, dass die mit Medium überschichteten Zellen eine Plasmabehandlung besser vertrugen, als die, die mit der Puffersubstanz HBSS überschichtet waren. Wie vermutet trat insgesamt eine Korrelation zwischen Überstandsmenge und Dauer der Behandlung auf (Tab. 2).



Plasma-	Medium	Uber-	Behandlungszeit (min)					
quelle	Weddin	stand	5	7,5	10	20	30	
Luft	RPMI	4,0 ml					-	
		2,25 ml					-	
		1,0 ml	-	+	+	+	+	
	IMDM	4,0 ml					-	
		2,25 ml					-	
		1,0 ml	-	+	+			Legende zur Tabelle: grün = Zellen nicht tot; rot = Zellen eindeutig tot
	HBSS	4,0 ml					-	
		2,25 ml		- (?)	+	+		
		1,0 ml	+	+				
	·							(lichtmikroskopisch bzw. Pl-
Argon	RPMI	4,0 ml					-	Totfärbung); gelb = Annahme, dass Zellen nach dieser Behandlungszeit nicht sterben, da sie bei entsprechend untersuchter, längerer Behandlung überlebten; orange = Annahme, dass Zellen nach dieser Behandlungszeit ebenso sterben, wie Zellen nach entsprechend untersuchter, kürzerer Behandlung
		2,25 ml					-	
		1,0 ml			-	+	+	
	IMDM	4,0 ml					-	
		2,25 ml					-	
		1,0 ml	-	-	-	+		
	HBSS	4,0 ml					-	
		2,25 ml			- (?)	- (?)	- (?)	
		1,0 ml		- (?)	+			

Tab. 2: Stand der "Schwellendosen" für letale Effekte einer Plasmabehandlung von Zellen in den verschiedenen Nährmedien mit einer Dauer der Behandlung von 5 bis 30 min an.

Die Untersuchungen zu Plasma-Flüssigkeits-Wechselwirkungen hatten gezeigt, dass in ungepufferten wässrigen Flüssigkeiten infolge von Behandlungen mit einer Oberflächen-DBE an Luft erhebliche pH-Wertverminderungen bis auf Werte < 3 auftreten und dass diese Absäuerung des flüssigen Mediums Voraussetzung für die plasmabasierte Inaktivierung von Mikroorganismen war. Um zu prüfen, ob entsprechende Effekte auch bei der Behandlung von 2D-Keratinocyten-Kulturen eine Rolle spielen wurden entsprechende Untersuchungen mit den verwendeten Zellkulturmedien durchgeführt.

Untersucht wurden zwei Nährmedien und eine Puffersubstanz:

- · RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (Lonza, Schweiz)
- · IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) (Lonza, Schweiz)
- · HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) (PAA, Österreich)

Zunächst wurden die Pufferkapazitäten (bezogen auf den Gehalt von NaHCO<sub>3</sub>) durch acidimetrische Titration mit Salzsäure (0,01 M bzw. 0,031 M) unter potentiometrischer pH-Messung bestimmt. Es zeigte sich, dass HBSS die geringste Pufferkapazität aufwies (Gehalt



NaHCO<sub>3</sub> = 350 mg/l). RPMI und IMDM zeigten dagegen eine deutlich größere Pufferwirkung durch den höheren Gehalt an NaHCO<sub>3</sub> (RPMI 2.000 mg/l, IMDM 3.024 mg/l plus 5.958 mg/l HEPES-Puffer) und weiteren puffernden Salzen, Aminosäuren oder Vitaminen als Bestandteil des Nährmediums (Abb. 68).



Abb. 68: Vergleich von Pufferkapazitäten zwischen den Nährmedien RPMI und IMDM und der Puffersubstanz HBSS

Zur Bestimmung des pH-Wertes von Zellkulturmedien nach Plasmabehandlung wurden drei verschiedene Volumina der drei Nährmedien bzw. Puffersubstanzen (1,0 ml, 2,25 ml und 4,0 ml) in Zellkultur-Petrischalen mit einer Fläche von 22,1 cm<sup>2</sup> untersucht. RPMI und IMDM zeigten aufgrund ihrer großen Pufferwirkung bei allen Mediums-Volumina keine pH-Veränderung bei einer Plasmabehandlung mit der Oberflächen-DBE an Luft über bis zu 30 min. Bei HBSS sank der pH-Wert je nach Volumen des Puffers über eine Behandlungszeit von 15 bis 30 min auf Werte um pH 4 ab (Abb. 69). Für alle drei untersuchten Medien galt, dass bei einem Volumen der Flüssigkeit von 1,0 ml nach etwa 10 min eine Austrocknung der Zellen auftrat und die Versuche daher nach dieser Zeit abgebrochen wurden.

Es ist bekannt, dass der pH-Wert der Medien bei längerem Gebrauch (häufiges Öffnen) steigt. In den Experimenten zeigten sich jedoch keine Unterschiede in der pH-Entwicklung in Bezug auf unterschiedliche Ausgangs-pH-Werte.





Abb. 69: pH-Entwicklung von Überständen bei Plasmabehandlung von Keratinozyten.

Damit konnte gezeigt werden, dass die Pufferkapazität der verwendeten Zellkulturmedien ausreichend ist, um eine Behandlung mit der Oberflächen-DBE an Luft über 30 min ohne Ansäuerung zu überstehen. Somit sind – im Unterschied zu Inaktivierung von vegetativen Bakterien - unter diesen Umständen zu beobachtende biologische Effekte auf kultivierte Zellen nicht mit einer Ansäuerung korreliert.

Das wichtigste und bedeutsamste Ergebnis dieser Testreihen unter Verwendung des scratch assays an 2D-Keratinozyten-Kulturen war jedoch der Nachweis, dass die Verschlussrate mechanisch erzeugter "Wunden" durch 20minütige Plasmabehandlung mit der Oberflächen-DBVE an Luft erhöht werden kann. Damit konnte erstmals ein regenerationsfördernder Effekt einer Plasmabehandlung unabhängig von einer antiseptischen Wirkung *in vitro* gezeigt werden.

Eine Monolayer Keratinozyten-Zelllinie, konfluent auf einer Fläche von 22,1 cm<sup>2</sup> gewachsen,

wurde durch eine mechanische "Wunde" (Größe ca. 2 – 3 mm) mittels Zellschaber geschädigt (scratching assay). Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Volumina (1-, 2,25 ml), wobei entweder RPMI oder IMDM als Wachstumsmedium eingesetzt wurde, überschichtet und mit der Oberflächen-DBE an Luft behandelt.

Der Zuwachs der "Wunde" wurde über die Zeit bestimmt. Bei einer Plasmabehandlung von 1 min an Luft verhielt sich das Wachstum der Zellen nahezu identisch zu der unbehandelten Kontrolle (Abb. 70). Auch bei längeren Behandlungszeiten (2,5 bis 5 min) bei ansonsten gleichen Bedingungen konnte kein Unterschied zur unbehandelten Kontrolle beobachtet werden.





Abb. 70: Verschlussrate einer mechanisch erzeugten "Wunde" nach Plasmabehandlung mit einer Oberflächen-DBE. Keratinozyten wurden mit 1 ml RPMI überschichtet und 1 min an Luft plasmabehandelt.

Im Gegensatz dazu wurde nach einer 20minütigen Plasmabehandlung von Zellen (Überstand von 2,25 ml RPMI) beobachtet, dass diese zwar in den ersten 24 h langsamer wuchsen als die Kontrolle, danach aber eine deutliche Beschleunigung des Zuwachsens der künstlichen "Wunde" zu beobachten war (Abb. 71). Versuche mit IMDM als Nährmedium zeigten ähnliche Ergebnisse.



Abb. 71: Verschlussrate einer mechanisch erzeugten "Wunde" nach Plasmabehandlung mit einer Oberflächen-DBE. Keratinozyten wurden mit 2,25 ml RPMI überschichtet und 20 min an Luft plasmabehandelt.

Um ein *In-vitro*-Testmodell zu erhalten, dass den Bedingungen *in vivo* besser entspricht und als einfaches Wundmodell zur orientierenden Prüfung selektiver antiseptischer und die



Geweberegeneration fördernder Wirkungen von Atmosphärendruckplasma geeignet ist, wurden als einfache Epidermismodelle geeigneten 3D-Zellgeweben aufgebaut. Der bisher an der 2D-Kultur erprobte "scratching assay" als einfaches Wundmodell ist in modifizierter Form auch an dem 3D-Epidermismodell anwendbar.

Zur Züchtung von mehrschichtigem Gewebe wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Aus einer Keratinozyten-Zelllinie sollte ein Epidermisäquivalent bestehend aus fünf Schichten (Stratum corneum, Stratum lucidum, Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum basale) erzeugt werden. Dazu wurden die Zellen in einem Transwelleinsatz auf einer Polycarbonatmembran ausgesät und mit Spezialmedium ernährt. Um eine Differenzierung der Zellen zu ermöglichen, wurden diese einer Luft-Mediumsgrenze ausgesetzt. Anschließend wurden die Proben elektronenmikroskopisch und histologisch aufgearbeitet (Abb. 72).

Das Modell zeigte mehrere Schichten unterschiedlicher Zelltypen. Zum einen waren große runde Zellen zu beobachten neben flachen lang gestreckten Zellen. Außerdem konnten sich in Auflösung befindende Zellen beobachtet werden, die eine starke Körnung aufwiesen. Im elektronenmikroskopischen Bild konnten Membranstrukturen ohne Eingrenzung von Zellinneren als Abschlussschicht gezeigt werden, was auf ein Stratum corneum hinweisen könnte.



← mehrschichtige Epidermis

mehrschichtige Epidermis →



Abb. 72: A: Histologischer Schnitt, B: Elektronenmikroskopische Darstellung einer mehrschichtigen Keratinozyten-Kultur nach Behandlung mit einem Spezialmedium und anschließender Differenzierung.

Um einem Hautmodell näher zu kommen wurden in weiteren Ansätzen Fibroblasten und Keratinozyten co-kultiviert. Auf in Kollagen eingebettete Fibroblasten wurden Hautzellen gegeben und mit Spezialmedium versorgt, anschließend wurde das Modell einer Luft-Mediumsgrenze ausgesetzt, um eine Differenzierung der Zellschichten zu erhalten. Anschließend wurden die Proben elektronenmikroskopisch und histologisch aufarbeitet (Abb. 73).





- ← Stratum corneum
- ← Stratum basale
- ← Kollagenschicht

Abb. 73: Histologischer Schnitt einer mehrschichtigen Keratinozyten-Fibroblasten-Cokultur nach Behandlung mit einem Spezialmedium und anschließender Differenzierung

Der histologische Schnitt des Keratinozyten-Fibroblastenmodells zeigte ein mehrschichtiges Epithel, bestehend aus verschieden differenzierten Zellen. Das *Stratum basale*, sowie das *Stratum corneum* konnten zugewiesen werden. Immunhistochemische Untersuchungen verfestigten diese Vermutungen. Eine weitere Zellschicht, zwischen den beiden benannten, konnte gezeigt werden. Hierbei handelte es sich vermutlich um das *Stratum granulosum*, dies konnte aber nicht eindeutig zugewiesen werden.

Mit diesen beiden mehrschichtigen 3D-Zellkulturmodellen stehen Testobjekte zur Verfügung, die der In-vivo-Situation der Haut bzw. der Epidermis deutlich näher kommen. Ein wesentlicher Vorteil der speziellen Zellkultivierung mit einer Luft-Mediumsgrenze ist die trockene Oberfläche der Zellkultur, womit einerseits das Problem des Austrocknens der Zellen durch den APPJ-Gasstrom entfällt und andererseits eine lokal begrenzte Kontamination bzw. Infektion mit Mikroorganismen möglich ist.

Nächster Arbeitsschritt war die Etablierung dieses Testmodells als einfaches Wundmodell durch mechanische Verletzung der Oberflächen und Beobachtung der Heilung.

Bevor geplante Versuche zur Wundheilung mit Plasmabehandlung stattfinden sollten, wurde im Vorfeld geprüft, ob zerstörte Epidermis im Model in der Lage ist sich zu regenerieren. Dazu wurden Keratinozyten in einem Transwelleinsatz auf einer Polycarbonatmembran ausgesät und mit Spezialmedium ernährt. Um eine Differenzierung der Zellen zu ermöglichen, wurden diese 3 Wochen einer Luft-Mediumsgrenze ausgesetzt. Anschließend wurden die Proben bearbeitet, indem eine künstliche "Wunde" mit einem Skalpell erzeugt wurde. Eine Probe wurde zum Zeitpunkt t0 abgestoppt, eine weitere 48 h nach Behandlung und eine nach 120 h nach Behandlung. Zur Auswertung des Versuches wurden die Ansätze histologisch aufgearbeitet und mikroskopiert. Es ließ sich zeigen, dass die Zellen trotz Schädigung zur Proliferation neigten und eine mechanisch erzeugte Wunde nach spätestens



120 h geschlossen vorlag (Abb. 74). Über den Zeitraum zwischen 48 h und 120 h können keine Aussagen getroffen werden.



Abb. 74: Histologische Schnitte eines Epidermismodels nach dem Setzen einer "Wunde" zum Zeitpunkt t0 (a), nach 48 h (b) und nach 120 h (c)

Insgesamt musste festgestellt werden, dass die stabile und reproduzierbare Etablierung des 3D-Epidermismodells erheblich mehr Zeit als ursprünglich geplant in Anspruch genommen hat. Durch zwischenzeitliche nicht kompensierte personelle Ausfälle wurden die Arbeiten zusätzlich behindert. Mit Ende der Projektförderung steht das Modell prinzipiell. Zukünftige Arbeiten werden sich der Übertragung der Scratch-Technik auf des 3D-Zellkulturmodell widmen. Im Unterschied zur konfluenten 2D-Kultur ist der Zellverband hier fester, nach außen trocken und einige Mikrometer dick. Die Herausforderung besteht darin, künstliche "Wunden" reproduzierbar und exakt lokalisiert in einen solchen Zellverband einzubringen, ohne die Zellen von der Trägermembran zu lösen und ohne diese Membran zu zerschneiden. Hierzu wurde eine Vorrichtung konstruiert, mit deren Hilfe ein Skalpell mit einer Mikrometerschraube höhenjustiert werden kann (Abb. 75). Damit ist es möglich, eine 3D-Epidermiskultur mit relativ genau definierten Schnitttiefen zu verletzen. Die Anpassung dieses modifizierten scratch assay an das neue Zellkulturmodell war zum Ende der Projektförderung noch nicht abgeschlossen.





Abb. 75: Apparatur mit höhenjustierbarem Skalpell zur Realisierung des scratch assay an einer 3D-Epidermiskultur

### II.1.4 Leitthema Plasmalmp

Das zweite wichtige Anwendungsfeld des Campus PlasmaMed, die plasmabasierte Modifikation und Optimierung biofunktionaler Implantatoberflächen wurde hauptsächlich im Rahmen des Leitthemas PlasmaImp bearbeitet. Es wurde gezeigt, dass mit spezifischen plasmabasierten Beschichtungen und Modifizierungen von Titan sowohl protein- und zelladhäsive als auch antibakteriell wirksame Oberflächen erhalten werden, deren praktische Anwendung auf permanenten Implantaten vor allem im Knochenkontakt zukünftig zu deutlichen Verbesserungen beim Einwachsen derartiger Implantate führen soll.

Im Förderzeitraum wurden Titanoberflächen mit definierten Plasmabeschichtungen *in vitro* auf Zytotoxizität und Zellfunktion, mechanische Stabilität + Adhäsionskraft und antibakterielle Charakteristik geprüft. Voraussetzung für die Kenntnis zur antibakteriellen Wirksamkeit ist das Releaseverhalten der implantierten Kupferionen. Tierversuche zur Einschätzung der Integration von plasmabehandelten, adhäsiv wirkenden Ti-Oberflächen in das Gewebe und damit verbunden der Entzündungsreaktionen wurden ausgewertet und veröffentlicht. Versuche am Tiermodell zur Untersuchung bioaktiver und anti-bakterieller Effekte von Cu-PIII-beschichteten Implantaten wurden begonnen. Im Leitthema konnte unter Einbeziehung des Institutes für Physik der Universität Greifswald auf eine bewährte Zusammenarbeit zwischen dem INP Greifswald und der Universität Rostock aufgebaut werden.

Die Arbeiten des INP Greifswald im Leitthema Plasmalmp konzentrierten sich auf die Herstellung und physiko-chemische Oberflächencharakterisierung spezifischer plasmabasierter Oberflächenmodifikationen und Schichten.

Die Plasmafunktionalisierung von Titan mit plasmapolymerisiertem Allylamin (PPAAm) und daraus resultierenden positiven Ladungsträgern ist ein vielversprechender Ansatz zur



Generierung protein- und zelladhäsiver Metalloberflächen, für die im Tierversuch gezeigt werden konnte, dass die Entzündungsreaktionen lokal am Implantationsort sowie systemisch im Serum im Langzeitverlauf nicht stärker und in Teilbereichen geringer als bei unbehandelten Kontrollen ausfallen. Diese PPAAm-Oberfläche ist mittels Gammastrahlung sterilisierbar.

Mittels Plasma-Ionen-Immersions-Implantationstechnik (PIII) gelingt es, metallisches Kupfer in die Subsurface des Titans zu implementieren und eine anti-bakterielle Wirkung zu erzeugen. Allerdings verursacht Cu-PIII auf Titanoberflächen in der anti-bakteriell notwendigen Konzentration eine Einschränkung der Zellfunktion. Durchgeführte *In-vivo*-Untersuchungen (Ratte) mit Cu-PIII-Schichten deuten zudem auf verstärkte Entzündungsreaktionen in der Spätphase hin.

Die zellbiologisch notwendige Balance zu finden – keine adverse Zellreaktion bei antibakterieller Wirkung der Cu-PIII-Oberflächen – erfordert weitere intensive Grundlagenforschung, die letztlich die Basis für die zukünftig anwendbaren Implantate darstellt.

## Zelladhäsive Implantatoberflächen – plasmapolymerisiertes Allylamin (PPAAm)

Ziel war es, möglichst dünne (im Nanometerbereich), in wässrigen Medien stabile, bioaktive Plasmapolymerfilme für die Verbesserung von Zelladhäsion und Proliferation von Osteoblasten auf metallischen Implantaten bereitzustellen. Die Präparationsbedingungen zur Herstellung von PPAAm-Filmen mit Schichtdicken <100 nm wurden durch Variation der Plasmaprozessbedingungen (Druck, Leistung, duty cycle, Probenlage) optimiert.





Abb. 76: Oberflächenzusammensetzung von PPAAm bei einem Anregungspuls von 100 ms in Abhängigkeit vom DC nach der Plasmabehandlung (durchgezogene Linien) und nach 10 min Ultraschallwasserbad (USB; gepunktete Linien).

Das im Monomer Allylamin H<sub>2</sub>C=CH-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> vorhandene N/C-Verhältnis von 33,3 % ließ sich fast im Plasmapolymerfilm einstellen. Die erzielbare Aminogruppendichte NH<sub>2</sub>/C lag bei 2 - 3 % (Abb. 76) und war ausreichend für Zelladhäsion und –proliferation von Osteoblasten. Die Plasmapolymer-Schichtdicke variierte mit der Plasma-an-Zeit bei konstanter effektiver Behandlungszeit von 144 s. Die XPS zeigte einen geschlossenen, lochfreien PPAAm-Film.

Eine anschließende Behandlung der PPAAm-Filme in einem Ultraschallwasserbad (USB) für 10 Minuten zeigte die Stabilität der PPAAm-Oberfläche (Abb. 77) anhand des C1s XPS-Peaks. Die Oberfläche wurde durch die Ultraschallbehandlung leicht oxidiert (O-C=O Gruppen auf der Oberfläche).

Kontaktwinkelmessungen wiesen eine mittlere hydrophile Oberfläche nach, die für die Zelladhäsion von Vorteil ist. PPAAm hat einen Wasserkontaktwinkel von etwa 50°. Dies bedeutet, dass die Benetzbarkeit optimal für die Zelladhäsion und –proliferation ist.



Abb. 77: Vergleich der C1s Bindungen nach Filmpräparation und nach anschließendem 10 min Ultraschallwasserbad (USB) für PPAAm





Abb. 78: Ermittlung der Oberflächenladung durch Bestimmung des Zetapotentials auf einer polierten Titanoberfläche im Vergleich zu einer PPAAm-Oberfläche

Durch Zetapotentialuntersuchungen ließ sich eine positive Oberflächenladung nachweisen Abb. 78). PPAAm besitzt viele –C-NH<sub>2</sub> Bindungen auf der Oberfläche und kann so die ebenfalls existierenden funktionellen Gruppen mit negativer Ladung ausgleichen.

A)







Abb. 79: A) FT-IR Spektren von PPAAm Film und Allylaminmonomer B) FT-IR Spektren nach Präparation und 10<sup>°</sup>USB plus Lagerung an Luft für 2 Tage

FT-IR Studien (siehe Abb. 79A) an PPAAm bestätigten für die hier benutzte Depositionsmethode eine hohe Retention der strukturellen Eigenschaften des Allylaminmonomers. Basisstrukturen des Monomers, wie die Streckschwingungen der aliphatischen C-H Gruppen, v-CH<sub>2.3</sub> at 2980-2880 cm<sup>-1</sup> und die Deformationsschwingungen der Amine,  $\delta$ -NH bei 1650-1510 cm<sup>-1</sup>, dominieren. v-NH Streckschwingungen zwischen 3380-3200 cm<sup>-1</sup> sind deutlich sichtbar. Typische durch das Plasma hervorgerufene Effekte sind signifikant verbreiterte, verschwindende oder wachsende Banden. Die teilweise Umwandlung von Aminogruppen in Amide, Imine oder Nitrile ist assoziiert mit einem Anstieg der Bande zwischen 2300-2200 cm<sup>-1</sup>, dem Auftreten der Streckschwingung der Nitrilgruppen, v-CN. Die Veränderungen im FT-IR-Spektrum nach 10 minütigem Ultraschallbad und Lagerung an Luft (2 Tage) sind nur geringfügiger Natur (Abb. 79B). Für anwendungsnahe Untersuchungen erfolgte nach der Plasmabehandlung die Sterilisation mit γ-Strahlung (Abb. 80). Die Oberflächenzusammensetzung (XPS-Untersuchung) änderte sich geringfügig. Der N-Gehalt nahm um 2 % ab, der O-Gehalt blieb konstant bei etwa 6,5 %. Die Aminogruppendichte -NH<sub>2</sub>/C nahm um etwa 30 % ab. Der Wasserkontaktwinkel

zeigte nach  $\gamma$ -Sterilisation keine Veränderung.





Abb. 80: PPAAm-Oberflächenzusammensetzung nach -Sterilisation im Vergleich zu einer nicht - sterilisierten Oberfläche



Die mechanische Charakterisierung der Oberflächenbeschichtungen (Universität Rostock) beinhaltet den Dornbiegetest, den Ritztest, den Stirnabzug und einen Abriebtest. Die Ergebnisse zu Untersuchungen der Stirnabzugsfestigkeit verschieden präparierter PPAAm Schichten ist in Abb. 81 dargestellt. Alle getesteten Schichten erfüllen die Anforderungen der Stirnabzugsfestigkeit von Implantatbeschichtungen laut ASTM 1147-F.



Abb. 81: Stirnabzugsfestigkeit verschieden präparierter PPAAm Oberflächen (PPAAm-Schichten - INP), sowie Ti-Cu-Film (90 % Ti, 10 % Cu – Universität Greifswald) im Vergleich mit einer unbeschichteten, korundgestrahlten Oberfläche Ti-6AI-4V.

Weiterhin wurden Adhäsionskraftmessungen von Knochenzellen auf PPAAm Oberflächen an einem speziell entwickelten Adhäsionsmessstand vorgenommen. Beim Ritztest waren keinerlei Abplatzungen feststellbar (Abb. 82).





Abb. 82: Ritztest auf einer PPAAm-Oberfläche. Es gibt keine Abplatzungen.

Anhand aminofunktionalisierter Plasmapolymerschichten (PPAAm) konnten aufgrund der Generierung positiver Ladungsträger stark zelladhäsive Wirkungen generiert werden. Die Knochenzellen lagen großflächig und sehr dicht auf der Oberfläche, was auf eine völlige Akzeptanz schließen ließ und ein "Wohlfühlen" der Zellen demonstrierte.

Der Bedeckungsgrad der PPAAm-Oberfläche durch die Knochenzellen war nicht nur initial im Bereich 30 min bis 3 h signifikant höher, sondern langanhaltend über 24 h, was auch durch Adhäsionsmessungen mittels Impedanz auf Bionas-Sensor Chips (SC 1000 mit IDES) bewiesen werden konnte. Dabei blieben die metabolischen Werte wie Respiration und Ansäuerung über 24 h konstant, d. h. die PPAAm-Funktionalisierung hat keinen negativen Langzeiteffekt auf die Zellphysiologie. Die zusätzlich erhobenen Zytotoxizitätsdaten mittels MTS-Test über 2 Tage untermauerten diese Aussage.

## Antibakterielle Implantatoberflächen – Implantation von Cu mittels Plasma-Ionen-Immersions-Implantation (Cu-PIII)

Mit Hilfe der Plasma-Ionen-Immersions-Implantation (PIII-Prozess) gelang es, antimikrobiell wirksame Substanzen wie zum Beispiel metallisches Kupfer in oberflächennahe Bereiche biokompatibler, zellwachstumsfördernder Implantatoberflächen aus Ti-6AI-4V-Legierung mit anwendungsrelevanter Rauhigkeit zu integrieren.





Abb. 83: XPS-Übersichtsspektren von unbehandeltem Titan im Vergleich mit einer Probe nach Cu-PIII

Die physiko-chemische Oberflächencharakterisierung ergab, dass die Oberflächen nach Cu-PIII-Behandlung sich sehr deutlich von einer unbehandelten Ti-6AI-4V Oberfläche unterschieden (Abb. 83). Während TiO<sub>2</sub> auf beiden Oberflächen vorhanden war, wurde Cu in beträchtlichen Mengen nach der Cu-PIII-Behandlung detektiert. Kohlenstoff (C1s Peak bei 285 eV) war nicht mehr nachweisbar (in situ XPS).

Das Cu-PIII Verfahren wurde im Berichtszeitraum durch Variation von Hochspannung (2.5, 5, 7.5 kV) und Stromstärke (48, 32, 16, 5, 0.5 mA) optimiert.

Cu-Konzentrationen in einer Größenordnung < 10 % waren mittels XPS nachweisbar, wobei die Analysentiefe der XPS 10 nm beträgt (Abb. 84). Dieser relativ geringe, mittels XPS detektierte Cu-Gehalt erklärt sich beim PIII Prozess durch die Implantation des Cu in Tiefen > 10 nm. Beim Cu-PIII erfolgte keine Cu-Beschichtung der Oberfläche! Die unbehandelte Ti-6AI-4V-Oberfläche besteht aus  $15 \pm 5$  % Ti,  $2 \pm 1$ % AI,  $0,5 \pm 0,2$ % V,  $45 \pm 5$ % O and  $35 \pm 5$ % C, das ändert sich kaum nach Cu-PIII.





Abb. 84: Oberflächenzusammensetzung von unbehandeltem Ti-6AI-4V im Vergleich zu Cu-PIII behandelten Ti-6AI-4V-Oberflächen bei 5 kV und Variation der Implantationsstromstärke

Zur Untersuchung der Cu-Implantation wurde ein XPS-Tiefenprofil aufgenommen. Während Sauerstoff bis zur maximalen Messtiefen von 50 nm unterhalb der Oberfläche implantiert wurde, fanden sich zwei Cu-Peaks bei Tiefen von 5 nm und 20 nm, was durch Plasmaprozessbedingungen wie Ionenenergie und thermische Relaxationsprozesse erklärt werden kann. Dabei wurde die Probe auf etwa 210° C aufgeheizt (Abb. 85).





Abb. 85: Tiefenprofil einer mittels Cu-PIII Prozess (U=5 kV, I=5 mA; 6,6 x 10<sup>17</sup> Ionen) modifizierten Ti-6Al-4V Oberfläche

Die Cu-Abgabe der mittels Cu-PIII hergestellten Oberflächen bei Lagerung der Proben in verschiedenen wässrigen Medien wurde durch Cu-Releaseuntersuchungen mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS an der Orthopädischen Universitätsklinik Rostock-AG Bader) analysiert. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse von Cu-Releaseuntersuchungen in den Medien: bidestilliertes Wasser, Humanserum der Blutgruppe AB (AB-Humanserum) und Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Während bidestilliertes Wasser für das eigentliche Cu-Release steht, sollte das AB-Humanserum die reale Implantatsituation widerspiegeln. DMEM wurde für den Vergleich mit den Zellkulturergebnissen ausgewählt. Für die Simulation des Raumes zwischen Implantat und Knochengewebe wurde ein Volumen von 700  $\mu$ I ermittelt. Ein Cu-Release von 0,2 – 1,9 mmol/I Cu ist in H<sub>2</sub>O, AB-Humanserum bzw. DMEM, einsteuerbar. Während nach einer Lagerung der Proben für 24 h in bidest. Wasser etwa 0,25 mmo/I Cu freigesetzt wurden, wurden für AB-Humanserum und DMEM die 5- bis 8-fache Cu-Konzentration frei (p<0.001). Die Releasekinetik bestimmt die



Cu-Konzentration nach 24 h. Die Komplexbildung zwischen Cu und den Aminogruppen, die in den Proteinen des AB-Humanserum und DMEM vorhanden sind, bewirken die hohen freigesetzten Cu-Konzentrationen in beiden Medien im Vergleich zum bidestillierten Wasser. Die chemische Gleichgewichtskonstante der Komplexbildungsreaktion (K =  $[Cu(NH_3)_4]^{2+}$  /  $[Cu^{2+}]$   $[NH_3]^4 = 10^{+12,7}$ ) ist komplett zur Seite des Cu-Komplexes verschoben. Dies bewirkt einen sehr schnellen Reaktionsablauf, der bereits nach 24 h z.B. in DMEM abgeschlossen ist.

Tabelle 3: Cu-Konzentrationen, gemessen nach Lagerung der Cu-PIII-Proben in 700  $\mu$ l Medium für 24 und 48 h (Cu-PIII-Prozess: 5 kV, 48 mA, 63,5 x 10<sup>17</sup> Ionen x cm<sup>-2</sup>)

Prozess	Medium	Cu-Konzentration nach 24 h [mmol/l]	Cu-Konzentration nach 48h (24 h + 24 h) [mmol/l]
Cu-PIII implantiertes Cu	bidestilliertes Wasser	$0.25 \pm 0.02$	$0.24 \pm 0.06$
	AB-Humanserum	1.29 ± 0.02	0.55 ± 0.09
	DMEM	1.88 ± 0.50	0.06 ± 0.02

Die antibakterielle Wirkung der Cu-PIII Oberfläche wurde mit dem methillinresistenten *Staphylococcus aureus* – Stamm (MRSA) "Norddeutscher Epedemiestamm" (ST 247; Kultursammlung des Friedrich-Löffler-Instituts für medizinische Mikrobiologie, Universität Greifswald, Referenzstamm) untersucht (Unterauftrag IMaB). Auf einer unbehandelten Ti-6AI-4V-Oberfläche wurden nach Aussaat von 10 µl einer Lösung ( $10^6$  Bakterien/ml) 1400±150 koloniebildende Einheiten (CFU) gezählt. Diese Keimzahl wird auch auf den üblicherweise verwendeten Streifen aus Polyethylen als Positivreferenz gefunden. Implantationsströme von 0,5 – 5 mA führen zu einer geringen Reduktion überlebender CFU (Abb. 86). Ströme > 16 mA und daraus folgend Ionenströme von bis zu 63.5 x  $10^{17}$ Ionen/cm<sup>2</sup> hingegen reduzieren unter Erreichen der Detektionsgrenze die CFU um bis zu drei Größenordnungen.





Abb. 86: Antibakterielle Aktivität von Cu-PIII Oberflächen als Funktion der Implantationsstromstärke im Vergleich zum unbehandelten Ti-6AI-4V.

Die Korrelation zwischen Cu-Release, antimikrobieller Wirksamkeit und Vitalität der Osteoblasten wird in Abb. 87 als Funktion des Implantationsstromes beim Cu-PIII-Prozess beschrieben. Das Cu-Release und die Vitalität der Osteoblasten hängen linear über den gesamten untersuchten Bereich des Implantationsstromes ab. Implantationsströme von 1 - 16 mA und damit ein Cu-Release von 0.2 - 0.5 mmol/l sind ausreichend, um 80 – 99 % der *Staph. aureus* CFU zu töten. Ströme < 16 mA gewährleisten eine Vitalität der MG-63 Zellen von mehr als 60 %. Dies ist in guter Übereinstimmung mit Cu-Releasewerten in einer Größenordnung von 0.5 mmol/l, ermittelt in einer Studie zum Einfluss von Kupfer auf die Vitalität von MG-63 und mesenchymalen Stammzellen.





Abb. 87: Korrelation von Cu-Release (24h), antibakteriellen Tests mit *Staph. aureus* (Referenz ~ 1300 Keime) und Vitalität der Osteoblasten MG-63 bei Variation der Implantationsstromstärke bei U=5 kV in DMEM. Ströme größer als 16 mA senken die Keimzahl beträchtlich, das Cu-Release steigt auf mehr als 0,5 mmol/l an.

# Kombination von antibakterieller und zelladhäsiver Implantatoberfläche (Cu-PIII + PPAAm)

Die Herausforderung in diesem Projekt war die Kombination einer zelladhäsiven PPAAm-Schicht mit der anti-bakteriell wirksamen Cu-PIII-Oberfläche. Das durch Plasma-Ionen-Immersions-Implantationstechnik (PIII) in die Titanoberfläche implantierte Kupfer im methodischen Ansatz Cu-PIII-Ti6AI4V (DC=90%) konnte zwar einerseits eine anti-bakterielle Wirkung hervorrufen, gleichzeitig reagierten die Osteoblasten aber bereits nach 1 h sehr sensitiv auf die zu hohe Cu-Konzentration (Abb. 88). Hier ist eine längere Grundlagenforschung nötig, um eine Barriere zwischen Cu-PIII-Oberfläche und zelladhäsiver Beschichtung z.B. mit PPAAm herzustellen.





## Spreading of MG63 on TiAIV-CuPIII + PPAAm after 1h n = 2

### II.1.5 Leitthema PlasmaOpt

Das Leitthema PlasmaOpt war das einzige Forschungsthema im Campus PlasmaMed, in dem keine Atmosphärendruck-Plasmaquellen, sondern Plasmalampen genutzt wurden. Aufgrund dieser besonderen Stellung wurde auf Empfehlung des Projektträgers im Sinne einer Konzentration der Ressourcen des Campus PlasmaMed die Bearbeitung dieses Leitthemas in der zweiten Hälfte der Förderphase stark reduziert und die Möglichkeit der Einbindung in geeignete Projekte des Förderschwerpunktes "Optische Technologien" des BMBF geprüft.

Das Projekt PlasmaOpt konzentrierte sich auf plasmatechnologische und medizinische Untersuchungen zur Verbesserung der Beleuchtungssituation im klinischen Bereich, wobei die Beeinflussung der circadianen Rhythmik des menschlichen Organismus durch den Einsatz spezifisch angepasster Lichtquellen im Focus steht. Erwartet werden positive Auswirkungen auf das Schlafverhalten und den Heilungsprozess, welcher durch eine ungestörte Funktion der circadianen Regelmechanismus maßgeblich unterstützt wird. Dies gewinnt u.a. an Bedeutung, da im klinischen und insbesondere im intensivmedizinischen Bereich häufig über Schlafstörungen und gestörte circadiane Funktionen berichtet wird.

Abb. 88: Ausbreitung der Knochenzellen (Spreading von MG-63 Osteoblasten) auf der Cu-PIII-Ti6Al4V -Oberfläche mit und ohne PPAAm. Beachte - die Kupferkonzentration mit DC90 ist zu hoch, sodass signifikant kleinere Zellflächen messbar sind, d. h. die Okkupation der Oberfläche ist behindert (\*\*\*p≤0.001, Oneway ANOVA posthoc Bonferroni , LSM 410).


Im Projekt soll nachgewiesen werden, dass eine modifizierte Beleuchtung auf Intensivstationen die circadiane Rhythmik unterstützten kann, indem am Tag die notwendigen Lichtreize zur Synchronisation gegeben werden und nachts bei ausreichender Notfallbeleuchtung ungestörten Schlaf ermöglicht wird.

Unter anderem ist die Durchführung einer auf mehrere Monate angelegten Studie zum Einsatz neuartiger Beleuchtungssysteme auf einer Intensivstation vorgesehen. Zentrale Zielstellung der Arbeiten im ersten Teil des Projektes war die Vorbereitung dieser Studie. Hierzu zählen die Erarbeitung einer geeigneten Testsituation unter medizinischen und lichttechnischen Gesichtspunkten, das Finden einer dem Muster möglichst gut entsprechenden Intensivstation für die praktische Umsetzung und die Auswahl geeigneter Lichtquellen. Darüber hinaus sollten die Randbedingungen der Studie durch Auswertung eigener Vorarbeiten, zusätzlichen Recherchen und Voruntersuchungen weitgehend geklärt werden.

Die durchgeführten Arbeiten konzentrierten sich auf vier Teilaufgaben. Als erstes wurden Vorkenntnisse zur Auswahl von circadian wirkenden Lichtquellen und zu erwartenden Einflüssen u.a. auf auswertbare Parameter unter den speziellen Bedingungen der Intensivmedizin durch Recherchen und Auswertungen von Vorarbeiten ergänzt. An zweiter Stelle stand die Kontaktaufnahme mit einer Reihe von Intensivstationen, um optimale Bedingungen für eine Studie zu eruieren. Zum dritten wurde ein Modell erarbeitet, mit dem sich die circadiane Wirksamkeit anhand des Spektrums abschätzen und zu einem einzelnen Wirkfaktor "acv" zusammenfassen lässt. Viertens wurde in zwei Messkampagnen der Einfluss künstlichen Lichts auf den Melatoninausstoß in den Abendstunden mittels einer Studie analysiert, in der unterschiedliche Leuchtdichteverteilungen und liegende Probanden untersucht wurden. Letztere war notwendig, da aus bisherigen Untersuchungen nur die Wirkung von Lichtquellen mit unterschiedlichem Blauanteil im Spektrum oder unterschiedlicher Farbtemperatur bekannt ist. Die Beleuchtungsstärke und Dauer des jeweils im menschlichen Auge auftreffenden Lichts wurde in abgeschlossenen Studien bereits eingerechnet. Spezifika bei liegenden Probanden oder Einflüsse der Gerichtetheit des eintreffenden Lichts (etwa das Licht aus punktförmigen Quellen mit unterschiedlichem Einfallswinkel oder Streulicht aus großflächigen Quellen) blieben bisher jedoch unberücksichtigt. Bei der zweiten Kampagne wurde neben Ergänzungsmessungen zu diesem Thema zudem ein Vergleich mit LED-Lampen vorgenommen. Dieser musste jedoch wie bei früheren Versuchen am stehenden Patienten durchgeführt werden, da die Leuchtdichten nicht für den Test am liegenden Patienten ausreichend waren.



In Auswertung von Voruntersuchungen wurden für die Studie Lichtquellen ausgewählt, welche eine hinreichende circadiane Wirkung erwarten lassen. So erfolgte in der ersten Teilmessung ein Einsatz von Lichtquellen mit Farbtemperaturen oberhalb 4000 K, welche bei Anwendung in den Abendstunden eine Unterdrückung des Hormons Melatonin im Vergleich zum ungestörten Verlauf erwarten lassen. Hierbei wurde ein Modell erstellt und verwendet und damit Beleuchtungssituationen speziell für liegende Probanden gestellt und vermessen, welche drei verschiedene Szenarien repräsentieren (siehe Tabelle 4): eine gerichtete Lampe am Kopfende, eine gerichtete Lampe am Fußende und indirektes Licht von der Decke, welches durch einen Deckenfluter realisiert wurde. Um eine gute Vergleichbarkeit der Lichtsituationen zu ermöglichen, wurden Lampen mit weitestgehend gleicher Farbtemperatur verwendet. Eine gleiche Beleuchtungsstärke auf Augenniveau der Probanden wären ebenfalls wünschenswert gewesen, konnten wie in Tabelle 4 zu sehen jedoch aufgrund der Rahmenbedingungen nicht in vollem Maße realisiert werden.

Lampe	Position	Farbtemperatur	Intensität (mittig)
2x Spiegelwandleuchte	Kopfende	6500 K	442 Lux
2x Spiegelwandleuchte	Fußende	6500 K	107 Lux
Deckenfluter	diffus	5500 K	337 Lux

Tabelle 4: Parameter der Lichtsituationen der ersten Messkampagne im Schlaflabor

In der zweiten Versuchsreihe wurden hingegen sehr unterschiedliche Lampen verwendet, die eine ergänzende Sicht auf die erste Versuchsreihe ermöglichen sollte. So wurde die Situation mit Lampen am Kopfende nachgestellt, diese jedoch in diesem Fall mit Leuchten von 2000K Farbtemperatur ausgestattet. Außerdem wurde ein in Krankenhäusern üblicher Deckenstrahler mit 6500K-Lampen ausgestattet und durch Dimmung auf eine den Versuchen der ersten Versuchsreihe entsprechenden Intensität gebracht. Die zugrundeliegende Absicht war hierbei, neben reinen Punktstrahlern und völlig diffusem Licht eine weitere dazwischen liegende Variante zur Verfügung zu haben. Zudem wurde eine Natriumultrahochdruck-Lampe verwendet, die schon bei stehenden Probanden benutzt wurde, um den Effekt des Liegens selbst genauer zu quantifizieren.

rabbild dir alameter adi Elentenanaber					
Lampe	Position	Farbtemperatur	Intensität (mittig)		
2x Spiegelwandleuchte	Kopfende	2000 K	463 Lux		
Deckenstrahler	über Bett hängend, Trilux-Leuchte, Abstrahlung nach oben und unten	6500 K	406 Lux		

 Tabelle 5: Parameter der Lichtsituationen der zweiten Messkampagne im Schlaflabor



Natriumhochdrucklampe in Stehlampe als Deckenfluter	Abstrahlung an die Zimmerdecke, diffus	???	445 Lux
LED warmweiß	Spiegelwand – stehend	2000K	108 Lux (bei 175 cm Augenhöhe) 108 Lux (bei 160 cm Augenhöhe)
LED kaltweiß	Spiegelwand – stehend	4500K	107 Lux (bei 175 cm Augenhöhe) 101 Lux (bei 160 cm Augenhöhe)

Zusätzlich wurden Untersuchungen unter Verwendung einer warmweißen und einer kaltweißen LED-Lichtkette in die zweite Versuchsreihe integriert. Hier ergibt sich die Chance, für LED-Beleuchtungen erstmals die Wirkung auf die Melatoninunterdrückung unter den genannten praxisnahen Bedingungen zu testen und mit Plasmalichtguellen zu vergleichen. Leider war die Intensität der LED-Lichtketten nicht ausreichend, um Untersuchungen an liegenden Probanden mit Beleuchtungsstärken vergleichbar zu den anderen Quellen durchzuführen. Deshalb wurde die Wirkung auf stehende Probanden analysiert. Erwartet werden Ergebnisse, die sich gut mit Resultaten früherer Untersuchungen vergleichen lassen. Die Probandenauswahl und die medizinischen Untersuchungen erfolgten im Rahmen eines Unterauftrages durch die AG Schlafforschung und Klinische Chronobiologie Berlin (Dr. Dieter Kunz). Die Messungen wurden an jeweils 10 gesunden Probanden beiderlei Geschlechts in Dreiergruppen nach einem Zeitplan abhängig von ihrer habituellen "zu-Bettgeh-Zeit" über den Zeitraum einer Woche jeweils in den Abendstunden durchgeführt. Dabei verblieben die Probanden zuerst eine Stunde in der sogenannten "Dimlight"-Situation, die den Anstieg von Melatonin ermöglicht. Danach wurden sie eine halbe Stunde mit einer zufällig ausgewählten Versuchsanordnung beleuchtet, danach eine weitere Stunde erneut in Dimlight beobachtet. Während des gesamten Zeitraums wurden Speichelproben zur Bestimmung der Melatoninkonzentration genommen, während der Beleuchtung alle 10 Minuten, ansonsten jede halbe Stunde. Am ersten Abend, der sogenannten Adaptationsnacht wurde keine Testbeleuchtung angewendet. Dies diente jeweils der Eingewöhnung der Probanden an die Vorgehensweise.

Dieser Versuchsablauf entspricht dem in vorangegangenen Projekten ausgearbeiteten und bewährten Schema. Die Auswertung der Melatoninspiegel umfasste neben statistischen Analysen den Vergleich und die Normierung mit Standardverläufen sowie die Berücksichtigung unterschiedlicher Beleuchtungsdosen, was hier nicht näher ausgeführt werden soll. Die Auswertungen der ersten Messkampagne sind noch nicht vollständig abgeschlossen, die der zweiten liegen noch nicht vor.



Im Laufe der Recherchen und vorbereitenden Maßnahmen für die Studie auf einer Intensivstation ergaben sich eine Reihe von Kriterien und Problemstellungen, welche für eine optimale Durchführung der Studie zu beachten sind.

Die Untersuchungen sind über mindestens ein Winterhalbjahr auszuweiten, um die Wirkung künstlichen Lichts von der Einwirkung natürlichen Lichts in den Abendstunden separieren und insbesondere den Einfluss unter ungünstigen Ausleuchtbedingungen ermitteln zu können. Als messbare Größen und Erfolgskriterien sollten statistische Patientendaten bezüglich Schwere der Erkrankung und daraus folgender Erfolgsquote zur Gesundung dienen; es sollen keine zusätzlichen, die Behandlung möglicherweise gefährdenden Messungen am Patienten stattfinden. Als Vergleichsgruppe dient eine historische Kontrollgruppe (Vorjahrespatienten) der gleichen Intensivstation. Die daraus entstehende Problematik möglicher Quervariablen lässt sich aus organisatorischen und baulichen Gründen vermutlich nicht vermeiden, soll aber durch eine ausreichend große statistische Stichprobe so weit wie möglich vermieden werden. Aus diesem Grund sind Intensivstationen mit einander ähnlichen Krankheitsbildern und hohen Patientenzahlen zu bevorzugen.

Die Auswahl einer entsprechend geeigneten Intensivstation gestaltet sich aus verschiedenen Gründen äußerst schwierig. Allgemeine Intensivstationen sind aufgrund der hohen Varianz ihrer Patienten ungeeignet, da die Auswertung aller Parameter sehr aufwändig wäre. Zudem lässt die hohe Anzahl von zusätzlichen Heilungsfaktoren eine geringe statistische Signifikanz befürchten.

Aus diesen Gründen erschien die Auswahl einer Neugeborenen-Intensivstation eine geeignete Wahl. Die Patientenbilder von Frühgeburten sind sich (bei Ausschluss von Extremfällen, die i.a. separat behandelt werden) sehr ähnlich und somit für eine statistische Auswertung gut zugänglich. Es stehen mehrere kurzfristig einschätzbare Leistungsparameter (Gewichtszunahme, Verringerung der Beatmung, etc.) zur Verfügung. Zudem sind hohe Fallzahlen zu erwarten, da Neonatalogische Intensivstationen ein großes Einzugsgebiet besitzen.

Zugeordnete Recherchen konzentrierten sich auf Angaben zur Wahrnehmungsfähigkeit von Neugeborenen, ihrer Fähigkeit, einen circadianen Rhythmus zu entwickeln und möglicher schädigender Wirkungen durch Kunstlicht. Dabei wurde anhand der bestehenden Literatur deutlich, dass nur wenige Daten bezüglich dieses Themas existieren. Die bestehenden Publikationen lassen jedoch vermuten, dass Neu- und Frühgeborene ab der Geburt zur Wahrnehmung von Licht entsprechend befähigt sind und den circadianen Rhythmus zu entwickeln beginnen. Körperliche Schädigungen sind durch Licht nicht zu erwarten, denn die Erblindungsquote Frühgeborener konnte durch verringerte Lichtlevel nicht reduziert werden.



Mögliche psychische Abweichungen lassen sich nicht ausschließen, dies trifft jedoch für praktisch alle Interventionen an Frühgeborenen zu, da deren natürliche Umgebung stark von der realen einer Intensivstation abweicht. Zusätzliche Recherchen klärten weitere Wirkungen von Licht auf den Organismus und ihre Aktionsspektren ab, um die Wirkung zu installierenden Lampen noch besser abzuschätzen. Dabei wurde unter anderem die Vitamin D-Produktion, die Schädigung der Netzhaut, Linse und Hornhaut, sowie Schädigungen der Haut berücksichtigt. Es wurde dabei deutlich, dass UV-A-Strahlung aus den Lampen so weit wie möglich vermieden werden sollte, während UV-B-Strahlung zumindest einige positive Auswirkungen hat (Vitamin D).

Um optimale Bedingungen für die Installation alternativer Beleuchtungssysteme und die Durchführung der Tests zu finden, wurden verschiedene Intensivstationen im näheren Umfeld kontaktiert und besichtigt. Dabei wurde deutlich, dass in vielen Fällen eine Verbesserung der Beleuchtungssituation auch vom Pflegepersonal als positiv und wünschenswert eingeschätzt wird. In einigen Fällen stehen bauliche Probleme, geplante Umzüge oder hohe Belegungsdichten den geplanten lichttechnischen Veränderungen und Tests entgegen.

Mit der Kinderklinik im Krankenhaus Köln-Porz (Dr. Wiater), wurde ein Partner gefunden, der in das Projekt zusätzlich Erfahrungen in chronobiologischen Studien an Neugeborenen einbringen kann. Gemäß dem Stand der Vorbereitungen ist die Durchführung der geplanten Untersuchungen in der Neonatalogischen Intensivstation in Köln-Porz vorgesehen. Diese muß jedoch aufgrund von terminlichen und organisatorischen Problemen auf ein Nachfolgeprojekt verschoben werden. Als Voruntersuchung sollen jedoch die Unterschiede in der Entwicklung von im Sommer- und im Winterhalbjahr geborenen Kindern untersucht werden, um so Anhaltspunkte zu erhalten, die darauf hindeuten, dass die Beleuchtung auf Neonatalstationen eine Rolle spielt.





Abb. 89: Über alle Probanden gemittelter und auf den Anfangswert der Beleuchtung normierter zeitlicher Verlauf der Melatoninkonzentration.

Aus den Messdaten der oben dargestellten Untersuchungen konnten bereits erste Ergebnisse abgeleitet werden. Abb. 89 zeigt als Illustration die auf den Wert zu Beginn der Messungen normierten und für alle Probanden gemittelten Verläufe der Melatoninkonzentration für die drei Testsituationen (siehe Tabelle 4). Verglichen wird mit Normverläufen, welche Situationen ohne die Einwirkung von circadian wirksamen Lichts repräsentieren.

Wie aus der Abbildung ersichtlich, zeigt sich den Erwartungen entsprechend in allen drei Situationen eine Melatoninunterdrückung. Zusätzlich sind signifikante Unterschiede zwischen den Testsituationen zu registrieren. Die geringere Unterdrückung im Fall der Lichteinwirkung vom Fußende kann eine Folge der geringeren Beleuchtungsstärke sein. Die höchste Wirkung zeigt die Situation mit gestreutem Licht.

# II.1.6 Leitthema PlasmaLern

Im Rahmen des Leitthemas PlasmaLern wurde unter Leitung des Institutes für Physik der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald das Konzept für einen Masterstudiengang (Master of Science) "Plasmatechnik" entwickelt. Dieser gliedert sich in Hauptfach, Vertiefungsfach, Nebenfach im 1./2. Semester und die Masterarbeit im 3./4. Semester.

Das Hauptfach hat einen Umfang von 900 h (20 SWS) und unterteilt sich in die Lehrveranstaltungen Niedertemperatur-Plasmaphysik, Plasmadiagnostik, Reaktive und Staubige Plasmen, Plasmatheorie, Grundlagen der Plasmamedizin, Laborpraktikum und



Seminar. Als Vertiefungsfächer mit einem Umfang von 450 h (8 SWS) sind wahlweise Plasmamedizin, Hochtemperaturund Fusionsplasmen, Nanophysik oder Qualitätsmanagement möglich. Produktentwicklung und Als Nebenfach werden Betriebswirtschaftslehre, Wirtschaftsrecht, Forschungs- und Projektmanagement angeboten. Der zeitliche Umfang beträgt 450 h (8 SWS). Mit der Umsetzung der curricularen Inhalte wurde begonnen.

Probleme bereitet noch das Vertiefungsfach Plasmamedizin, für das bisher kein belastbares Curriculum entwickelt werden konnte. Eine Besserung wird erst mit der Besetzung der W2-Professure "Plasmamedizin" an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald erwartet. Für die übrigen Fächer (Hauptfach, Vertiefungsfächer I, III, IV und Nebenfach) kann nunmehr mit der konkreten Ausarbeitung (Modulhandhandbuch, Studienordnungen) begonnen werden. Die Fertigstellung ist für Mitte 2011 vorgesehen.

In diesem Zusammenhang noch zu erwähnen ist die dritte Sommerschule "PPST-Plasma Physics in Science and Technology" in Prag (17.-28.09.2009) sowie die Sommerschule "PAMS - Plasma Applications in Material Science" in Greifswald (16.-27. August 2010), organisiert von der Universität Greifswald in Kooperation mit INP und auswärtigen Partnern (Prag, Gdansk, Koszalin, Szczecin, Kiel), mit Beiträgen zur Plasmamedizin.

Weiterhin wurde das Konzept einer Weiterbildungsveranstaltung mehrfach überarbeitet und konkretisiert. Eine erste Weiterbildungsveranstaltung fand am 4. März 2010 in Schwerin in Verbindung mit BioConValley unter dem Thema "Marktplatz Gesundheit: Plasmamedizin – Neue Technik für bessere Heilungschancen und weniger Kosten" statt und richtete sich an Teilnehmer aus der Gesundheitsbranche (Ärzte, Krankenhäuser, Krankenkassen Medizintechnikindustrie, Forschung, Politik, Verbände, etc.). Veranstalter waren die BioCon Valley GmbH und die neoplas GmbH.

Es wurden außerdem zwei Demonstratoren fertig gestellt. Es handelt sich einerseits um eine Niederdruck-Mikrowellenanlage, andererseits um einen verfahrbaren PlasmaJet, der bei Atmosphärendruck arbeitet. Diese dienen der Einführung in die plasmaphysikalischen Grundlagen und der Einweisung in die Handhabung von Plasmaanlagen.

Die Bearbeitung dieses Leitthemas war zum Zwischenmeilenstein 2009 im Wesentlichen abgeschlossen. Es wird erwartet, dass die nach Vorliegen der Studienordnungen das Genehmigungsverfahren für den Master-Studiengang "PlasmaTechnik" an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald fortgeführt werden und eine Erprobung stattfinden kann.



# II.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Gesamthöhe des zahlenmäßigen Nachweises betrug EUR 3.223.000,00. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises sind die Personalkosten (mit EUR 1.858.930,00), gefolgt von den Aufträgen (EUR 650.600,00) und den Investitionen (EUR 450.350,00).

# II.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Der Campus PlasmaMed hat in seiner ersten Förderphase mit der anwendungsorientierten Erforschung von therapeutischen Plasmaanwendungen mit dem Ziel des klinischen Einsatzes weitestgehend Neuland betreten. Daher ergeben sich erhebliche Risiken im Detail der Umsetzung, die aus aktueller Sicht nur schwer einschätzbar sind. Aus betriebswirtschaftlicher Sicht wäre es daher für die beteiligten Verbundpartner nicht machbar gewesen, die gesamten Kosten und damit das Risiko allein zu tragen, zumal absehbar war, dass im Ergebnis des geförderten Projektzeitraumes noch keine produktionsreifen Anlagen entstehen werden. Nur im Rahmen der beantragten Zuwendung war es möglich, Industriepartner frühzeitig in dieses neue Anwendungsfeld Plasmamedizin einzubeziehen, von den guten Erfolgsaussichten einer Umsetzung der Erkenntnisse zu überzeugen und damit zukünftige Industriebeteiligungen strategisch vorzubereiten.

Eine Bearbeitung der komplexen Aufgabenstellungen war allein durch die einzelnen Partner des Projektes nicht möglich. Die dem Gesamtverbund Campus PlasmaMed zugrunde liegende Aufgabenstellung erforderte interdisziplinäres Arbeiten in einer Spannbreite, wie sie die einzelnen Partner allein nicht aufbauen konnten. Mit dem Campus PlasmaMed ist es gelungen, alle relevanten Partner für die Erreichung der Ziele des Verbundes zusammenzubringen. Die spezielle Thematik machte es erforderlich, neue Wege in der Erzeugung und Anwendung von Plasmen zu gehen. Die Vielfalt an zu lösenden Fragestellung sowie deren hohe Komplexität bedingte, immer wieder neue Lösungsansätze zu untersuchen. Der dadurch generierte hohe Aufwand an Personal- Sach- und Verbrauchsmitteln war von den im Campus PlasmaMed mitarbeitenden Einzelinstitutionen aus deren Grundfinanzierung nicht zu bestreiten. Daher war für den gesamten Campus PlasmaMed die beantragte Zuwendung zwingend notwendig.



# II.4 Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplanes

# II.4.1 Wirtschaftliche Erfolgsaussichten

Aufgrund der im Campus PlasmaMed erzielten wissenschaftlichen Ergebnisse wurden die Voraussetzungen für eine zweite Förderphase geschaffen, in der die wirtschaftliche Verwertung der Forschungsergebnisse strategisch in zwei Stufen erfolgen soll:

<u>1. Stufe:</u> Konsolidierung von in der ersten Förderphase fokussierten Anwendungen mit dem Ziel, diese nach Ende der zweiten Förderphase unter finanzieller Industriebeteiligung in Produkte zu überführen und die Markteinführung anzustreben. Konkrete Verwertungspotentiale sind vor allem aus den Ergebnissen der Leitthemen **PlasmaDerm**, **PlasmaDent** und **PlasmaImp** sowie begleitend aus den Leitthemen **PlasmaQuellen** und **PlasmaSept** abzuleiten.

2. Stufe: Fokussierung möglicher weiterer Anwendungen ("Pipeline") mit dem Ziel, diese nach Abschluss der zweiten Förderphase des Campus PlasmaMed im Rahmen weiterer Projekte zu konsolidieren. Potentiale für eine mittelfristige Weiterführung der anwendungsorientierten Forschungsarbeiten und damit eine Nachhaltigkeit der interdisziplinären und überregionalen Forschungskooperation des Campus PlasmaMed finden sich vor allem in den Ergebnissen des Leitthemas PlasmaCure.

Die wesentlichen Eckpunkte von Verwertungsmöglichkeiten der ersten Stufe sind folgendermaßen zusammenzufassen.

Im Leitthema **PlasmaDerm** werden zwei Plasmaquellen (Plasmajet und DBD-Plasma) zur Behandlung von oberflächlichen entzündlichen Hauterkrankungen als besonders aussichtsreich eingeschätzt. Vor allem bei der bisher sehr zeitaufwändigen und mit hohen Rezidivraten verbundenen **Behandlung von Haut- und Nagelpilzen** – ca. 10 Mio. Patienten sind allein in Deutschland davon betroffen – kann durch Reduzierung der Behandlungskosten von derzeit ca. 2000 EUR (3-6monatige konventionelle Behandlung) auf ca. 100 EUR (1-2malige Plasmabehandlung) eine **Kosteneinsparung von bis zu 20 Mrd. EUR** im Falle eines flächendeckenden Einsatzes der plasmabasierten Therapie erreicht werden.

Aus den Forschungsarbeiten des Leitthemas **PlasmaDent** erscheint insbesondere die plasmabasierte Behandlung von Zahnimplantaten zur **Prophylaxe und Therapie der Periimplantitis** gewinnträchtig. Der Zahnimplantatmarkt als Teil der Dentalindustrie ist weltweit sehr groß und weist im Augenblick die größten Wachstumsraten auf. Seit 2000 wächst der Implantatmarkt in Deutschland exponentiell an. Aufgrund der steigenden



zahnlosen Bevölkerung weltweit sowie der immer besseren Prognose von Implantaten zum Ersatz von einzelnen Zähnen bzw. als Brückenanker auch in schwierigen knöchernen Implantatlagern wird der Implantatmarkt wahrscheinlich weiterhin im zweistelligen Bereich wachsen. Es ist davon auszugehen, dass bei 20–40 % aller Implantate innerhalb von 10 Jahren eine Periimplantitis auftritt. Wenn sich allein in Deutschland 1-2% der Betroffenen einer chirurgischen Periimplantitisbehandung unterziehen würden, wären dies 2011 ca. 250.000-500.000 Patienten, was nach der Gebührenordnung für Ärzte und Zahnärzte einem **Kostenumfang zwischen 90 Mio. und 250 Mio. EUR** entspricht. Durch Plasmabehandlung können durch Reduzierung des chirurgischen Eingriffs und Verzicht auf den Einsatz von Knochenersatzmaterial die Behandlungskosten verringert werden. 2010 gibt es in Deutschland 1,6 Millionen Patienten mit Implantaten. Zurzeit nehmen ca. 50% der Bevölkerung professionelle Zahnreinigungen wahr, der Anteil unter den Implantatpatienten, die sich für eine durch Plasmabehandlung einfachere und weniger belastende Implantatprophylaxe entscheiden würde, dürfte noch höher sein.

Potentielles Interesse an Plasmaquellen v.a. zur Implantatbehandlung (Biofilmabtrag, knöcherne Reosseointegration) besteht bei Straumann AG, Basel und **Sirona Dental Systems GmbH, Bensheim**. Sirona hat zusätzlich Interesse an plasmabasierten Verfahren zur Behandlung von parodontal geschädigten Zähnen sowie zur Wurzelkanalbehandlung in der Endodontologie und dies in einem **Letter of Intent** zum Ausdruck gebracht.

Die Forschungsarbeiten im Leitthema PlasmaQuellen stellen die Basis für die wirtschaftliche Verwertung der Ergebnisse aus PlasmaDerm und PlasmaDent dar. Eine der weitesten etablierten Plasmaquellen des Campus PlasmaMed ist der am Atmosphärendruck-Plasmajet kINPen 09, für den in Kooperation mit der der neoplas GmbH eine CE-Zertifizierung erlangt wurde und der als Plasmajet für technische Anwendungen angeboten wird. Die Cinogy GmbH Duderstadt hat mit der von ihr angebotenen DBE-Plasmaquelle erste Anwendungserfahrungen auf dem Gebiet der Kosmetik. Aus gegenwärtiger Sicht haben beide Plasmaquellen das Potential, als Medizinprodukte für therapeutische Anwendungen eingesetzt zu werden. Bei erfolgreicher Konzeptionierung verschiedener Plasmaquellen und -prinzipien gemeinsam mit den potentiellen klinischen Anwendern wird es den industriellen Verwertern ermöglicht, die entstandenen Labormuster in Prototypen und nach klinischen Prüfungen in (Serien-)Produkte zu überführen.

Dies gilt in ähnlicher Weise für das Verwertungspotential aus dem Leitthema **PlasmaSept**, das in der zweiten Förderphase unter der Bezeichnung PlasmaVitro mit modifizierter Zielstellung fortgeführt wird. Auf der Basis des vorhandenen Methodenspektrums zur *Invitro*-Erfassung biologischer Effekte von Atmosphärendruckplasmaquellen soll eine



Testroutine als Standard-Screeningprogramm etabliert werden, die kann in einem neu zu gründenden oder als Teil eines bestehenden Unternehmens aufzubauenden Plasmamedizinischen Prüflabor verwertet werden kann, welches in Kombination mit der Erfassung und Dokumentation plasmaphysikalischer und technischer Parameter eine umfassende Dienstleistung zur Grundcharakterisierung von Plasmaquellen, für biomedizinisch-experimentelle oder medizinisch-therapeutische Anwendungen anbietet. Erste Anfragen nach biologischen Testungen von Plasmaguellen sind bereits eingegangen. Die Wirtschaftlichkeit eines Plasmamedizinischen Prüflabors lässt sich durch ein verbreitertes Spektrum an Methoden aus anderen Leitthemen verbessern, wenn damit nahezu das gesamte experimentelle und technische Know-how des Campus PlasmaMed im Rahmen von Dienstleistungsangeboten verwertbar gemacht werden kann.

Die Initiative des INP Greifswald zur Normung und Standardisierung von Plasmaquellen für biomedizinische Anwendungen schafft eine wesentliche Voraussetzung für die wirtschaftliche Verwertung von Plasmaquellen für therapeutische Anwendungen.

Darüber hinaus sind mit der Fortführung der Untersuchungen zu Plasma-Flüssigkeits-Wechselwirkungen auch potentielle Verwertungen im Bereich der Flüssigkeitsdekontamination zu erwarten.

Aus den Ergebnissen des Leitthemas Plasmalmp ist ein hohes Verwertungspotential vor allem auf dem Gebiet der Optimierung von Implantatoberflächen in der Orthopädie und Traumatologie zu sehen, wobei es um die Herstellung definierter Oberflächeneigenschaften geht, die bioaktiv bzw. (anti)-adhäsiv oder anti-mikrobiell (neben dem Erhalt der Biokompatibilität) wirken. Die Vermeidung kosten- und zeitaufwändiger Wechseloperationen und Nachbehandlungen von Dauerimplantaten aufgrund septischer Lockerung sowie der post-operativen Osteititis erheblicher sozio-ökonomischer ist von Bedeutung. Implantatassoziierte Infektionen sind mit hoher Morbidität verbunden und führen zu erheblichen Kosten im Gesundheitswesen. Allein durch die Therapie der postoperativen Osteititis nach infizierter Osteosynthese entstehen in Deutschland jährlich ca. 500 Mio. EUR Behandlungskosten. Der Markt für Beschichtungsleistungen weltweit wird etwa auf 10 % des Medical Device Marktes geschätzt. Das entspricht für orthopädische Implantate einem Marktvolumen von ca. 20 Mrd. EUR. Damit könnte sich aus einer Verbesserung der Implantateigenschaften durch plasmabasierte Behandlungsverfahren nicht nur ein gesundheitsökonomisches Einsparpotential, sondern auch ein erhebliches Umsatzpotential für Implantathersteller ergeben. Es wird angestrebt, dass im Rahmen von Plasmalmp konzipierte Verfahren mittels Technologietransfer in innovative Unternehmen auf dem Medizintechniksektor überführt werden.



Aus den Arbeiten zur plasmabasierten Inaktivierung von Biofilmen im Rahmen des Leitthemas **PlasmaCure** ergibt sich die Möglichkeit der **Aufbereitung weicher Kontaktlinsen** im Trageprozess bzw. weiterer Medizinprodukte, die am Körper eingesetzt werden (Prothesen, Diabetikerbesteck), als erfolgversprechendes Verwertungspotential. Allein in Deutschland gibt es etwa **2 Mio. Kontaktlinsenträger**, wobei das Marktpotential bei Brillenträgern noch lange nicht ausgeschöpft ist. Viele Brillenträger würden Kontaktlinsen tragen, wenn sie von ihrem Arzt oder Optiker entsprechend informiert und beraten würden. Plasma wäre für die Masse der Kunden sehr attraktiv, da die tägliche Desinfektion günstig, einfach und trotzdem sicher möglich wäre. Gleiches trifft auf den Plasmaeinsatz von Diabetikerbesteck zu. Die zumeist älteren Patienten wären über eine einfache und trotzdem sichere Desinfektion dankbar. Die steigende Anzahl von Diabetikern in unserer alternden Gesellschaft führt zu zusätzlicher Erhöhung des Marktsegments.

# II.4.2 Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten

In der ersten Förderphase 2008-2010 konnte sich der Campus PlasmaMed als Zentrum der plasmamedizinischen Forschung weltweit Anerkennung verschaffen.

Vom 4. bis 6. Februar 2009 fand in Greifswald der "Second International Workshop on Plasma-Tissue Interactions (PTI-2)" statt. Auf der kurz darauf in San Antonio, Texas, USA stattfindenden "Second International Conference on Plasma Medicine (ICPM-2)", auf der der Campus PlasmaMed mit mehreren Beiträgen erfolgreich vertreten war wurde beschlossen, die bisher ausschließlich in den USA stattgefundenen Plasmamedizin-Konferenzen (2007 und 2009) und die in Greifswald veranstalteten Workshops (2007 und 2009) künftig als gemeinsame Konferenzen mit weltweit wechselnden Veranstaltungsorten fortzuführen. Als Plattform für diese Konferenzen wurde die "International Society for Plasma Medicine (ISPM)" gegründet.

Vom 19. bis 24 September 2010 fand daraufhin die "Third International Conference on Plasma Medicine (ICPM-3)" in Greifswald statt. Diese Konferenz war mit 184 Teilnehmern aus 24 Ländern die bis dahin größte ihrer Art. Auf dieser Konferenz wurde die Präsidentschaft bis 2012 der "International Society for Plasma Medicine (ISPM) an den Campus-Sprecher Prof. K.-D. Weltmann übertragen.

Die nationale Sichtbarkeit der plasmamedizinischen Forschung in Greifswald wurde vor allem auf zwei überregionalen Veranstaltungen dokumentiert:

 einem Workshop "Plasmamedizin" am 2.März 2010 in Erfurt, organisiert durch den ak-adp – Anwenderkreis Atmosphärendruckplasma unter Mitwirkung des INP



Greifswald, auf dem alle wichtigen auf dem gebiet der Plasmamedizin tätigen Forschergruppen aus Deutschland vertreten waren

dem 20. Marktplatz Gesundheit in Schwerin am 4. März 2010 zum Thema "Plasmamedizin – Neue Technik für bessere Heilungschancen und weniger Kosten", veranstaltet von der BioCon Valley GmbH und der neoplas GmbH.

Begleitet wurde diese Entwicklung durch eine Vielzahl eingeladener Vorträge auf nationalen und internationalen Konferenzen sowie eine gesteigerte Publikationstätigkeit vor allem im Jahre 2010. Damit sind beste Voraussetzungen für eine Internationale Sichtbarkeit geschaffen worden. Mit der deutlichen Fokussierung auf die anwendungsorientierte Forschung bildet der Campus PlasmaMed die notwendige komplementäre Ergänzung zu dem auf Grundlagenforschung orientierten Zentrum für Innovationskompetenz (ZIK) "plasmatis – Plasma plus Zelle" Greifswald. Die dort konzentrierte Grundlagenforschung zu Plasma-Zell- bzw. Plasma-Gewebe-Wechselwirkungen wird Erkenntnisse bringen, die im Rahmen des Campus PlasmaMed anwendungsorientiert untersucht werden. Gleichzeitig können grundlegende Probleme und Fragestellungen, die sich im Rahmen der des Campus PlasmaMed anwendungsorientierten Forschung ergeben, die an Forschergruppen des ZIK plasmatis gegeben werden. Damit verbunden ist die Gewährleistung der für eine international ausstrahlende Spitzenforschung erforderlichen kritischen Masse an interdisziplinärer Forschungskapazität. Somit wird ein entscheidender Beitrag zur Nachhaltigkeit beider Forschungseinrichtungen geleistet. In der zweiten Förderphase ist diese internationale Sichtbarkeit durch konkrete Kooperationen fortzuführen und auszubauen. Gespräche laufen bereits mit der Technischen Universität Eindhoven, Niederlande (Prof. G. Kroesen), dem Polytechnic Institute der New York University, USA (Prof. K. Becker), der Graduate School of Engineering der Universität Osaka, Japan (Prof. S. Hamaguchi) und der Universität Bologna, Italien (Prof. V. Colombo).

Die Forschungsergebnisse des Campus PlasmaMed fließen, sofern nicht die Interessen der industriellen Verwertung verletzt werden, in Vorlesungen an Hochschulen (insbes. Universitäten Greifswald und Rostock, Fachhochschule Stralsund) ein. Der in der ersten Förderphase im Leitthema PlasmaLern konzipierte Masterstudiengang "Plasmatechnologie" an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, der die Plasmamedizin als ein Vertiefungsfach explizit anbietet, wird mit Beteiligung des Max-Planck-Institutes für Plasmaphysik innerhalb der zweiten Förderphase des Campus PlasmaMed eingeführt, wenn das Institut für Physik der Ernst-Moritz-Arndt-Universität dem zustimmt. Die seit dem Wintersemester 2009/2010 im Rahmen der Lehrveranstaltungen des Institutes für Physik der



Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald angebotene Vorlesung "Einführung in die experimentelle Plasmamedizin" wird fortgesetzt und für andere Studiengänge weiter geöffnet. Weiterhin werden Vorlesungen zur Plasmamedizin im Rahmen von Internationalen Sommerschulen angeboten.

Weiterhin wurden Vorlesungen zur Thematik "Plasmamediizin" im Rahmen der Sommerschulen "PPST-Plasma Physics in Science and Technology" in Prag (17.-28.09.2009) sowie "PAMS - Plasma Applications in Material Science" in Greifswald (16.-27. August 2010) sowie im Rahmen der Vorlesungsreihen "Biosystem-Material-Interaktion" an der interdisziplinären Fakultät der Universität Rostock im Wintersemester 2009/2010 und 2010/2011 angeboten.

Zum 1. Juli 2011 wird an der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald die weltweit erste Professur für Plasmamedizin besetzt. Damit wird der Grundstock für eine langfristige Etablierung dieses neuen Forschungsgebietes auch als universitäres Lehrfach gelegt.

Mit diesem forschungsstrategischen Ansatz werden bestmögliche Voraussetzungen für Lehre, Forschung und Studium auf internationalem Niveau geschaffen. Die daraus resultierende nachhaltige Personalgewinnung betrifft sowohl eine gezielte Nachwuchsförderung und praxisnahe Qualifizierung als auch die Gewinnung und Haltung hochkarätiger Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler.

# II.4.3 Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Trotz der dargestellten erfolgreichen wissenschaftlichen Ergebnisse der und aufgezeichneten wirtschaftlichen Erfolgsaussichten sind produktionsreifen Anlagen oder in die Therapie eingeführte Verfahren bisher noch nicht unmittelbar absehbar. Es ist jedoch Ziel der zweiten Förderphase, die Bereitstellung von Plasmaguellen und speziellen therapeutischen Anwendungen durch eine Verstetigung der Kooperationen mit Industriepartnern so weit voranzutreiben, dass im Anschluss eine - möglicherweise bilaterale – Überführung zu Prototypen und Produkten unter maßgeblicher Beteiligung oder auf Initiative von Industriepartnern erfolgen kann und damit ein sich selbst tragendes Wachstum ermöglicht wird.

Parallel zur zweiten Förderphase des Campus PlasmaMed werden die Forschungsarbeiten im Zentrum für Innovationskompetenz (ZIK) "plasmatis – Plasma und Zelle" mit voller Kapazität laufen. Durch verstärkte Kooperationen vor allem der Leitthemen mit präklinischen Forschungsinhalten mit dem ZIK wird die Nachhaltigkeit der anwendungsrelevanten



Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Plasma-Zell- bzw. Plasma-Gewebe-Wechselwirkungen am Wissenschaftsstandort Greifswald gesichert.

Für die plasmamedizinischer Grundlagenforschung wird zukünftig verstärkt auch eine Förderung durch die DFG-Forschergruppe angestrebt, in der neue, bisher in den Leitthemen des Campus PlasmaMed nicht berücksichtigte Aspekte plasmamedizinischer Forschung realisiert werden sollen, um die wissenschafliche Exzellenz der im Campus PlasmaMed kooperierenden Wissenschaftler und Institutionen auch mittelfristig zu sichern.

Weiterhin muss im Verlauf der zweiten Förderperiode des Campus PlasmaMed ein Konzept für eine nachhaltige Campus-Struktur in Form eines von den beteiligten Einrichtungen gemeinsam getragenen eingetragenen Vereins (e.V.), einer gemeinnützigen GmbH (gGmbH), eines wissenschaftlichen Institutes oder einer anderen strukturunterstützenden Maßnahme erarbeitet werden, das die Grundlage für die institutionelle Etablierung sowie die mittel- und langfristige Erhaltung und den Ausbau eines leistungsfähigen und international sichtbaren Forschungsstandortes für Plasmamedizin in der Region schafft.

# II.5 Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Es ist grundsätzlich festzustellen, dass im Verlauf der ersten Förderphase des Campus PlasmaMed das Forschungsgebiet biologischer Plasmaanwendungen und insbesondere der Plasmamedizin international einen immensen Aufschwung erfahren hat. Das äußert sich neben einer zunehmenden Zahl von Einzelpublikationen auch darin, dass führende internationale Zeitschriften "Focus Issues" oder "Special Issues" zu diesem Themenfeld publizieren. So hat das "New Journal of Physics" im November 2009 einen Themenband "Focus on Plasma Medicine" publiziert. Das "Journal of Physics D: Applied Physics" hat seine wichtigsten seit 2006 publizierten Artikel zum Thema Plasmamedizin auf seiner Website exklusiv zusammengestellt sowie gezielt zur Einreichung weiterer Arbeiten eingeladen. Die Zeitschrift "IEEE Transactions on Plasma Science" hat einen Sonderband mit dem Titel "Nonthermal Medical/Biological Applications Using Ionized Gases and Electromagnetic Fields" im Sommer 2010 publiziert. Nach einem ersten Special Issue "Plasma Medicine" der Zeitschrift "Plasma Processes and Polymers" im August 2008 ist im März 2010 ein zweiter Sonderband zu dieser Thematik erschienen. Vor allem diese Sonderausgaben wissenschaftlicher Zeitschriften spiegeln den aktuellen internationalen Stand der Forschung hervorragend wieder.



Das Bemühen mehrerer angesehener wissenschaftlicher Journale um spezielle Profilierung auf dem Gebiet der Plasmamedizin bestätigt einerseits den mit der Förderung des Campus PlasmaMed vorgenommenen Auf- und Ausbau eines hochinnovativen Gebietes der internationalen Spitzenforschung. Andererseits steigt dadurch der Konkurrenzdruck auf den Campus PlasmaMed.

Darüber hinaus ist die Plasmamedizin bzw. das generelle Thema "Plasmen für Biologie und Medizin" mittlerweile auf allen wichtigen internationalen plasmaphysikalischen Konferenzen in mitunter erheblichem inhaltlichem Umfang etabliert.

Haupt-Wettbewerber bleibt nach wie vor die Arbeitsgruppe um A. Fridman und G. Friedman an der Drexel University, Philadelphia, USA, die zunehmend auf Grundlagenforschung setzt, nachdem sie in den letzten Jahren vor allem mit spektakulären Einzelergebnissen an die Öffentlichkeit gegangen war. Hier wie auch in der Arbeitsgruppe um G. Morfill am Max-Planck-Institut für extraterrestrische Physik (MPE) Garching, dem Hauptwettberber in Deutschland, liegt der Fokus potentieller Plasmaanwendungen vor allem auf dem Gebiet Dermatologie und Wundheilung. Beide Gruppen haben mittlerweile Unternehmen gegründet (Plasma Technologies Inc., Corpus Christi, TX, USA), bereiten Gründungen vor oder arbeiten mit Unternehmen zusammen (Max-Planck-Innovation GmbH München), die in den Gruppen entwickelte Plasmaquellen für spezielle Anwendungen an den Markt bringen sollen. Beide Gruppen sind auch bemüht, überregionale interdisziplinäre Verbünde zu bilden, um damit ihre wissenschaftliche Leistungsfähigkeit und Ausstrahlungskraft zu intensivieren. Ein 2007/2008 bei der National Science Foundation (NSF) in den USA vorgelegter Förderantrag für ein "Plasma Medicine Engineering Research Center" unter Federführung der Drexel University, Philadelphia ist knapp gescheitert, es ist allerdings bekannt, dass eine modifizierte Form eines Antrages für einen solchen Verbund erneut in Beantragung ist. Daneben gibt es ein bilaterales internationales Forschungsprojekt zwischen Drexel University und Université d'Orléans (Laufzeit: 09/08-10/11, Volumen: 140.000 USD).

Als weitere starke Gruppe in Europa hat sich eine Arbeitsgruppe um J.-M. Pouvesle an der **Université d'Orléans** in Frankreich herausgebildet, die eine Plasmaquelle für endoskopische Anwendungen konzipiert und bereits in einem ersten Tierexperiment zur Behandlung von Darmkrebs getestet hat. Ein dort angesiedeltes Verbundprojekt PLASMED aus akademischen Einrichtungen und Firmen mit dem Schwerpunkt auf dem Gebiet der angewandten Krebsforschung ist mit dem Campus PlasmaMed vom Ansatz her vergleichbar.

Die ehemals mit E. Stoffels identifizierbare Arbeitsgruppe an der **Technischen Universität Eindhoven**, Niederlande, die eine internationale Vorreiterrolle bei der Erforschung von



Plasma-Zell-Wechselwirkungen spielte, hat aufgrund tiefgreifender personeller Veränderungen ihre Aktivität vorübergehend eingeschränkt, ist jedoch derzeit dabei, ihren erneuten Einstieg in die plasmamedizinische Forschung durch Aufbau bzw. Wiederbelebung von Kooperationen vorzubereiten. Eine Kooperationsvereinbarung mit dem Campus PlasmaMed ist in Vorbereitung.

Durch Publikationen zu Plasma-Zell-Wechselwirkungen macht in letzte Zeit verstärkt eine Arbeitsgruppe um S. Coulombe von der **McGill University Montréal**, Kanada, auf sich aufmerksam.

Im Moment noch nicht exakt systematisierbar sind Aktivitäten auf dem Gebiet der Plasmamedizin im asiatischen Raum. Aktivitäten zur Etablierung von plasmamedizinischen Forschungszentren sind auch aus **Südkorea** bekannt. Seit längerem aktiv sind die japanischen Arbeitsgruppen um S. Hamaguchi an der **Graduate School of Engineering Osaka** sowie um H. Yasuda an der **Toyohashi University of Technology**. Im Dezember 2009 wurde bekannt, dass die **Peking University** ein Zentrum für Plasmamedizin einrichten wird. Die Leitung soll Michael Kong (**Loughborough University, UK**) übernehmen.

Darüber hinaus treten zunehmend bisher noch kleinere Gruppen vor allem auch aus Südkorea und China mit Publikationen in Erscheinung. Vor allem zu potentiellen Anwendungen im Dentalbereich ist eine steigende Zahl an Veröffentlichungen zu verzeichnen.

Auf dem Hintergrund der aktuellen Konkurrenzsituation sowie der international nachgewiesenen Aktualität und Zukunftsfähigkeit der Thematik hat die Förderung des Campus PlasmaMed die einzigartige Voraussetzung für eine konzentrierte und koordinierte interdisziplinäre Arbeit auf diesem Gebiet geschaffen.

# II.6 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Die im Förderzeitraum erzielten Ergebnisse sind in einer Vielzahl wissenschftlicher Publikationen veröffentlicht worden. Aufgrund der inhaltlich im Rahmen von Leitthemen organisierten Forschungsarbeit des Campus sind diese Publikationen üblicherweise institutionenübergreifend erfolgt, d.h. es waren verschiedenen Zuwendungsempfänger beteiligt. Im Folgenden werden die Veröffentlichungen aufgelistet, die in Verantwortung oder unter wesentlicher Beteiligung des INP Greifswald erfolgten.

### Leitthemen-übergreifend:

- A. Kramer, U. Lindequist, K.-D. Weltmann, C. Wilke, Th. von Woedtke. Plasma Medicine its perspective for wound therapy. GMS Krankenhaushyg Interdiszip. 3 (2008) Doc16
- K.-D. Weltmann. Th. von Woedtke, R. Brandenburg, J. Ehlbeck. Biomedical applications of atmospheric pressure plasma. Chem. Listy 102 (2008) s1450-s1451



- A. Kramer, N.-O. Hübner, O. Assadian, H. Below, C. Bender, H. Benkhai, B. Bröker, A. Ekkernkamp, W. Eisenbeiß, A. Hammann, B. Hartmann, C.D. Heidecke, P. Hinz P, I. Koban, S. Koch, T. Kocher, J. Lademann, O. Lademann, M.M. Lerch, S. Maier S, R. Matthes, G. Müller, I. Partecke, C. Rändler, K.-D. Weltmann, M. Zygmunt. Chancen und Perspektiven der Plasmamedizin durch Anwendung von gewebekompatiblen Atmosphärendruckplasmen (Tissue Tolerable Plasmas, TTP). GMS Krankenhaushyg. Interdiszip. 4 (2009) Doc10.
- A. Kramer, O. Assadian, H. Below, C. Bender, A. Hammann, B. Hartmann, N.-O. Hübner, I. Koban, T. Kocher, J. Lademann, R. Matthes, K.-D. Weltmann. Perspektiven der Plasmamedizin. Einsatzmöglichkeiten von gewebekompatiblen Atmosphärendruckplasmen (Tissue Tolerable Plasma, TTP). Vakuum in Forschung und Praxis 22, Nr. 2 (2010) 33-38
- K.-D. Weltmann, Th. von Woedtke. Campus PlasmaMed from basic research to clinical proof. IEEE Trans. Plasma Sci. 39 (2011) 1015-1025

### Leitthema PlasmaQuellen:

- H. Lange, R. Foest, J. Schäfer, K. D. Weltmann. Vacuum UV Radiation of a Plasma Jet operated with Rare Gases at Atmospheric Pressure. IEEE Trans. Plasma Sci. 37 (2009) 859-865; Special Issue: "Atmospheric-Pressure Plasmas: Science and Applications"
- R. Brandenburg, H. Lange, T. von Woedtke, M. Stieber, E. Kindel, J. Ehlbeck, K.-D. Weltmann. Antimicrobial Effects of UV and VUV Radiation of Nonthermal Plasma Jets. IEEE Trans. Plasma Sci. 37 (2009) 877-883; Special Issue: "Atmospheric-Pressure Plasmas: Science and Applications"
- K.-D. Weltmann, E. Kindel, R. Brandenburg, Ch. Meyer, R. Bussiahn, Ch. Wilke, Th. von Woedtke. Atmospheric pressure plasma jet for medical therapy: plasma parameters and risk estimation. Contrib. Plasma Phys. 9 (2009) 631-640
- R. Bussiahn, R. Brandenburg, T. Gerling, E. Kindel, H. Lange, N. Lembke, K.-D. Weltmann, Th. von Woedtke, T. Kocher. The hairline plasma: An intermittent negative dc-corona discharge at atmospheric pressure for plasma medical applications. Appl. Phys. Lett. 96 (2010) 143701
- R. Bussiahn, E. Kindel, H. Lange, K.-D. Weltmann. Spatially and temporally resolved measurements of argon metastable atoms in the effluent of a cold atmospheric pressure plasma jet. J Phys D: Appl. Phys. 43 (2010) 165201
- K.-D. Weltmann, E. Kindel, Th von Woedtke, M. Hähnel, M. Stieber, R. Brandenburg. Atmosphericpressure plasma sources: Prospective tools for plasma medicine. Pure Appl. Chem. 82 (2010) 1223-1237
- J. Ehlbeck, U. Schnabel, M. Polak,, J. Winter, Th. von Woedtke, R. Brandenburg, T. von dem Hagen, K.-D. Weltmann. Topical Review: Low Temperature Atmospheric Pressure Plasma Sources for Microbial Decontamination. J. Phys. D: Appl. Phys. 44 (2011) 013002
- A. Helmke, D. Hoffmeister, F. Berge, S. Emmert, P. Laspe, N. Mertens, W. Viöl, K.-D. Weltmann. Physical and Microbiological Characterization of Staphylococcus epidermidis Inactivation by Dielectric Barrier Discharge Plasma. Plasma Process. Polym. 8 (2011) 278-286

### Leitthema PlasmaPharm:

- Christian Schmidt: Biologische Dekontamination von Arzneidrogen mit Atmosphärendruck-Plasma. Diplomarbeit zur Erlangung des akademischen Grades Diplompharmazeut (Dipl.-Pharm.) an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald 2009
- Robert Banaschik: Untersuchungen zur Einsetzbarkeit physikalischer Plasmen zur antimikrobiellen Behandlung von Arzneidrogen. Diplomarbeit zur Erlangung des akademischen Grades Diplompharmazeut (Dipl.-Pharm.) an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald 2010

### Leitthema PlasmaSept:

Sarah Foerster: Möglichkeit der Behandlung kleiner Flüssigkeitsvolumina mit Atmosphärendruckplasma. Diplomarbeit zur akademischen Erlangung des Grades Diplompharmazeut (Dipl.-Pharm.) an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald 2008



- Diana Conze: Analytische und mikrobiologische Untersuchungen von Flüssigkeiten nach Behandlung mit Atmosphärendruckplasma. Diplomarbeit zur Erlangung des akademischen Grades Diplompharmazeut (Dipl.-Pharm.) an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald 2009
- Marco Neumann: Keratinozytenkultur als einfaches *In-vitro*-Modell zur Untersuchung von Plasma-Zell-Wechselwirkungen. Diplomarbeit zur Erlangung des akademischen Grades Diplompharmazeut (Dipl.-Pharm.) an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald 2010
- K. Oehmigen, M. Hähnel, R. Brandenburg, Ch. Wilke, K.-D. Weltmann, Th. von Woedtke The Role of Acidification for Antimicrobial Activity of Atmospheric Pressure Plasma in Liquids. Plasma Process. Polym. 7 (2010) 250-257; Special Issue "Plasma Medicine"
- K. Landsberg, Ch. Scharf, K. Darm, K. Wende, G. Daeschlein, E. Kindel, K.-D. Weltmann, Th. von Woedtke. Use of Proteomics to Investigate Plasma-Cell Interactions. Plasma Medicine 1 (2010) 55-63
- K. Wende, K. Landsberg, U. Lindequist, K.-D. Weltmann, Th. von Woedtke. Distinctive Activity of a Nonthermal Atmospheric-Pressure Plasma Jet on Eukaryotic and Prokaryotic Cells in a Cocultivation Approach of Keratinocytes and Microorganisms. IEEE Trans. Plasma Sci. 38 (2010) 2479 – 2485
- B. Haertel, K. Wende, Th. von Woedtke, K.-D. Weltmann, U. Lindequist. Non-thermal atmosphericpressure plasma can influence cell adhesion molecules on HaCaT-keratinocytes. Exp. Dermatol. 20 (2011) 282-284
- K. Oehmigen, J. Winter, Ch. Wilke, R. Brandenburg, M. Hähnel, K.-D. Weltmann, Th. von Woedtke. Estimation of possible mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by plasma treated sodium chloride solution. Plasma Process. Polym. 8 (2011) DOI:10.1002/ppap.201000099
- K. Oehmigen, T. Hoder, Ch. Wilke, R. Brandenburg, M. Hähnel, K.-D. Weltmann, Th. von Woedtke. Volume Effects of Atmospheric Pressure Plasmas in Liquids. IEEE Trans. Plasma Sci., Special Issue "Images in Plasma Science 2011", DOI: 10.1109/TPS.2011.2158242

### Leitthema Plasmalmp:

- A. Fritsche, M. Haenle, C. Zietz, W. Mittelmeier, F. Heidenau, H.-G. Neumann, B. Finke, R. Bader. Mechanical Characterisation of Anti-infectious, Anti-allergic and Bioactive Coatings on Orthopedic Implant Surfaces. J. Material Sci. 44 (2009) 5544-5551.
- K. Schröder, B. Finke, F. Lüthen, H. Jesswein, R. Ihrke, A. Ohl, K.-D. Weltmann, A. Diener, J. Rychly, J.B. Nebe. Similarities between plasma amino functionalized PEEK and titanium surfaces concerning enhancement of osteoblast cell adhesion. J. Adhesion Sci. Technol. 24 (2010) 905–923.
- H. Rebl, B. Finke, J. Rychly, K. Schröder, J.B. Nebe. Positively charged material surfaces generated by plasma polymerized allylamine enhance vinculin mobility in vital human osteoblasts. Advanced Biomat. 12/8 (2010) 356-364
- H. Rebl, B. Finke, K. Schroeder, J.B. Nebe. Time-dependent metabolic activity and adhesion of human osteoblast-like cells on sensor chips with a plasma polymer nanolayer. Int. J. Artif. Organs 33 (2010) 738-748
- A. Hoene, U. Walschus, B. Finke, S. Lucke, B. Nebe, K. Schroeder, A. Ohl, M. Schlosser. In vivo investigation of the inflammatory response against allylamine plasma polymer coated titanium implants in a rat animal model. Acta Biomaterialia, 6 (2010) 676-683.
- A. Fritsche, F. Luethen, B. Nebe, J. Rychly, U. Lembke, C. Zietz, M. Mittelmeier, R. Bader. Bone Cell Adhesion: An Important Aspect of Cell Biomechanics in the Development of Surface Modifications for Orthopaedic Implants; In: J.H. Levy (ed.), Biomechanics: Principles, Trends and Applications, Nova Science Publishers, Inc. 2010, 305-314; ISBN: 978-1-60741-394-3
- A. Vogelsang, A. Ohl, H. Steffen, R. Foest, K. Schröder, K.-D. Weltmann. Locally Resolved Analysis of Polymer Surface Functionalization by an Atmospheric Pressure Argon Microplasma Jet with Air Entrainment. Plasma Process. Polym. 7 (2010) 16-24
- A. Fritsche, F. Luethen, U. Lembke, B. Finke, C. Zietz, J. Rychly, W. Mittelmeier, R. Bader. Measuring bone cell adhesion on implant surfaces using a spinning disc device. Mat.-wiss.u. Werkstofftech. 41 (2010) 83-88



- C. Bergemann, E.-D. Klinkenberg, F. Lüthen, A. Weidmann, R. Lange, U. Beck, R. Bader, K. Schröder, J.B. Nebe. Proliferation and migration of human osteoblasts on porous three dimensional scaffolds. Mater Sci. Forum. 638-642 (2010) 506-511
- J.B. Nebe, H. Jesswein (Rebl), A. Weidmann, B. Finke, R. Lange, U. Beck, S. Zehler, K. Schroeder. Osteoblast Sensitivity to topographical and chemical features of titanium. Mat. Sci. Forum, 638-642 (2010) 652 -657.
- K. Schröder, B. Finke, M. Polak, F. Lüthen, J.B. Nebe, J. Rychly, R. Bader, G. Lukowski, U. Walschus, M. Schlosser, A. Ohl, K.-D. Weltmann. Gas-Discharge Plasma-Assisted Functionalization of Titanium Implant Surfaces. Mat. Sci. Forum, 638-642 (2010) 700-705.
- K. Schröder B. Finke, H. Jesswein, F. Lüthen, A. Diener, R. Ihrke, A. Ohl, K.-D. Weltmann, J. Rychly, J.B. Nebe. Similarities of plasma amino functionalized PEEK and titanium surfaces concerning enhanced osteoblast cell adhesion. In: A. Carré, K.L. Mittal (eds.), Surface and Interfacial Aspects of Cell Adhesion, Brill Academic Pub. Leiden 2010, 335-353; ISBN 9004190783, 9789004190788
- U. Walschus, A. Hoene, A.H. Kochanowski, B. Neukirch, M. Patrzyk, L. Wilhelm, K. Schroeder, M. Schlosser. Quantitative immunohistochemical examination of the local cellular reactions following implantation of biomaterials. J. Microscopy 242 (2011) 94-99
- B. Finke, F. Hempel, H. Testrich, A. Artemenko, H. Rebl, O. Kylián, J. Meichsner, H. Biederman, B. Nebe, K.-D. Weltmann, K. Schröder. Plasma processes for cell-adhesive titanium surfaces based on nitrogen-containing coatings. Surf. Coat. Technol. (2011) DOI:10.1016/j.surfcoat.2010.12.044 (early view online)
- R. Wyrwa, B. Finke, H. Rebl, N. Mischner, M. Quaas, J. Schaefer, C. Bergemann, B. Nebe, K. Schroeder, K.-D. Weltmann, M. Schnabelrauch. Design of plasma surface-activated, electrospun polylactide non-wovens with improved cell acceptance. Adv. Eng. Mater. (2011) DOI: 10.1002/adem.201080116 (early view online)