

**Abschlussbericht zum Teilvorhaben
„PlasmaplusCorona-INP“ (PPC-INP)**

im Rahmen des Verbundvorhabens

PlasmaplusCorona - PPC

**Plasmabasierte Desinfektion des Respirationstraktes zur Senkung
der SARS-CoV-2 Viruslast in vitro und in vivo**



Zuwendungsempfänger: Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V.

ZIK *plasmatis*

Felix-Hausdorff-Str. 2

17489 Greifswald

Förderkennzeichen: 03COV06A

Vorhabenbezeichnung: PPC – Plasmaplus Corona

Laufzeit des Vorhabens: 01.04.2021 bis 31.12.2024

Berichtszeitraum: 01.04.2021 bis 31.12.2024

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Inhalt

Teil I: Kurzbericht	3
Teil II: Ausführlicher Bericht	5
II.1 Zusammenfassende inhaltliche Darstellung der wichtigsten im Rahmen des Vorhabens durchgeführten Arbeiten und Ergebnisse	5
II.1.1 Ergebnisse zum miniaturisierten Mikroplasmajet	6
II.1.2 Ergebnisse zur DBE-Plasmaquelle	12
II.1.3 Ergebnisse der Untersuchungen zu Plasma-Aerosol-Wechselwirkungen	37
II.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen	43
II.2 Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	45
II.3 Darstellung der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten	45
II.4 Darstellung des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere die Verwertbarkeit der Ergebnisse – auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft – im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplanes	47
II.5 Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	49
II.6 Erfolgte und geplante Veröffentlichungen	51

Teil I: Kurzbericht

Das Gesamtziel des Vorhabens „PlasmaplusCorona – PPC“ war die technische Konzeption, anwendungsbezogene Optimierung und präklinische Testung eines auf der Wirkung von kaltem Atmosphärendruckplasma basierten Gerätes bzw. Verfahrens, welches perspektivisch zu einem Medizinprodukt zur lokalen Behandlung des Respirationstraktes von mit dem SARS-CoV-2-Virus infizierten Personen weiterentwickelt werden kann, um damit einen Ausbruch der Erkrankung zu verhindern bzw. deren Auswirkungen zu reduzieren und eine Weiterverbreitung des Virus durch die infizierte Person einzudämmen. Das Gesamtprojekt wurde in drei Teilprojekten im Verbund mit dem Leibniz-Institut für Virologie Hamburg (PPC-LIV, FKZ: 03COV06B) und dem Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Lungenzentrum (PPC-FZB, FKZ: 03COV06C) realisiert, wobei das INP die Leitung des Gesamtprojektes und die Koordination des Verbundes innehatte.

Es wurden im Ergebnis des Projektes zwei technische Ansätze realisiert:

- ein Mikroplasmajet für eine direkte lokale Plasmaanwendung auf der Schleimhaut des Mund-Nasen-Rachen-Raumes;
- eine auf einer dielektrisch behinderten Entladung (DBE) basierte Plasmaquelle zur Behandlung von Luft bzw. Aerosol zur anschließenden Applikation im Respirationstrakt.

Die abgestimmte Durchführung des Vorhabens erfolgte in drei den jeweiligen Verbundpartnern zugeordneten Teilvorhaben und umfasste die technische Konzeption und physikalisch-chemische Prüfung und Optimierung von geeigneten Plasmaquellen (Schwerpunkt im Teilvorhaben PPC-INP), deren Testung *in vitro* auf antimikrobielle und antivirale Wirksamkeit sowie biologische Verträglichkeit (Schwerpunkte in den Teilvorhaben PPC-INP und PPC-FZB) bis hin zur *In-vivo*-Testung der antimikrobiellen und antiviralen Wirksamkeit sowie der biologischen Verträglichkeit im Tiermodell (Schwerpunkt im Teilvorhaben PPC-LIV).

Die grundsätzlichen Ergebnisse des Gesamtvorhabens können folgendermaßen zusammengefasst werden.

Technischer Ansatz 1: Mikroplasmajet

- Anpassung und umfassende Charakterisierung *in vitro* eines Neon-getriebenen Mikroplasmajets für die Anwendung in der Mundhöhle (INP, FZB, LIV)
- Nachweis der Verringerung der klinischen Infektionssymptome *in vivo* an mit dem Influenza-A-Virus infizierten syrischen Goldhamstern (LIV)

Damit konnte erstmalig ein *Proof-of-concept* für die Anwendbarkeit einer plasmabasierten antiinfektiven Behandlung des Mund-Rachen-Raumes vorgelegt werden.

Technischer Ansatz 2: DBD-basierte Plasmaquelle für die Behandlung und nachfolgende Applikation von Luft bzw. Aerosol

- Konzeption, Aufbau und erste *In-vitro*-Charakterisierung einer DBD-basierten Plasmaquelle für die Behandlung sowohl von Luft als auch Aerosol (INP)

- Erfolgreiche Adaption des Air-liquid Interface (ALI)-Lungenepithelzellkultursystems zur *In-vitro*-Testung der DBD-basierten Plasmaquelle unter anwendungsnahen Bedingungen (INP, FZB)
- Schaffung der technischen Voraussetzungen für die *In-vivo*-Testung im Tiermodell (INP, LIV)

Damit wurden die Grundlagen für die Weiterentwicklung eines plasmabasierten antiinfektiösen Behandlungskonzeptes des Respirationstraktes nahe am praktischen klinischen Bedarf gelegt.

In der Gesamtvorhabensbeschreibung wurden folgende Zielparameter für die Erreichung der technischen und wissenschaftlichen Arbeitsziele des Gesamtverbundes definiert:

1. Bereitstellung optimierter Plasmaquellenkonzepte für die präklinische *In-vitro*- und *In-vivo*-Testung auf antivirale Wirksamkeit im Respirationstrakt (INP)
2. Erfolgreiche experimentelle Anwendung des auf der Air-Liquid-Interface (ALI)-Kultur menschlicher Atemwegsepithelzellen basierenden Infektionsmodells zur Untersuchung plasmabasierter Behandlungsverfahren *in vitro* (FZB)
3. Evaluierung der antiviralen Wirksamkeit und Verträglichkeit der plasmabasierten Behandlung des Respirationstraktes im infektiösen SARS-CoV-2-Hamstermodell (LIV)
4. Bereitstellung von mindestens einem wirksamen und verträglichen plasmabasierten Verfahren zur antiinfektiösen Behandlung des Respirationstraktes für die Weiterentwicklung zu einem Medizinprodukt (Ergebnis Gesamtverbund)

Im Ergebnis der Projektbearbeitung wurden die Zielparameter 1 und 2 vollständig erfüllt und die Zielparameter 3 und 4 weitestgehend erfüllt.

Das bedeutendste Gesamtergebnis des Projektes ist, dass mit den im Verbund erarbeiteten Ergebnissen erstmalig ein *Proof-of-concept* der Anwendbarkeit plasmabasierter antiinfektiöser Behandlungsverfahren im Respirationstrakt vorgelegt werden konnte. Damit wurden die Grundlagen für die Erschließung eines neuen Anwendungsfeldes der Plasmamedizin gelegt.

Aufgrund der Neuheit des Ansatzes des Projektes wurden in Abweichung von der ursprünglichen Planung im Rahmen der Projektlaufzeit keine Untersuchungen an SARS-CoV-2 durchgeführt. Dies ist vor allem damit zu begründen, dass bei den grundsätzlich für derartige Untersuchungen qualifizierten und ausgerüsteten Projektpartnern FZB und LIV ein hoher organisatorischer und regulatorischer Aufwand erforderlich war, um die zu prüfende Plasmatechnik in das Laborumfeld und die erforderlichen Versuchsabläufe zu integrieren und die notwendigen Genehmigungen zur Durchführung von Tierexperimenten am LIV in Hamburg einzuholen. Daher wurden alle Untersuchungen mit repräsentativen Modellviren durchgeführt, die keine S3-Laborbedingungen erfordern, aber dennoch die angestrebten wissenschaftlichen Aussagen ermöglichen. Insofern kann geschlussfolgert werden, dass auf der Basis der vorgelegten Ergebnisse von einer Wirksamkeit der getesteten Methoden auch gegen SARS-CoV-2 auszugehen ist.

Teil II: Ausführlicher Bericht

II.1 Zusammenfassende inhaltliche Darstellung der wichtigsten im Rahmen des Vorhabens durchgeführten Arbeiten und Ergebnisse

Das Gesamtziel des Vorhabens „PlasmaplusCorona – PPC“ war die technische Konzeption, anwendungsbezogene Optimierung und präklinische Testung eines auf der Wirkung von kaltem Atmosphärendruckplasma basierten Gerätes bzw. Verfahrens, welches perspektivisch zu einem Medizinprodukt zur lokalen Behandlung des Respirationstraktes von mit dem SARS-CoV-2-Virus infizierten Personen weiterentwickelt werden kann, um damit einen Ausbruch der Erkrankung zu verhindern bzw. deren Auswirkungen zu reduzieren und eine Weiterverbreitung des Virus durch die infizierte Person einzudämmen.

Dieses Konzept des Projektes PlasmaplusCorona als innovativer Ansatz einer plasmabasierten Behandlung des Respirationstraktes wurde im Special Issue „Plasma Technologies for Virus Inactivation“ der Zeitschrift „Plasma Processes and Polymers“ (WILEY) als „Scientific Perspective“ publiziert:

Th. von Woedtke, G. Gabriel, U.E. Schaible, S. Bekeschus

Oral SARS-CoV-2 reduction by local treatment: a plasma technology application?

Plasma Process. Polym. 20 (2023) e2200196; DOI:10.1002/ppap.202200196

Im Rahmen des Teilprojektes PPC-INP sollten geeignete Plasmaquellen konzipiert und grundlegend getestet werden, die dann den Projektpartnern FZB und LIV für spezielle Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* zur Verfügung gestellt werden sollten. Im Rahmen des Verbundes war das INP auch für die Anpassung der Plasmaquellen an die experimentellen Erfordernisse der Projektpartner und die weitere technische Betreuung zuständig.

Ursprünglich wurden zur Erreichung des Verbundziels drei Lösungsansätze konzipiert und mit entsprechenden Arbeitspaketen geplant:

- Lösungsansatz A: Direkte Plasmaanwendung im Respirationstrakt
- Lösungsansatz B: Anwendung von Plasma-behandelter Luft im Respirationstrakt
- Lösungsansatz C: Anwendung von Plasma-behandeltem Aerosol im Respirationstrakt

Für Lösungsansatz A wurde ein Mikroplasmajet eingesetzt, der bereits zu Projektbeginn so weit entwickelt war, dass in der Vergangenheit Funktionsmuster davon gefertigt und charakterisiert werden konnten. Dadurch konnte auf Vorarbeiten für Konstruktion, Fertigung und Charakterisierung zurückgegriffen werden. Damit war es möglich, den Verbundpartnern FZB und LIV zu einem möglichst frühen Zeitpunkt eine Plasmaquelle für ihre experimentelle Arbeiten zur Verfügung zu stellen.

Für die Lösungsansätze B und C sollten separate, auf dem technischen Prinzip der dielektrisch behinderten Entladung (DBE) basierende Plasmaquellen konzipiert und gebaut werden, die jeweils zur Behandlung von Luft bzw. von Aerosol geeignet sind. Es hat sich im Verlauf der

Projektbearbeitung ergeben, dass es praktikabler und zielführender war, eine einzige DBE-Plasmaquelle zu entwickeln, mit der sowohl Luft als auch Aerosol behandelt werden kann. Die entsprechenden Arbeitspakete wurden daraufhin zusammengefasst und angepasst und ein zugeordneter Meilenstein verschoben, wodurch aber der Gesamtprojektplan nicht beeinflusst wurde.

II.1.1 Ergebnisse zum miniaturisierten Mikroplasmajet

Die Arbeiten zum Mikroplasmajet im INP wurden im Berichtsjahr 2022 weitestgehend abgeschlossen. Details zu den Arbeitsergebnissen sind in den beiden Zwischenberichten für die Berichtszeiträume 01.04.2021 bis 31.12.2021 sowie 01.01.2022 bis 31.12.2022 ausführlich dargelegt.

Bei dem verwendeten Mikroplasmajet handelt es sich um eine katheterförmige Plasmaquelle mit einem Außendurchmesser von ca. 2 mm, die ursprünglich für eine Anwendung in endoskopischen Geräten konzipiert worden war.¹ Das System ist so konstruiert, dass das für die Plasmaerzeugung erforderliche Arbeitsgas (bevorzugt Neon) von einem Schutzgas (bevorzugt Kohlenstoffdioxid) umhüllt wird, um definierte Umgebungsbedingungen zu erzeugen. Das Jet-Plasma wird in einer dafür geeigneten Baugruppe in einem Strom des Arbeitsgases gezündet. Dabei bildet sich ein leuchtender, aus dem Gerät austretender, ca. 5 mm langer, kalter Plasma-Effluent. Eine entscheidende Voraussetzung insbesondere für biologische Untersuchungen ist die zuverlässige und genaue Positionierung des Mikroplasmajets relativ zur behandelten Probe. Dafür wurde ein spezielles Halterungssystem verwendet (Abbildung 1).

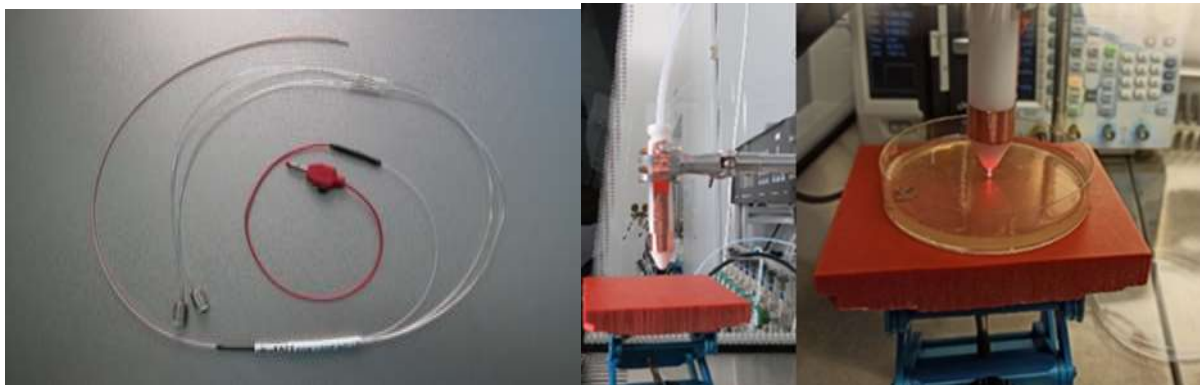


Abbildung 1: Links: Mikroplasmajet ohne Ansteuerung und Gasversorgung; Rechts: Aufbau mit Halterung zur Behandlung biologischer Proben.

Mit diesem Mikroplasmajet können Oberflächen und Gewebe direkt behandelt werden. Dieser miniaturisierte, katheterförmige und flexible Mikroplasmajet wurde ausgewählt, weil damit auch eine direkte lokale Behandlung der Schleimhaut im oberen Respirationstrakt von kleinen Versuchstieren (Hamster) möglich sein sollte.

¹ J. Winter et al., Contrib. Plasma Phys. 58 (2018) 404–414, DOI: 10.1002/ctpp.201700127; J. Winter et al., J. Phys. D: Appl. Phys. 52 (2019) 024005, DOI: 10.1088/1361-6463/aae817

Trotz der vorhandenen Vorarbeiten zu dieser Plasmaquelle waren eine Reihe von weiteren Untersuchungen und Experimenten zur umfassenden physikalischen und biologischen Charakterisierung dieser Plasmaquelle erforderlich, um die Voraussetzungen einer sicheren und effektiven experimentellen Anwendung bei den Projektpartnern zu schaffen.

Die Grundcharakterisierung von Plasmaquellen für biomedizinische Anwendungen im INP orientiert sich an der DIN SPEC 91315.² Diese umfasst physikalische, chemische und biologische Testverfahren, die im INP etabliert waren. Da die Mikroplasmajets in verschiedenen Laboratorien des INP sowie der Projektpartner FZB und LIV eingesetzt werden sollten, war es erforderlich, verschiedene im INP hergestellte Exemplare vergleichend zu prüfen und zu bewerten. Es stand bisher kein Standardverfahren zur Verfügung, welches in jedem Labor angewendet werden kann, um Veränderungen im Plasmabetrieb schnell zu erkennen. Im Rahmen des Projektes wurden daher ausführliche Untersuchungen zur Vergleichbarkeit von Prototypen der Plasmajets durchgeführt. Die multiparametrische Charakterisierung umfasste Messungen von Energie, Leistung, Temperatur, Kriechströmen, Länge des Plasma-Effluenten sowie relative und absolute emittierte Strahlung. Die dissipierte elektrische Leistung und die optische Emission im UV-Bereich wurden als Parameter identifiziert, mit denen definierbare Toleranzen festgelegt und nicht akzeptable Geräte identifiziert werden können. Ein Flüssigphasenmodell wurde verwendet, um die Generierung reaktiver Spezies zu erfassen. Auf der Grundlage dieser Untersuchungen wurde ein Testkonzept zur reproduzierbaren und vergleichbaren Charakterisierung von Jet-Plasmaquellen erarbeitet und publiziert, das für eine Qualitätskontrolle bei der Herstellung von Klein-Geräteserien im Labormaßstab geeignet ist.

H. Jablonowski, U. Hoffmann, R. Bansemer, S. Bekeschus, T. Gerling, T. von Woedtke
Characterization and comparability study of a series of miniaturized neon plasma jets.

J. Phys. D: Appl. Phys. 57 (2024) 195202; DOI:10.1088/1361-6463/ad2566

Die orientierende Testung der antimikrobiellen Wirksamkeit des Mikroplasmajets erfolgte nach DIN SPEC 91315 in feuchtem Milieu/auf feuchter Oberfläche mittels Hemmhofstest. Dafür wurden die Mikroorganismen *Staphylococcus aureus* DSM 799/ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* DSM 18827 (MRSA - Methicillin-resistenter *S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* DSM 20044/ATCC 14990, *Escherichia coli* K-12 DSM 11250/NCTC 10538, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071/ATCC 10145 und *Candida albicans* DSM 1386/ATCC 10321 genutzt. Die einzelnen Testorganismen wurden jeweils auf eine Nährmedium (Agar) enthaltene Petrischale (10^5 Kolonie-bildende Einheiten pro Petrischale) aufgetragen und punktförmig mit der Plasmaquelle behandelt. Die Plasma-Behandlungszeiten betragen 1-5 min (n=6 Versuche pro Behandlungszeit). Die Untersuchungen wurden im nicht-ableitenden Modus bei einem Behandlungsabstand von 8 mm durchgeführt. Nach der Inkubation der Mikroorganismen bei der optimalen Wachstumstemperatur (30°C bzw. 37°C) erfolgte die Bestimmung der Durchmesser der Mikroorganismen-freien Hemmhöfe (Abbildung 2). Als Kontrollen (0 min Behandlungszeit) wurden unbehandelte, d.h. nicht mit Plasma behandelte Petrischalen

² DIN SPEC 91315:2014-06 Allgemeine Anforderungen an medizinische Plasmaquellen, DOI:10.31030/2141389

mitgeführt. Um eine eigene Wirkung des für die Plasmaquelle genutzten Arbeitsgases auszuschließen wurden Gaskontrollen mitgeführt, also Petrischalen, die 5 min nur mit Gas behandelt wurden, ohne das Plasma zu zünden.

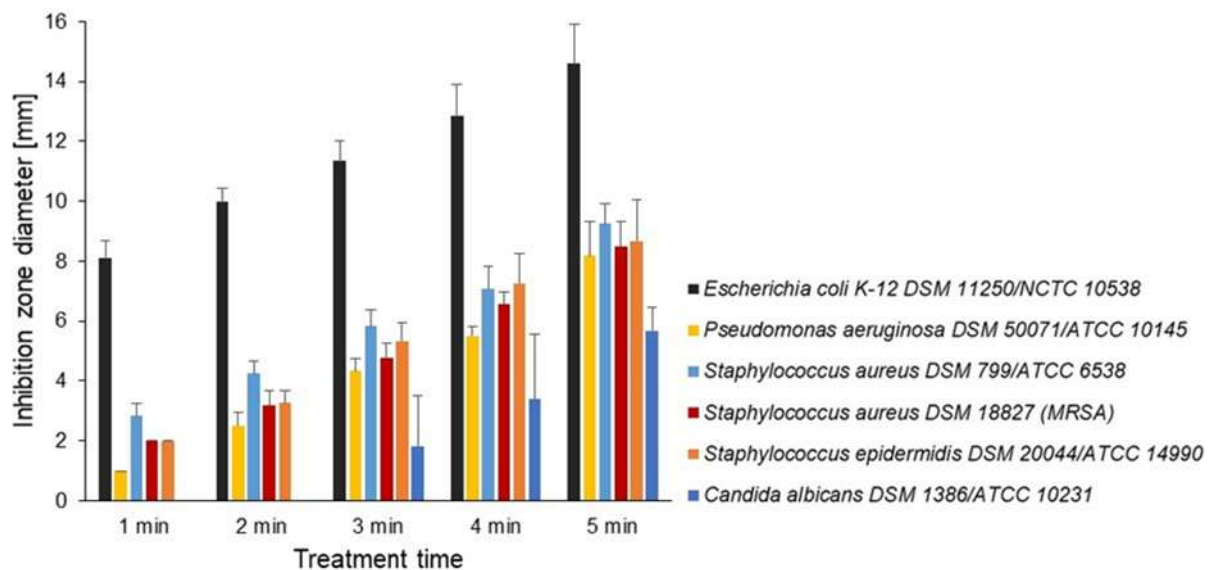


Abbildung 2: Ergebnisse der Hemmhofstests in Abhängigkeit von der Behandlungszeit für die Jet-Plasmaquelle gegenüber den getesteten Mikroorganismen (*Escherichia coli* K-12 DSM 11250/NCTC 10538, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071/ATCC 10145, *Staphylococcus aureus* DSM 799/ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* DSM 18827 (MRSA - Methicillin-resistenter *S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* DSM 20044/ATCC 14990 und *Candida albicans* DSM 1386/ATCC 10321); nicht-ableitender Modus (8 mm), Arbeitsgas: 300 sccm Neon, Schutzgas: 300 sccm CO₂.

Im Rahmen der Untersuchungen wurde für alle getesteten gram-positiven (*S. aureus* incl. MRSA, *S. epidermidis*) und gram-negativen (*E. coli*, *P. aeruginosa*) Bakterien sowie die Hefe *C. albicans* ein antimikrobieller Effekt des Mikroplasmajets nachgewiesen. Das Arbeitsgas allein (ohne Plasma) hatte keinen inaktivierenden Effekt unter den genutzten Testbedingungen.

Zu Projektbeginn nicht zur Verfügung standen jedoch Methoden zu Testung der antiviralen Wirksamkeit von Plasmaquellen. Diese mussten im Rahmen der Projektbearbeitung im INP aufgebaut und etabliert werden.

Zunächst wurde ein Bakteriophagen-Testmodell erarbeitet. Bakteriophagen sind spezielle Viren, die ausschließlich Bakterien infizieren. Sie sind nach den Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) der Risikogruppe 1 zuzuordnen, was ein problemloses Arbeiten im Labor ermöglicht.³ Für die Untersuchungen im Projekt wurde der Phi6-Phage DSM 21518 als Surrogat zu SARS-CoV-2 ausgewählt. Beide Viren sind behüllt und besitzen Ribonukleinsäure (SARS-CoV-2: Einzelstrang-RNS, Phi6-Phage: Doppelstrang-RNS). Der Wirt des Phi6-Phagen (Familie: *Cystoviridae*) ist das Bakterium *Pseudomonas sp.* DSM 21482. Zur Vermehrung der Phagen wurde die Top-Layer-Methode genutzt, bei der das Wirtsbakterium *Pseudomonas sp.* zusammen mit dem Phi6-Phagen in sogenannten

³ https://sicheresarbeitenimlabor.de/dokumente/vorschriften/trba_462.pdf

Weichagar gegeben wird. Dieser Agar enthält nur eine geringe Agarmenge (0,75%). Der Weichagar wurde dann auf Grundagar mit einer höheren Agarmenge (1,5%) aufgebracht. Die so angesetzten Petrischalen wurden über Nacht bei 25°C inkubiert. In dieser Zeit sollten sich die Phagen vermehren und damit einhergehend die Wirtsbakterien lysieren. Anschließend werden die Phagen mit Puffer abgeschwemmt, zentrifugiert und filtriert, um restliche Bakterien abzutrennen.

Die Plasmabehandlung erfolgte unter Verwendung von Phagensuspensionen. Wie auch die Vermehrung der Bakteriophagen beruht die zur Bestimmung der antiviralen Wirksamkeit von Plasmaquellen erforderliche Quantifizierung der Viren auf der Lyse der Wirtsbakterien durch die Phagen. Dies führt zur Bildung sogenannter *plaque-forming units* (pfu/ml). Für die Testungen wurden Phagensuspensionen mit einer Ausgangskonzentration von ca. 10^6 pfu/ml verwendet. Für den Nachweis der antiviralen Effektivität wurde die Plasma-behandelte Phi6-Phagensuspension bzw. entsprechende Verdünnungen jeweils zusammen mit dem Wirtsbakterium *Pseudomonas sp.* in Weichagar gegeben. Damit wird ein Kontakt zwischen Bakterien und Phagen (und somit die Lyse) ermöglicht. Der Weichagar wird dann auf Grundagar ausgebracht, der eine höhere Agarmenge enthält, um das System zu stabilisieren, und Nährmedium, um die Entwicklung der Wirtsbakterien zu fördern. Diese Petrischalen wurden 24 h bei 25 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der pfu/ml (Abbildung 3).

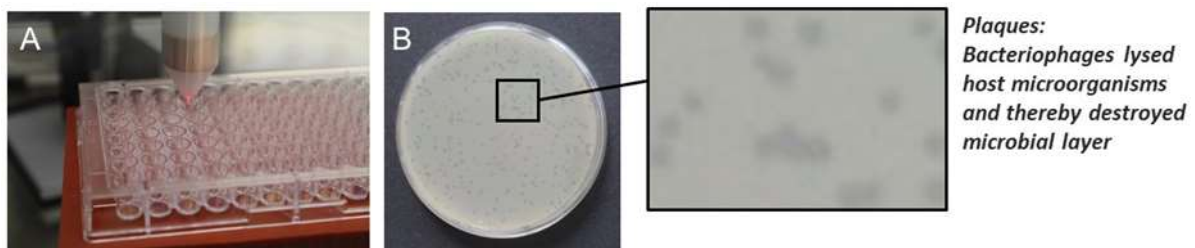


Abbildung 3: A) Versuchsanordnung zur Bestimmung der antiviralen Wirksamkeit mittels Suspensionstest und direkter Plasmabehandlung; B) Petrischale mit *plaque-forming units* an den Stellen, an denen die Bakteriophagen die Wirtsbakterien lysierten

Die Plasma-Behandlungszeiten betragen 1-5 min (n=3 Versuche pro Behandlungszeit). Als Kontrollen (0 min Behandlungszeit) wurden unbehandelte, d.h. nicht mit Plasma behandelte Phagensuspensionen mitgeführt. Um eine Wirkung des für die Plasmaquelle genutzten Arbeitsgases auszuschließen wurden Gaskontrollen mitgeführt, also Phagensuspensionen, die 5 min nur mit Gas behandelt wurden, ohne das Plasma zu zünden. Die Reduktion der Virusanzahl wurde als $\log_{10}(N_R)$ bezeichnet. Dieser Wert ergab sich aus der Berechnung

$$\log_{10}(N_R) = \log_{10}(N_0) - \log_{10}(N_S),$$

wobei N_0 die Anzahl der pfu/ml der unbehandelten Kontrolle war und N_S der Anzahl der pfu/ml nach der Behandlung entspricht.

Die Virusinaktivierung war vom genutzten Behandlungsabstand (nicht-ableitender Modus: 8 mm bzw. ableitender Modus: 3 mm) und auch von der Behandlungszeit abhängig (Abbildung 4).

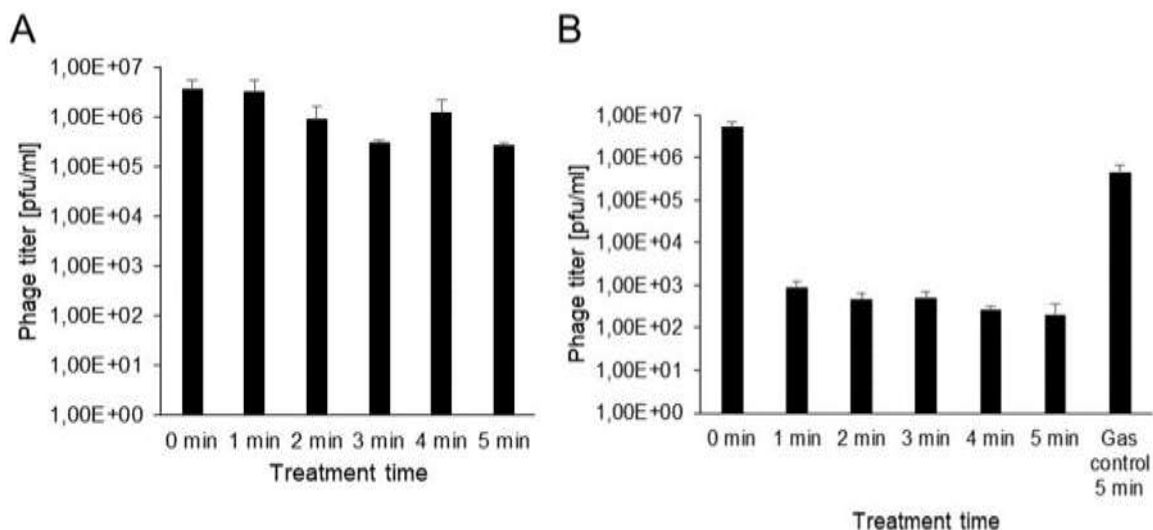


Abbildung 4: Ergebnisse der antiviralen Testung gegenüber dem Phi6-Phagen (Wirtsmikroorganismus: *Pseudomonas sp.*) für die Jet-Plasmaquelle in Abhängigkeit von der Behandlungszeit im A) nicht-ableitenden Modus (Behandlungsabstand: 8 mm) bzw. B) ableitenden Modus (Behandlungsabstand: 3 mm); Arbeitsgas: 300 sccm Neon, Schutzgas: 300 sccm CO₂.

Für den nicht-ableitenden Modus mit einem Behandlungsabstand von 8 mm konnte eine Verringerung des Virustiters der Phi6-Phagen von maximal 1,1 log-Stufen (93%) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde bei einem kürzeren Behandlungsabstand mit 3 mm (ableitender Modus) eine Virusinaktivierung von 3,3 log-Stufen (99,95%) gezeigt. Dabei ist festzustellen, dass für diese Versuche allein bei der Gaskontrolle (5 min nur Gas, kein Plasma) bereits eine Reduktion der Viruskonzentration um 1,1 log-Stufen erfolgte, die bei der Berechnung der Virusinaktivierung mit Plasma berücksichtigt wurde. Damit wurde für die Jet-Plasmaquelle eine antivirale Wirksamkeit vor allem für einen kurzen Behandlungsabstand von 3 mm (ableitender Modus) gegenüber dem Phi6-Phagen bestätigt.

Im Zusammenhang mit dem Aufbau des Bakteriophagen-Testmodells wurde auch eine Optimierung der Methodik der Erfassung der antiviralen Aktivität neu entwickelt und etabliert. In Abwandlung des klassischen Plaque-Assays (siehe oben) wurde ein Microplate-Reader-basierter Assay unter Verwendung von 96-Well-Platten entwickelt, der eine kinetische Erfassung der Infektion der Wirtsbakterien durch die Phagen ermöglicht. Damit liegt ein benutzerfreundliches, kostengünstiges und schnelles Testsystem vor, das nur minimale Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien erfordert und gleichzeitig die Generierung quantitativer Daten zur Prüfung auf antivirale Wirkungen von Atmosphärendruckplasmaquellen ermöglicht. Die Methode wurde unter Verwendung u.a. des Mikroplasmajets erprobt und publiziert:

S. Bekeschus, H. Skowski, V. Hahn, R. Bansemer, T. Gerling, K.-D. Weltmann, T. von Woedtke.

A fast and reliable microplate reader assay to assess the antiviral efficacy of cold plasma devices.

Plasma Process. Polym. 21 (2024) e2400104; DOI:10.1002/ppap.202400104

Weiterhin wurde ein auf Säugetierzellen basierendes *In-vitro*-Infektionsmodell unter Verwendung des murinen Hepatitis-Virus (MHV) aufgebaut. MHV gehört zur Gruppe der Coronaviren, ist nicht humanpathogen, infiziert nur Mauszellen, und ermöglicht daher den Umgang mit diesen Viren in S1- bzw. S2-Laboratorien, die am INP vorhanden sind. MHV ist ein gut untersuchtes Virus und wird als sehr gut geeignetes Modell zur Untersuchung von Virusinfektionen und -replikationen in kultivierten Säugetierzellen sowie zur Untersuchung der Pathogenese und Immunogenität von Coronaviren eingesetzt.

Für die Experimente wurde die murine Fibroblasten-Zelllinie 17Cl-1 verwendet. Als Reporterviren dienten MHV-A59-eGFP (MHV). Die Zelllinie sowie die Viren wurden freundlicherweise von der Gruppe um Prof. Dr. Volker Thiel (Universität Bern, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Zur Quantifizierung des Virustiters in viralen Suspensionen wurde zunächst ebenfalls auf den Goldstandard, einen Plaque-Assay, zurückgegriffen. Dieser konnte erfolgreich etabliert werden und ermöglicht die Generierung reproduzierbarer Ergebnisse.

Die Ergebnisse zur Methodik und zur antiviralen Aktivität des Mikroplasmajets wurden publiziert und werden daher hier nicht ausführlicher dargestellt:

D.M. Mrochen, L. Miebach, H. Skowski, R. Bansemer, C.A. Drechsler, U. Hoffmann, M. Hein, U. Mamat, T. Gerling, U. Schaible, Th. von Woedtke, S. Bekeschus

Toxicity and virucidal activity of a neon-driven micro plasma jet on eukaryotic cells and a coronavirus.

Free Radic. Biol. Med. 191 (2022) 105–118; DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2022.08.026

Es konnte auch mit diesem experimentellen Ansatz gezeigt werden, dass der Mikroplasmajet antivirale Eigenschaften aufweist und die Virusinaktivierung mit zunehmender Behandlungszeit steigt. Bereits nach 1 min Behandlung wurde die Virusmenge um 75 % reduziert, nach 5 min um rund 90 % und nach 10 min konnte mit unserer Methode kein Virus mehr detektiert werden, was einer Reduktion um mindestens den Faktor 3.0 (Reduktion um mind. 99,96 %) entsprach. Eine ableitende Behandlung war dabei effektiver als eine nicht-ableitende Behandlung. Die weniger starke Abnahme der Virusmenge nach Zugabe von Antioxidantien belegte den zumindest partiellen Einfluss von plasmagenerierten reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) auf die Inaktivierung der Viren.

Eine weitere Voraussetzung für die Erreichung der technischen Zielstellungen des Projektes war der Nachweis der biologischen Verträglichkeit der konzipierten plasmabasierten Anwendungen. Im Teilvorhaben PPC-INP werden hierfür grundlegende und orientierende Untersuchungen auf der Basis von *In-vitro*-Testungen unter Verwendung von Zellkulturen und Standardassays durchgeführt.

Für die Beurteilung der Zytotoxizität des Mikroplasmajets wurden 4 unterschiedliche Zelllinien verwendet: HaCaT-, Calu-3-, THP-1- und JE6.1-Zellen. HaCaT-Zellen sind nicht-maligne, spontan immortalisierte Keratinozyten des Menschen, Calu-3 Zellen epitheliale Lungenkarzinomzellen. Beide Zellen wachsen adhärent *in vitro*, d.h. sie bilden einen Zellrasen. THP-1-Zellen sind monozytäre Zellen, JE6.1-Zellen lymphozytär. Im Vergleich zu den zuvor genannten Zellen wachsen die letztgenannten in Suspension, d.h. sie setzen sich nicht am

Boden eines Zellkulturgefäßes fest. Diese Zellen stehen repräsentativ für verschiedene Zellen des menschlichen Körpers und konnten daher die unterschiedliche Wirkung, die der Mikroplasmajet auf solche Zellen hat, abbilden. Die Zellen wurden unterschiedlich lange mit dem Mikroplasmajet behandelt und anschließend für 18 h in Kultur gehalten. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde die Zellviabilität durchflusszytometrisch bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit Annexin V und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) markiert. Lebendige Zellen binden weder Annexin V noch DAPI, während tote Zellen entweder Annexin V-positiv/ DAPI-negativ (früh apoptotische Zellen) oder Annexin V-positiv/ DAPI-positiv (spät-apoptotische/nekrotische Zellen) sind. Die Ergebnisse dieser Zytotoxizitätstests sind ebenfalls in der oben genannten Arbeit *Mrochen et al. 2022* publiziert worden und werden daher hier nicht im Detail dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität der Zellen hinsichtlich der Behandlung mit dem Mikroplasmajet sehr unterschiedlich ausfiel. Während JE6.1-Zellen bereits nach wenigen Sekunden Behandlungszeit und anschließender Inkubation nahezu vollständig starben, konnten Calu-3-Zellen eine Minute behandelt werden und wiesen noch eine Viabilität von rund 30 % auf. Insgesamt können die Zellen bezüglich ihrer Sensitivität wie folgt geordnet werden (von am sensitivsten zu am robustesten): JE6.1 > HaCaT > THP-1 > Calu-3. Der Erhalt der Zellviabilität durch Zugabe von Antioxidantien belegte erneut den Status von plasmagenerierten RONS als wichtige Effektoren der Plasmabehandlung. Ebenfalls konnte mit diesen Untersuchungen gezeigt werden, dass mit einer ableitenden Behandlung eine stärkere biologische Wirksamkeit erzielt wird, da Zellen bei gleichen Behandlungszeiten unter ableitenden Bedingungen verstärkt starben. Schließlich konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von Säugetierzellen nach Behandlung mit dem Mikroplasmajet durch regulierten Zelltod (Apoptose) erfolgt.

Im Ergebnis dieser Arbeiten wurde der Mikroplasmajet als geeignet für weitere Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* bei den Verbundpartnern eingeschätzt. Im INP gefertigte und geprüfte Exemplare dieser Plasmaquelle wurden an die Verbundpartner FZB und LIV weitergegeben und durch Projektmitarbeiter des INP dort installiert und an die erforderlichen experimentellen Gegebenheiten und Anforderungen angepasst. Dazu gehörte auch die Entwicklung und Anfertigung von für die jeweils spezifischen experimentellen Erfordernisse angepassten Halterungssystemen für die Plasmaquelle sowie diverse Zusatzen zur Einholung verschiedener laborsicherheitstechnischer Genehmigungen im FZB und im LIV sowie zur Erstellung der Tierversuchsanträge durch das LIV. Nachdem die Labore auch der Projektpartner mit dem Mikroplasmajet ausgerüstet und das Personal eingearbeitet worden war galt es, über die gesamte Projektlaufzeit die Versuche weiter zu betreuen, um auftretende Abweichungen im Betrieb der Plasmajets festzustellen und gegebenenfalls zu untersuchen und abzustellen.

II.1.2 Ergebnisse zur DBE-Plasmaquelle

Laut Projektplan sollten zwei auf dem technischen Prinzip der dielektrisch behinderten Entladung (DBE) basierende Plasmaquellen konzipiert und gebaut werden, die jeweils zur Behandlung von Luft bzw. von Aerosol geeignet sind. Da bei der Konzeption, Konstruktion, Optimierung und Charakterisierung einer für die Erreichung der Projektziele geeigneten DBE-Plasmaquellen nicht – wie im Falle des Mikroplasmajets – auf eine bereits weitestgehend

vorhandene technische Lösung zurückgegriffen werden konnte, wurden diese Arbeitspakete über fast den gesamten Zeitraum der Projektlaufzeit durchgeführt. Details zu einzelnen Arbeitsschritten und Zwischenergebnissen sind in den drei Zwischenberichten für die Berichtszeiträume 01.04.2021 bis 31.12.2021, 01.01.2022 bis 31.12.2022 sowie 01.01.2023 bis 31.12.2023 ausführlich dargelegt.

Für die Entwicklung einer DBE wurden mehrere Konfigurationen auf ihre Eignung hin untersucht. Mit den umfassenden Erfahrungen des INP in diesem Bereich und den in der wissenschaftlichen Literatur verfügbaren Informationen konnte als Grundkonzept eine koaxiale Entladungskonfiguration sowohl aus plasmaphysikalischer als auch aus plasmachemischer und strömungstechnischer Sicht als am besten geeignet identifiziert werden (Abbildung 5).

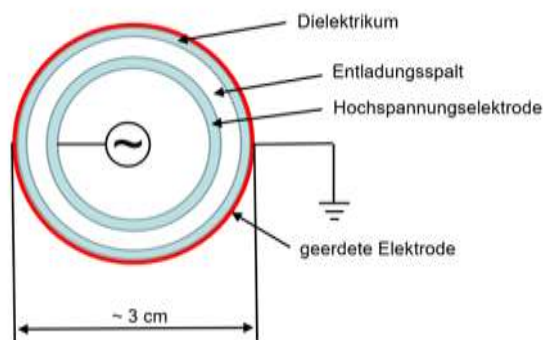


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer koaxialen Entladungseinrichtung

Eine koaxiale Entladungsgeometrie besteht aus zwei ineinander geführten Röhren, von denen das äußere aus einem Isolator (Dielektrikum) und das innere aus einem elektrischen Leiter (Hochspannungselektrode) besteht. Um das Dielektrikum wird ein weiterer elektrischer Leiter installiert, der die geerdete Elektrode bildet. Im Entladungsspalt bildet sich bei angelegter Hochspannung mit ausreichend hoher Amplitude eine Entladung (das Plasma) aus. Aufgrund der geometrischen Ausführung werden Verwirbelungen besonders bei niedrigeren Strömungsgeschwindigkeiten minimiert.

Zur Überführung des technischen Konzeptes in eine experimentell anwendbare Plasmaquelle wurden verschiedene Konstruktionen erstellt. Hierbei wurden hauptsächlich materialwissenschaftliche und strömungstechnische Erkenntnisse eingesetzt. Für die Auswahl der Materialien waren neben ihren elektrischen die chemischen Eigenschaften von Bedeutung. Emissionen unerwünschter oder gar schädlicher Komponenten durch Erosion während des Betriebs sind unbedingt zu vermeiden, weswegen beispielsweise Materialien wie Polyvinylchlorid ungeeignet sind. Um Synergien zwischen den Entwicklungsprozessen der unterschiedlichen, im Projekt bereitzustellenden Plasmaquellen optimal zu nutzen, wurde – in Abwandlung des ursprünglichen Projektplans – sehr früh im Verlauf der Projektbearbeitung angestrebt, die DBE für eine Behandlung von Luft so auszuführen, dass sie nach Möglichkeit auch mit einem Aerosol betrieben werden kann. Die Verwendung desselben Systems für den Betrieb mit Luft und mit einem Aerosol stellt sicher, dass die Untersuchungsergebnisse für

beide Betriebsarten direkt miteinander vergleichbar sind. Folglich war darauf zu achten, dass die verwendeten Werkstoffe resistent gegenüber Feuchtigkeitseinwirkung sind.

Der Bereich des aktiven Plasmas sollte klein gehalten werden, um den Leistungseintrag und somit die Ozonproduktion zu minimieren.

Zur Erzeugung eines Plasmas in einer dielektrisch behinderten Entladungseinrichtung wird eine alternierende Hochspannung an die Hochspannungselektrode angelegt, während die Gegenelektrode geerdet ist. Zur Bewertung der elektrischen Betriebsparameter werden die Form der Hochspannung, die Amplitude und die Frequenz herangezogen. Für weitere Betrachtungen können der durch die Entladungseinrichtung fließende Strom oder die transferierte Ladung gemessen werden. Aus diesen Daten lässt sich die in das Plasma dissipierte Energie und somit die umgesetzte Leistung ermitteln. Die im Projekt entwickelte DBE-Plasmaquelle wird mit einer sinusförmigen Hochspannung einer Frequenz von einigen 100 Hz und Spannungsamplituden von einigen kV betrieben.

Für die im Projekt geplante Anwendung eines wässrigen Aerosols, das nach Plasmabehandlung im Respirationstrakt zur Anwendung kommen kann, indem es z.B. dem (Ein-)Atemluftstrom zugeführt wird, sollte möglichst die gleiche, DBD-basierte Plasmaquelle verwendet werden, die für die Behandlung von Luft konzipiert wurde. Die Applikation eines plasmabehandelten Aerosols kann grundsätzlich auf zweierlei Art erfolgen. Einerseits ist es möglich, eine zuvor mit Plasma behandelte Flüssigkeit in ein Aerosol zu überführen und andererseits kann ein Aerosol mit einem Plasma behandelt werden. Beide Möglichkeiten wurden eingehend untersucht. Durchgeführte Vorversuche haben gezeigt, dass ein aus einer plasmabehandelten Flüssigkeit gewonnenes Aerosol möglicherweise nicht die gewünschte antimikrobielle Wirksamkeit zeigt. Deshalb wurde im vorliegenden Projekt die Plasmabehandlung eines Aerosols favorisiert. Im INP bereits vorhandene, infrage kommende Plasmaquellen wurden auf ihre Eignung hin überprüft, was zum Ergebnis führte, dass keine ausreichend passenden Geräte vorhanden waren. Um zu prüfen, ob die im Projekt für die Behandlung von Luft konzipierte Plasmaquelle auch für eine Aerosolbehandlung anwendbar ist, wurden Durchströmungstests mit der Luftplasma-DBE und einem kommerziellen Aerosolgenerator (Dräger tropic plus) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass das Aerosol die Entladungseinrichtung unbeeinträchtigt passiert. Ebenfalls konnte ein Plasma gezündet und über eine längere Zeit betrieben werden. Diese Ergebnisse waren vielversprechend, allerdings ist die Partikelgröße bei kommerziell im medizinischen Bereich angewendeten Aerosolgeneratoren mit ca. 5 µm für die hier geplante Anwendung mit dem Ziel einer Deposition von Aerosoltröpfchen vor allem im oberen Respirationstrakt zu klein. Um zu verhindern oder zumindest einzuschränken, dass größere Mengen plasmabehandelten Aerosols in die tieferen Atemwege oder gar in die Lunge eindringen, sind Partikelgrößen von etwa 20 µm anzustreben.⁴ Daher war es notwendig, die Aerosolisierung mittels eines Düsenaufbaus zu realisieren und die Tröpfchengrößenverteilung des Aerosols nach der Plasmabehandlung zu bestimmen, um die Beschränkung der Wirksamkeit auf den Mund-Rachenraum zu erreichen und mögliche Beeinflussungen der Atemwege zu verhindern.

⁴ <https://www.pta-forum.de/ausgabe-012010/nebel-aerosol-oder-wasserdampf/>

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die konzipierte Luftplasma-DBE prinzipiell für den Betrieb mit einem Aerosol geeignet ist, wurde in einer weiteren Ausbaustufe diese Entladungseinrichtung mit einem Aerosolgenerator verbunden, der geeignet ist, die gewünschten Partikelgrößen zu erzeugen. Hierzu wurden wieder strömungsmechanische Betrachtungen diskutiert, da erreicht werden sollte, dass innerhalb der Entladungseinrichtung keine Bereiche entstehen, in denen das Aerosol kondensiert. Dies könnte die Zündung der Entladung im Spalt unterdrücken, was zu verhindern war.

Als Aerosolquelle wurde eine Zerstäuberdüse (TQ-50-A1, *Elemental Scientific Glassblowing Meinhard*) genutzt, die Tröpfchen mit einem Durchmesser um 20 µm erzeugt. Es stellte sich bei den Experimenten heraus, dass das Aerosol, das im Vergleich zum vorher genutzten Aerosol aus dem kommerziellen Aerosolgenerator (tropic plus, *Dräger*) um zwei Größenordnungen größere Tröpfchen enthielt, vollständig in der Plasmaquelle kondensierte. Dieser Effekt trat sowohl innerhalb als auch außerhalb des Plasmabetriebs auf, weshalb die Geometrie der Plasmaquelle optimiert werden musste. In einer weiteren Version der Plasmaquelle wurden ein Mantelgasstrom und eine Expansionskammer eingefügt. Das resultierende konstruktive Grundkonzept ist in Abbildung 6 gezeigt.

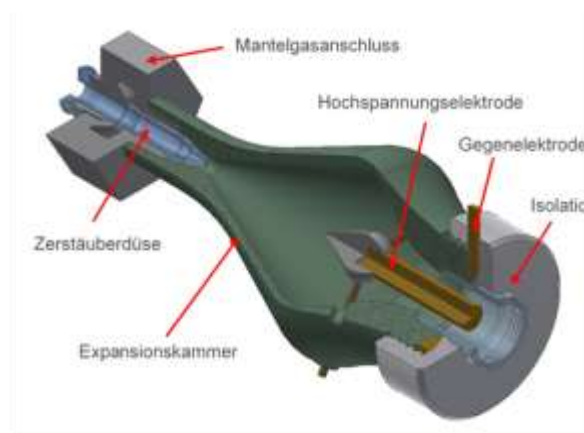


Abbildung 6: Konstruktionszeichnung der Plasmaquelle zur Behandlung von Aerosol mit einer Luftplasma-DBD

Es wurde ein Anschluss zum Verwenden eines Mantelgasstroms in der Aufnahme der Zerstäuberdüse ergänzt, wobei der Mantelgasstrom den Sprühkegel der Düse coaxial umschließt. Die Expansionskammer wurde so konzipiert, dass sich der Sprühkegel der Zerstäuberdüse ungehindert ausbreiten kann, bis sich die Strömungsgeschwindigkeit des Aerosols soweit verringert hat, um von einem Mantelgasstrom geleitet und zum Entladungsspalt geführt zu werden. Die innere Elektrode besteht aus einem glatten Stahlstab und die Gegenelektrode aus einem Ring mit innenliegender Kante, um möglichst wenig Strömungswiderstände im Aerosolstrom zu erzeugen und der Kondensation vorzubeugen. Der Entladungsspalt wurde ebenfalls angepasst. Diese Plasmaquelle kann sowohl für die Behandlung von trockener und angefeuchteter Luft (0%-100% relative Gasfeuchte) als auch zur Aerosolbehandlung genutzt werden (Abbildung 7).

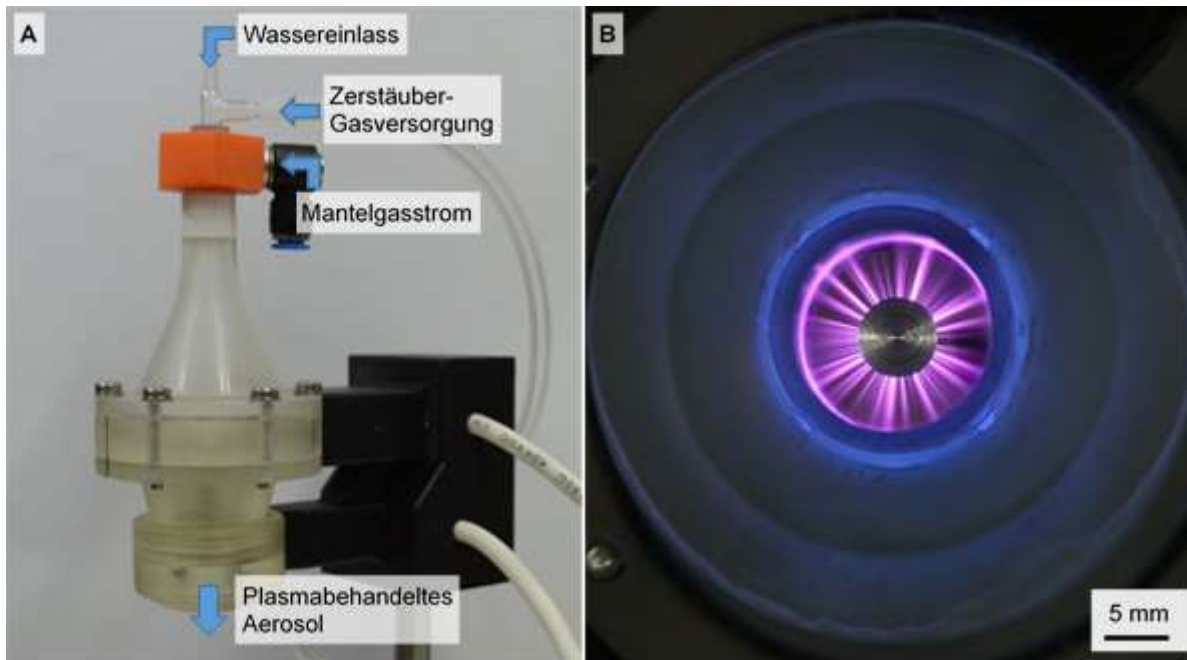


Abbildung 7: Fotografie der konstruktiven Umsetzung der DBE-Plasmaquelle (A) und der Entladung bei Betrieb der Plasmaquelle mit synthetischer Luft (B).

Um die einzelnen Exemplare der Quelle zu charakterisieren und gut untereinander vergleichen zu können, wurde im ersten Schritt nur der Betrieb mit trockener Luft betrachtet. In diesem Betriebsmodus sind die äußeren Einflussfaktoren am geringsten und ein direkter Vergleich der Ergebnisse am einfachsten. Schon kleine Abweichungen in der Luft-/Gas-Feuchte haben potentiell einen großen Einfluss auf die Speziesproduktion, sodass eine unkontrollierte Gasfeuchte zu einer großen Unsicherheit in der direkten Vergleichbarkeit führen würde. Im Betrieb mit Aerosol sind noch einmal mehr äußere Einflussfaktoren zu berücksichtigen.

Zur physikalischen Charakterisierung der DBE-Plasmaquelle wurden hauptsächlich elektrische Messungen durchgeführt. Daraus lassen sich Größen wie Entladungsstrom, Entladungsspannung, Dissipationsenergie und Häufigkeit der Entladungen bestimmen. In Abbildung 8 ist der Strom- und Spannungs-Verlauf eines Hochspannungspulses dargestellt, aus dem sich Durchbruchspannung, Entladestrom, Entladungshäufigkeit und Energie der Entladungen ermitteln lassen.

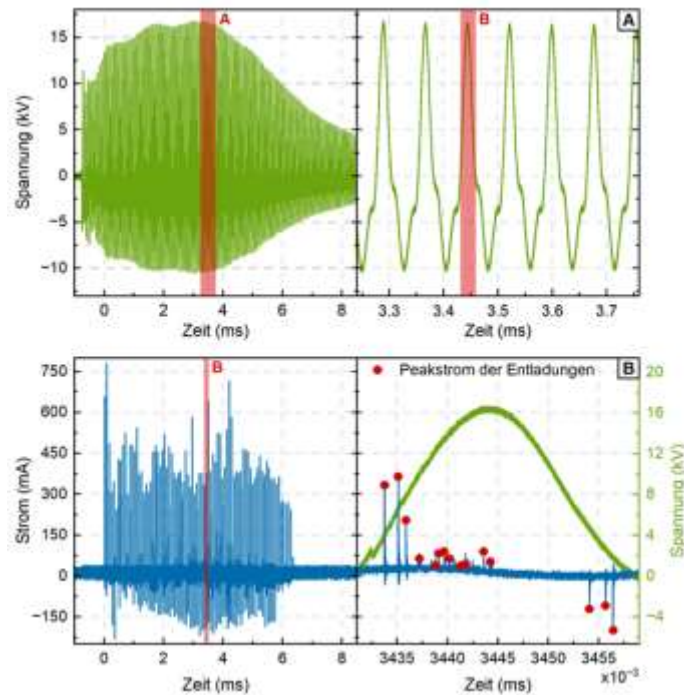


Abbildung 8: Strom- Spannungsverlauf der DBE-Quelle in trockener Umgebung

In Abbildung 9 ist die Häufigkeitsverteilung der Dissipationsenergie und des Entladungsstroms bei zwei unterschiedlichen Primär-Spannungen (175 und 130 V) dargestellt. Interessant ist, dass der Verlauf der Anzahl der Entladungen über die Dissipationsenergie deutlich zwei Maxima ausbildet. Diese sind im Entladungsstrom so nicht erkennbar. Anhand dieser charakteristischen Merkmale stellt sich die Dissipationsenergie als guter Vergleichswert für weitere Untersuchungen dar.

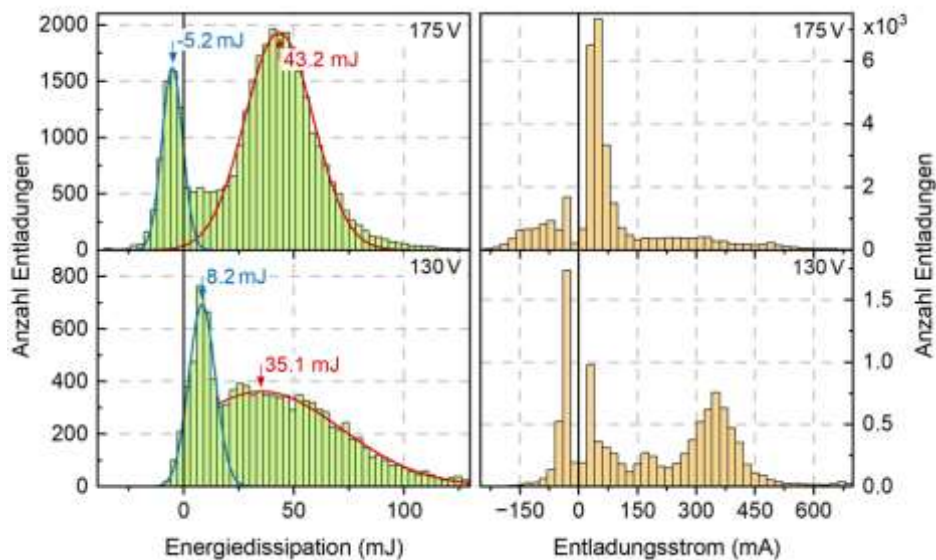


Abbildung 9: Histogramm der Dissipationsenergie und des Entladestroms bei zwei unterschiedlichen Spannungen der gleichen DBE-Plasmaquelle

Die Zusammensetzung des Prozessgases wurde mittels FTIR (Fourier Transform Infrared)-Spektroskopie untersucht. Ein beispielhaftes Spektrum ist in Abbildung 10 dargestellt. Als enthaltene Spezies wurden Ozon (O_3), Distickstoffmonoxid (N_2O), Distickstoffpentoxid (N_2O_5) und Salpetersäure (HNO_3) identifiziert. Stickoxide wie NO oder NO_2 wurden nicht detektiert.

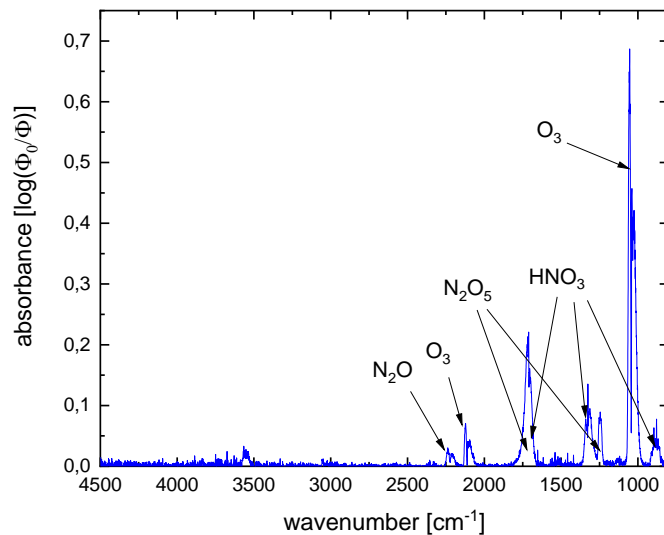


Abbildung 10: Beispielhaftes FTIR-Spektrum des Prozessgases bei 175 V Betriebsspannung

Für eine quantitative Auswertung der FTIR-Daten erfolgte eine Berechnung von Spezieskonzentrationen unter Verwendung von Referenzspektren, die entweder aus öffentlichen Datenbanken stammten oder selbst mit zertifizierten Kalibriergasen aufgenommen wurden. Die Überprüfung der Ozonkonzentrationen erfolgte außerdem mit einem kalibrierten Ozomat (Absorption bei 254 nm).

Bei 175 V Betriebsspannung wurden stabile Ozonkonzentrationen zwischen 300 und 400 ppm gemessen (Abbildung 11).

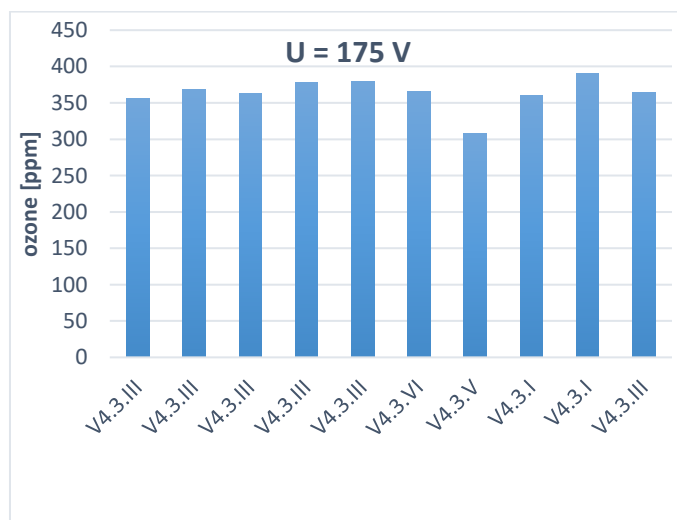


Abbildung 11: Ozonkonzentrationen bei 175 V Betriebsspannung in trockener Luft für unterschiedliche Exemplare der DBE-Plasmaquelle in der Version 4.3

Bei 120 V Betriebsspannung waren die Ozonkonzentrationen deutlich niedriger und schwankten sehr stark (Abbildung 12). Offensichtlich ist 120 V die niedrigste Spannung, bei der die Entladung von Coronaentladungen um die innere Elektrode herum in Filamente übergeht, die den Entladungsspalt ausfüllen.

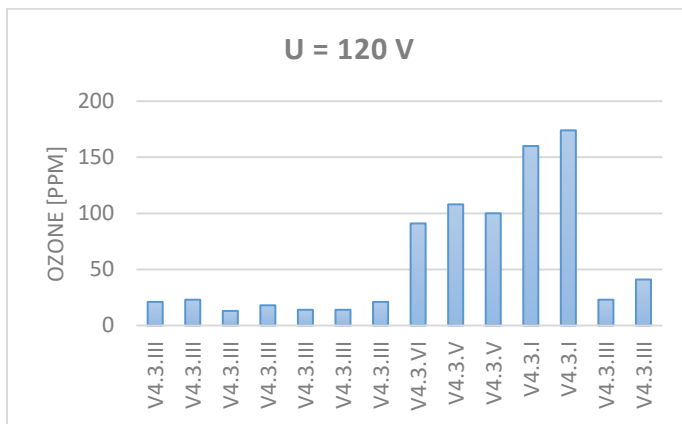


Abbildung 12: Ozonkonzentrationen bei 120 V Betriebsspannung in trockener Luft für unterschiedliche Exemplare der DBE-Plasmaquelle in der Version 4.3

Weiterhin wurde gezeigt, dass die Ozonkonzentration mit steigender relativer Gasfeuchtigkeit sank. Mit steigender elektrischer Leistung und größerer Energiedissipation im Plasma erhöhte sich die Ozonkonzentration (Abbildung 13).

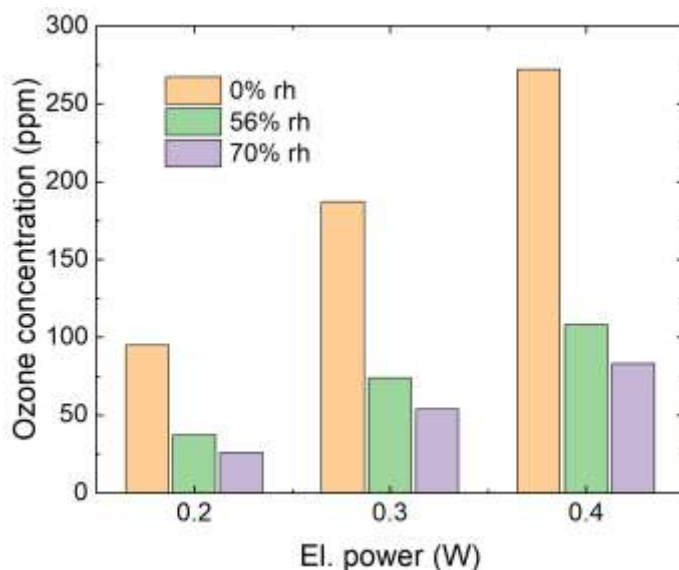


Abbildung 13: Ozonkonzentration im ausströmenden Gasfluss der DBE-Plasmaquelle für verschiedene Leistungen und angefeuchtete Luft mit verschiedenen relativen Gasfeuchtigkeiten.

Die Bildung reaktiver Stickstoffspezies (N_2O , N_2O_5 , HNO_3) war bei einer Eingangsspannung von 120 V vernachlässigbar. Bei 175 V konnten stabile niedrige Konzentrationen von N_2O (< 5 ppm) sowie variable Konzentrationen von N_2O_5 und HNO_3 (20-50 ppm) gemessen werden (Abbildung 14).

Zusätzlich zur Analyse der unterschiedlichen Exemplare der DBE-Plasmaquelle wurden die unterschiedlichen Exemplare der Spannungsversorgungen PS1 bis PS5 untersucht, um eventuelle Abweichungen der Speziesproduktion bei gleichen Betriebsparametern auf Grund von beispielsweise Bauteiltoleranzen zu erfassen. Für die dominanteste produzierte

Komponente Ozon konnten für die Betriebsspannung von 175 V nur vernachlässigbare Abweichungen ermittelt werden, womit die Kombinierbarkeit der verschiedenen Plasmaquellen mit den unterschiedlichen Spannungsversorgungen gegeben ist.

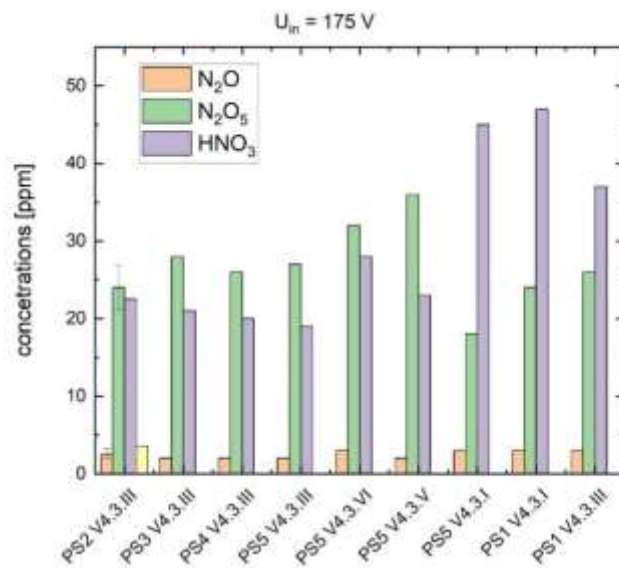


Abbildung 14: Konzentrationen reaktiver Stickstoffspezies bei 175 V Betriebsspannung für verschiedene Kombinationen von DBE-Plasmaquellen (Version 4.3 Exemplare I, III, IV und IV) und Spannungsversorgungen (PS 1 - PS 5)

Somit konnte gezeigt werden, dass die DBE-Plasmaquelle über einen breiten Parameterbereich Chemie in der Gasphase induzieren kann und somit eine Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) möglich ist, welche für die biologischen Plasmaeffekte hauptverantwortlich sind.

Eine grundlegende Größe zur Bewertung der DBE-Plasmaquelle im Betrieb mit Aerosol ist die Größenverteilung der Aerosoltröpfchen. Zunächst wurde die Verteilung mit diversen, kommerziell erhältlichen Messgeräten untersucht, welche jedoch in ihrem Messbereich auf Tröpfchengrößen von weniger als 10 µm ausgerichtet sind. Daher war es notwendig, im Rahmen des Projektes ein eigenes System zur Tröpfchengrößenbestimmung aufzubauen. Dies konnte mit einem optischen System hinreichend genau realisiert werden (Abbildung 15).

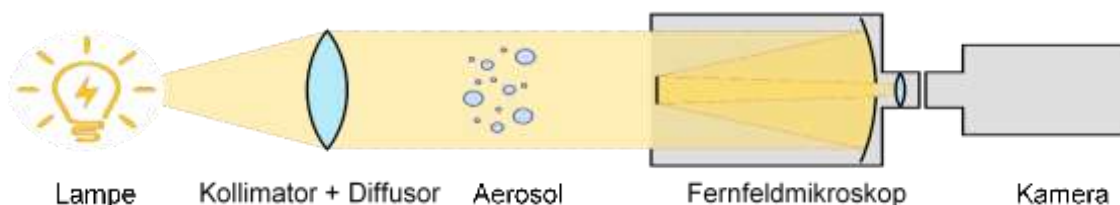


Abbildung 15: Schematische Darstellung einer optischen Methode zur Detektion der Tröpfchengrößenverteilung

Mit einer Lichtquelle und einem Linsensystem (Lampe und Kollimator + Diffusor) wird ein Strahl aus parallelem Licht erzeugt und durch das zu charakterisierende Aerosol geleitet. Die Aerosolpartikel werfen Schatten, die mit einem Fernfeldmikroskop auf den Sensor einer

Kamera abgebildet werden. Mit Hilfe einer Bilderkennungs- und Auswertesoftware werden dann die Durchmesser der abgebildeten Partikel ermittelt und dargestellt.

Mit diesem Partikelgrößensystem wurde untersucht, ob sich die Partikelgrößenverteilung des Aerosols bei Durchströmen der Plasmaquelle und bei Beaufschlagung des Aerosols mit einem Plasma verändert und wie diese möglichen Änderungen ausfallen.

Die Ergebnisse einer Messserie des Aerosols am Austritt der Plasmaquelle ist in Abbildung 16 gezeigt. Das Maximum der Häufigkeitsverteilung liegt bei einem Tröpfchendurchmesser von 20 μm , womit die Zielsetzung, dass die Plasmaquelle für Partikel mit diesem Durchmesser durchlässig ist, erfüllt ist.

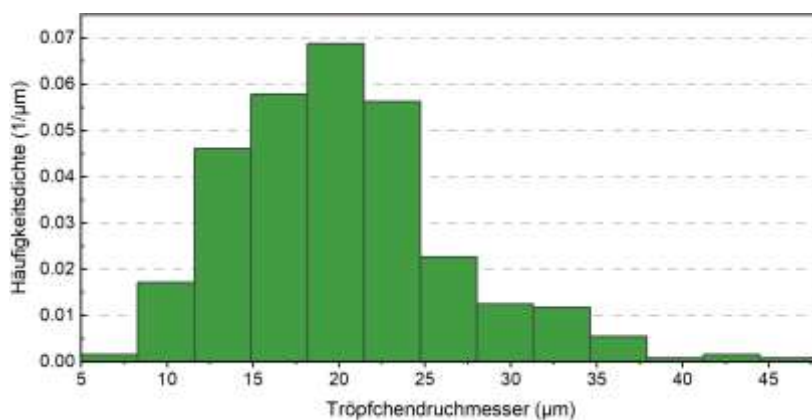


Abbildung 16: Häufigkeitsverteilung der Aerosoltröpfchendurchmesser am Ausgang der DBE-Plasmaquelle

Im weiteren Verlauf der Arbeiten wurde die Verteilung des Aerosols in der Plasmaquelle, am Ausgang der Plasmaquelle und auf der Oberfläche einer zu behandelnden Probe untersucht. Nachdem das Aerosol die Expansionskammer und den Entladungsspalt passiert hat, sollten die Tröpfchen möglichst gleichmäßig über den gesamten Querschnitt des Ausgangs der Plasmaquelle verteilt sein, damit eine flächige Behandlung einer Oberfläche unter dem Ausgang möglich ist.

Nachdem die kontinuierliche Strömung der Aerosoltröpfchen zu einer Oberfläche unter der Plasmaquelle gewährleistet war, wurde die Verteilung der Tröpfchen auf einer Oberfläche untersucht. Sobald das Aerosol auf eine Oberfläche trifft, kondensieren die Tröpfchen an ihr. Bei geringen Flüssigkeitsmengen im Gas verdampfen die Tropfen aufgrund ihres geringen Volumens schneller als neue Tröpfchen kondensieren. Bei hohen Flüssigkeitsmengen bildet sich ein geschlossener Flüssigkeitsfilm auf der Oberfläche. Wird eine Flüssigkeitsmenge zwischen beiden Extrema gewählt, bildet sich ein Gleichgewicht aus Kondensation und Verdampfen, wodurch die Aerosolverteilung auf der Oberfläche beobachtet werden kann. Dieses Gleichgewicht liegt zwischen 100-200 $\mu\text{l}/\text{min}$ Wasserfluss am Eingang der Zerstäuberdüse. Bei diesen Wasserflüssen entsteht ein Ring aus Kondensat, dessen Außendurchmesser dem Durchmesser der Öffnung an der Plasmaquelle entspricht und dessen Innendurchmesser dem Durchmesser der Innenelektrode entspricht. Somit wurde ein Parametersatz zur Behandlung von Oberflächen für weiterführende biologische Untersuchungen gefunden.

Vor der Planung und Durchführung von Versuchen mit dem DBE-Aerosol-Plasma war eine erweiterte Risikobetrachtung im Hinblick auf den Betrieb der Plasmaquelle durchzuführen. Die Aerosol-Tröpfchen können sich an Oberflächen anlagern und dort Flüssigkeitsfilme bilden. Von den Flüssigkeitsfilmen können sich – besonders an Kanten – Tropfen ablösen, die zu einer ungleichmäßigen Benetzung der behandelten Oberflächen führen. Darüber hinaus können Flüssigkeitsfilme aber auch Auswirkungen auf Zuverlässigkeit und Sicherheit des Plasmageräts haben. Unter Einwirkung von Feuchtigkeit verringert sich die Kriechstromfestigkeit isolierender Bauteile. Bildet die auftretende Flüssigkeit einen geschlossenen Film, kann sie, sofern ihr elektrischer Leitwert nicht vernachlässigbar klein ist, sogar Kriechstrecken kurzschließen. Dadurch können Entladungsstrecken überbrückt werden, was Funktionsstörungen verursachen und damit den Ablauf von Experimenten stören kann. Werden Kriechstrecken an Oberflächen kurzgeschlossen, mit denen der Benutzer in Berührung kommt, kann sogar ein elektrischer Schlag nicht ausgeschlossen werden.

Aus diesem Grund wurde die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen dem Aerosol, das durch das Gerät geleitet wird, und den isolierenden und leitenden Oberflächen im Gerät mit Blick auf Sicherheit und Zuverlässigkeit in den Entwicklungsprozess integriert. Alle Kriechstrecken im Gerät wurden so ausgelegt, dass sie im trockenen Betrieb unter nicht-kondensierenden Bedingungen großzügig überdimensioniert sind, wobei an unterschiedlichen Oberflächen unterschiedlich große Sicherheitsfaktoren genutzt wurden. Außerdem wurde das Gerät geometrisch so konstruiert, dass die Strömung möglichst wenig durch Materialoberflächen behindert wird und so möglichst wenige Aerosoltropfen auf die Oberflächen treffen.

Entwicklungsbegleitende Versuche zeigten, dass die Bildung von Flüssigkeitsfilmen mit Aerosol dennoch nicht so weit verhindert werden konnte, dass ein zuverlässiger und sicherer Dauerbetrieb unter allen möglicherweise vorgesehenen und auftretenden Betriebsbedingungen sichergestellt werden konnte. Nur mit nicht elektrisch leitenden Flüssigkeiten konnte das gewünschte Systemverhalten auch unter ungünstigen Bedingungen im Dauerbetrieb zuverlässig gesichert werden. Daher wurden die Gefährdungsbeurteilungen und die Anleitung für das System um Angaben zu zulässigen Flüssigkeiten ergänzt. Konkret wurde der zulässige Leitwert auf $5 \mu\text{S}/\text{cm}$ begrenzt. Damit können destilliertes Wasser oder Reinstwasser verwendet werden. Für die Auslieferung der Geräte an die Forschungspartner wurde der Anschluss zum Flüssigkeits-Dosiermechanismus mit einer gut sichtbaren, leicht verständlichen Warnung in zwei Sprachen gekennzeichnet.

Dies widersprach zunächst den Anforderungen des Verbundpartners FZB. Für die Untersuchung an biologischen Kulturen und Zellen galt es darauf zu achten, dass die Flüssigkeit nicht toxisch wirkt oder andere Eigenschaften aufweist, die das Zellwachstum beeinflussen. Daher wurde zunächst die Anforderung definiert, dass mit verschiedenen Salzen enthaltenden Pufferlösungen (bevorzugt PBS) gearbeitet werden muss. Dahinter stand die Befürchtung, dass andere Flüssigkeiten bei den Zellen einen osmotischen Schock induzieren könnten und eine Bewertung der mit Plasma behandelten Flüssigkeit bzw. des Aerosols dadurch eventuell nicht möglich sein könnte. Salzhaltige Lösungen können zwar mit der DBE-Anordnung ohne Bedenken zerstäubt werden, ohne dass es zu einer Kristallbildung kommt. Sie entsprechen jedoch aufgrund ihrer Leitfähigkeit nicht den dargestellten sicherheitstechnischen Erwägungen. Nach gemeinsamer Auswertung der dargelegten Betrachtungen konnten die Bedenken des FZB letztlich ausgeräumt werden. Da die Flüssigkeitsmengen, die auf die Probe treffen, nur sehr gering sind und sich erst über einen

größeren Zeitraum im Minuten-Bereich kumulieren, ist das Risiko eines osmotischen Schocks bei Verwendung von reinem Wasser mit Leitfähigkeiten unter $5 \mu\text{S}/\text{cm}$ als Aerosolmedium als relativ gering anzusehen.

Nach DIN SPEC 91315 wird die chemische Aktivität einer Plasmaquelle, d.h. die Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS), anhand der Konzentration von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Nitrit bzw. Nitrat (NO_2^- , NO_3^-) als repräsentative stabile und einfach messbare Spezies in einer mit Plasma behandelten wässrigen Flüssigkeit bestimmt. Behandelt wurden jeweils $1000 \mu\text{l}$ Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung (DPBS) bei unterschiedlichen Behandlungsbedingungen (Abbildung 17). Es wurden DBE-behandelte trockene und angefeuchtete Luft (ca. 75 %) sowie Aerosol untersucht. Variiert wurden die Betriebsspannung, der Abstand zwischen Plasmaquelle und Flüssigkeitsoberfläche und die Behandlungszeit.



Abbildung 17: Testaufbau zur Bestimmung der Konzentration reaktiver Spezies in mir der DBE-plasmaquelle behandelter Flüssigkeit

Die Bestimmung der Wasserstoffperoxid (H_2O_2)-Konzentration erfolgte unter Verwendung des Xylenolorange-Assays (FOX assay, 595 nm). Für die Nitrit (NO_2^-)-Bestimmung kam der Griess-Assay (540 nm) zur Anwendung.

Zunächst wurde die H_2O_2 -Bildung bei Flüssigkeitsbehandlung mit DBE-behandelter angefeuchteter Luft bei verschiedenen Betriebsspannungen untersucht (Abbildung 18).

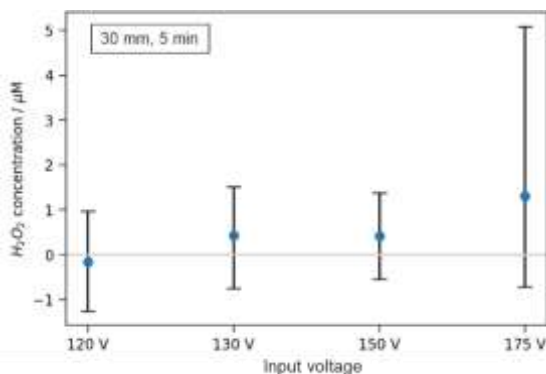


Abbildung 18: H_2O_2 -Konzentration in DPBS nach Behandlung mit DBE-behandelter angefeuchteter Luft über 5 min bei verschiedenen Betriebsspannungen, Abstand 30 mm

Die Messungen ergaben insgesamt sehr niedrige H_2O_2 -Konzentrationen mit einer leichten Tendenz zu höheren Konzentrationen bei höherer Betriebsspannung. Daraufhin wurden die weiteren Experimente mit einer Betriebsspannung von 175 V durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurde bei konstanter Betriebsspannung von 175 V und konstanter Behandlungszeit von 5 min der Abstand zwischen Plasmaquelle und Flüssigkeitsoberfläche variiert (Abbildung 19).

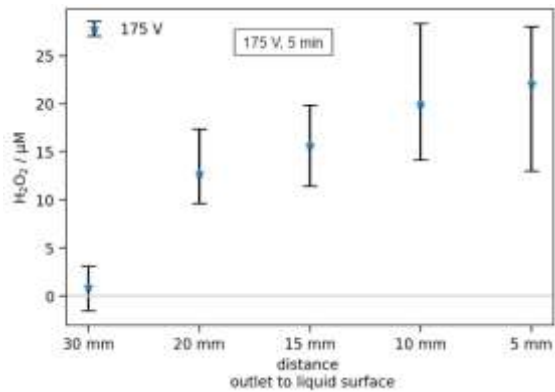


Abbildung 19: H₂O₂-Konzentration in DPBS nach Behandlung mit DBE-behandelter angefeuchteter Luft über 5 min bei 175 V Betriebsspannungen und variablem Abstand zwischen Plasmaquelle und Flüssigkeitsoberfläche

Es zeigte sich, dass bei geringeren Abständen die H₂O₂-Konzentration höher war, woraufhin für die weiteren Untersuchungen mit einem Abstand von 15 mm gearbeitet wurde.

Unter diesen Testbedingungen wurde die Bildung von Wasserstoffperoxid und Nitrit infolge der Behandlung von DPBS mit DBE-behandelter trockener und angefeuchteter (ca. 75 %) Luft sowie Aerosol nach verschiedenen Behandlungszeiten gemessen (Abbildungen 20-22).

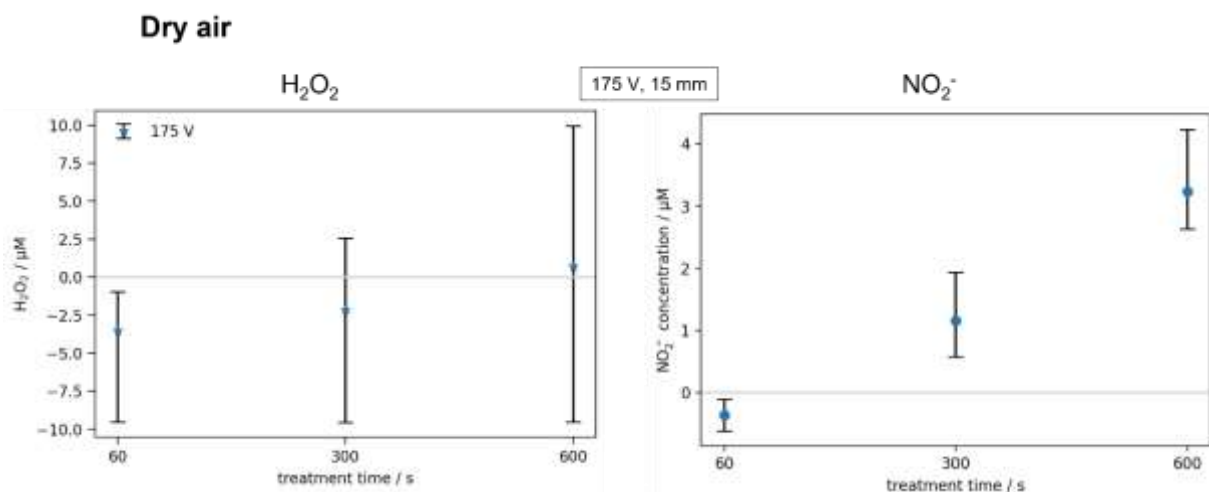


Abbildung 120: H₂O₂- und NO₂⁻-Konzentration in DPBS nach Behandlung mit DBE-behandelter trockener Luft bei 175 V Betriebsspannungen und 15 mm Abstand zwischen Plasmaquelle und Flüssigkeitsoberfläche nach verschiedenen Behandlungszeiten

Bei trockener Luft war H₂O₂ erst nach 10 min nachweisbar, die NO₂⁻-Konzentration nahm mit zunehmender Behandlungszeit zu und erreichte Maximalwerte zwischen 3 und 4 µmol/l.

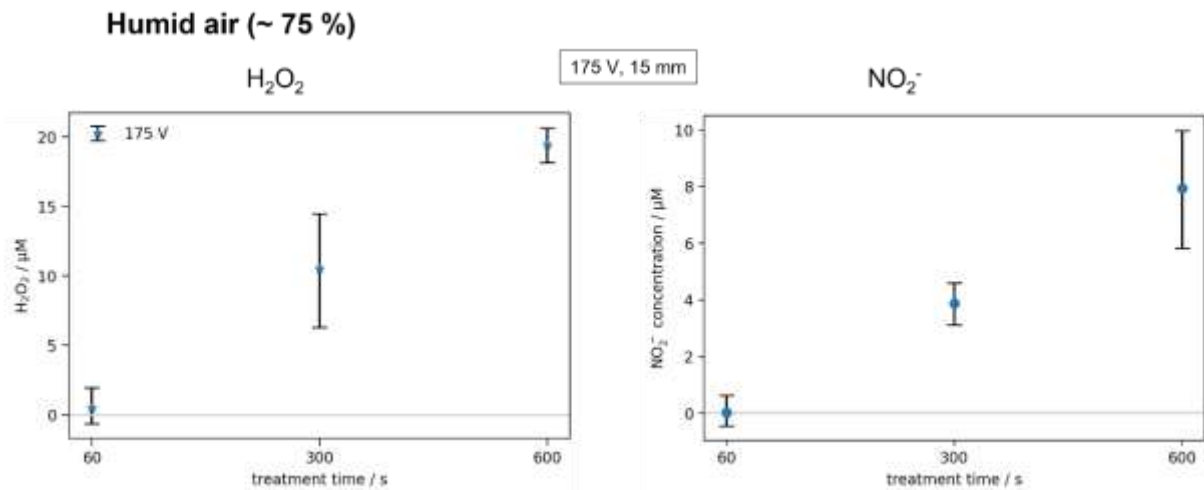


Abbildung 21: H_2O_2 - und NO_2^- -Konzentration in DPBS nach Behandlung mit DBE-behandelter angefeuchteter Luft (ca. 75 %) bei 175 V Betriebsspannungen und 15 mm Abstand zwischen Plasmaquelle und Flüssigkeitsoberfläche nach verschiedenen Behandlungszeiten

Mit angefeuchteter Luft stiegen die Konzentrationen beider Spezies mit zunehmender Behandlungsdauer an. Wie erwartet führten die im Entladungsbereich im Falle angefeuchteter Luft vorhandenen Wassermoleküle zu einem Anstieg der H_2O_2 -Konzentration bis maximal $20 \mu\text{mol/l}$ aufgrund der Dissoziation von Wassermolekülen in atomaren Wasserstoff ($\bullet\text{H}$) und Hydroxylradikale ($\bullet\text{OH}$) und der anschließenden schnellen Rekombination von $\bullet\text{OH}$ zu H_2O_2 . Das Vorhandensein von Feuchtigkeit in der DBE-behandelten Luft wirkte sich auch auf die NO_2^- -Konzentration aus. Hier wurden ebenfalls mit steigender Behandlungszeit steigende Konzentrationen gemessen, wobei die Maximalwerte um $8 \mu\text{mol/l}$ höher lagen als bei Verwendung trockener Luft.

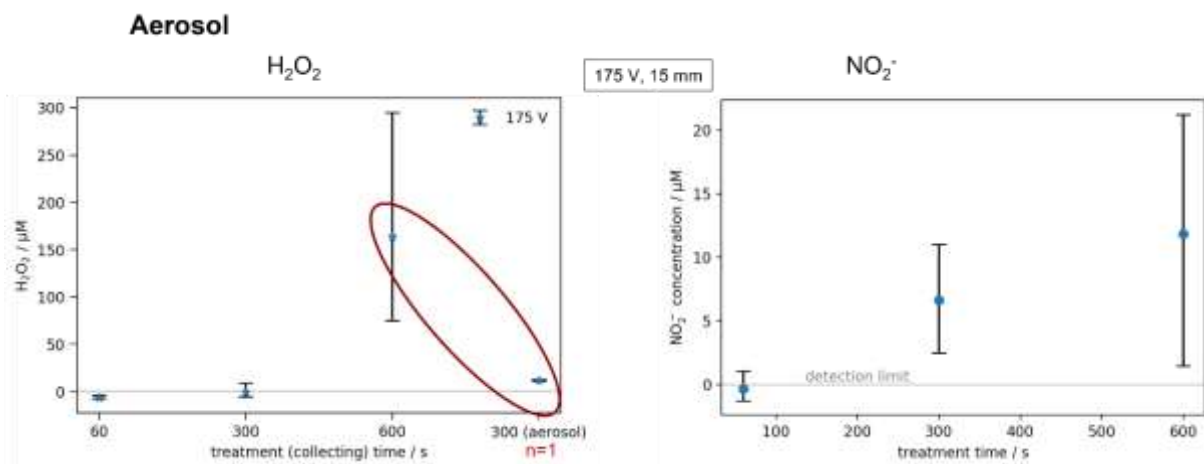


Abbildung 22: H_2O_2 - und NO_2^- -Konzentration in DPBS nach Behandlung mit DBE-behandeltem Aerosol bei 175 V Betriebsspannungen und 15 mm Abstand zwischen Plasmaquelle und Flüssigkeitsoberfläche nach verschiedenen Behandlungszeiten

Bei Verwendung von Aerosol war H_2O_2 nur nach 10 min detektierbar, allerdings mit vergleichsweise hohen Konzentrationen um $15 \mu\text{mol/l}$. Darüber hinaus wurde in einem separaten Testansatz einmalig über 5 min Aerosol kondensiert und in der so zurückgewonnenen Flüssigkeit eine H_2O_2 -Konzentration im $10 \mu\text{mol/l}$ gemessen. Die NO_2^- -Konzentration stieg mit zunehmender Behandlungsdauer an und erreichte Maximalwerte zwischen 10 und $15 \mu\text{mol/l}$.

Somit konnte gezeigt werden, dass mit feuchter Luft die höchsten Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies (gemessen als H_2O_2), mit trockener Luft die höchsten Konzentrationen reaktiver Stickstoffspezies (gemessen als NO_2^-) erzeugt werden. Somit kann grundsätzlich je nach Anwendung bzw. Ziel durch die Wahl des geeigneten Modus (trocken, feucht, Aerosol) das Verhältnis erzeugter RONS eingestellt werden.

Eine direkte Analyse des rekondensierten Aerosols war mit dem verwendeten experimentellen Aufbau nicht möglich, auch nicht über eine Kühlung einer für die Aerosolkondensation verwendeten Sammelplatte.

Die Grundcharakterisierung der biologischen Wirksamkeit der DBE-Plasmaquelle erfolgte zunächst über die Bestimmung der antimikrobiellen Wirksamkeit *in vitro* anhand von repräsentativen Test-Mikroorganismen unter Verwendung der bzw. in Anlehnung an die Verfahrensvorschriften der DIN SPEC 91315 in feuchtem Milieu/auf feuchter Oberfläche mittels Hemmhofstest. Dafür wurden die Mikroorganismen *Staphylococcus aureus* DSM 799/ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* DSM 18827 (MRSA - Methicillin-resistenter *S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* DSM 20044/ATCC 14990, *Escherichia coli* K-12 DSM 11250/NCTC 10538, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071/ATCC 10145 und *Candida albicans* DSM 1386/ATCC 10321 genutzt. Die einzelnen Testorganismen wurden jeweils auf eine Nährmedium (Agar) enthaltene Petrischale (10^5 Kolonie-bildende Einheiten pro Petrischale) aufgetragen und senkrecht mit der Plasmaquelle behandelt (Abbildung 23).

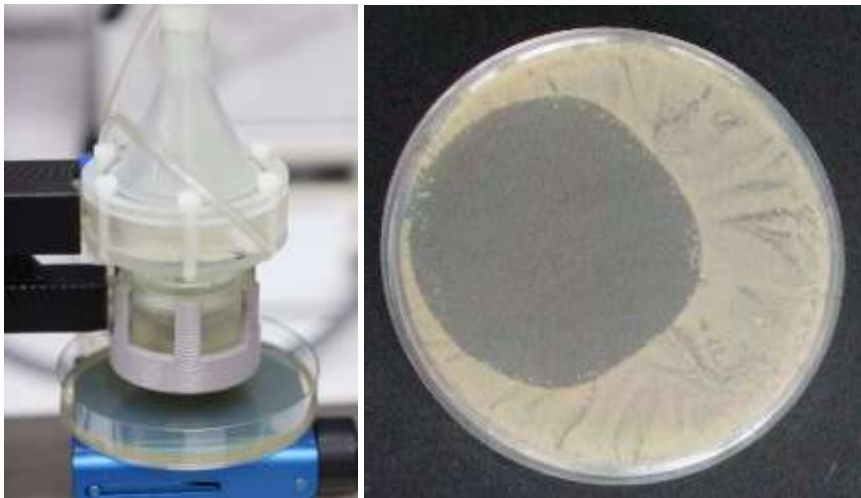


Abbildung 23: Versuchsanordnung zur Bestimmung der antimikrobiellen Wirksamkeit mittels Hemmhofstest für die DBE-Plasmaquelle (links) und beispielhafte Abbildung eines Hemmhofes (rechts)

Die Plasma-Behandlungszeiten betragen 1-10 min ($n=6$ Versuche pro Behandlungszeit). Die Untersuchungen wurden bei einem Behandlungsabstand von 5 mm durchgeführt. Nach der Inkubation der Mikroorganismen bei der optimalen Wachstumstemperatur (30°C bzw. 37°C) erfolgte die Bestimmung der Mikroorganismen-freien Hemmhöfe (DBE-Durchmesser innere Öffnung: 16 mm; Durchmesser Mikrotiteraufsatz: 11 mm; Außendurchmesser: 51 mm). Als Kontrollen (0 min Behandlungszeit) wurden unbehandelte Petrischalen (d.h. nicht mit Plasma behandelt) mitgeführt. Um eine eigene Wirkung des für die Plasmaquelle genutzten Arbeitsgases auszuschließen wurden Gaskontrollen mitgeführt, also Petrischalen, die 10 min nur mit Luft bzw. Aerosol behandelt wurden, ohne das Plasma zu zünden.

Die DBE-Plasmaquelle ermöglicht die Behandlung von trockener und angefeuchteter Luft. Für die Anfeuchtung wurde Luft durch eine Flasche mit Wasser geleitet, sodass ein Feuchtigkeitsgehalt von ca. 75% resultierte. Zur Erzeugung des Aerosols wurde entionisiertes Wasser in einem definierten Volumen über eine Dosiereinrichtung (Pumpeinheit) direkt in den Gasstrom gegeben. Eine Absaugung und Auffangrinne sollte eine Tropfenbildung bei der Aerosolbehandlung verhindern.

Es wurde für alle getesteten gram-positiven (*S. aureus* inkl. MRSA, *S. epidermidis*) und gram-negativen (*E. coli*, *P. aeruginosa*) Bakterien sowie die Hefe *C. albicans* ein antimikrobieller Effekt nachgewiesen. Das Arbeitsgas allein (ohne Plasma) hatte keinen inaktivierenden Effekt unter den genutzten Testbedingungen. Damit konnte die generelle antimikrobielle Wirksamkeit der DBE-Plasmaquelle gezeigt werden (Abbildung 24).

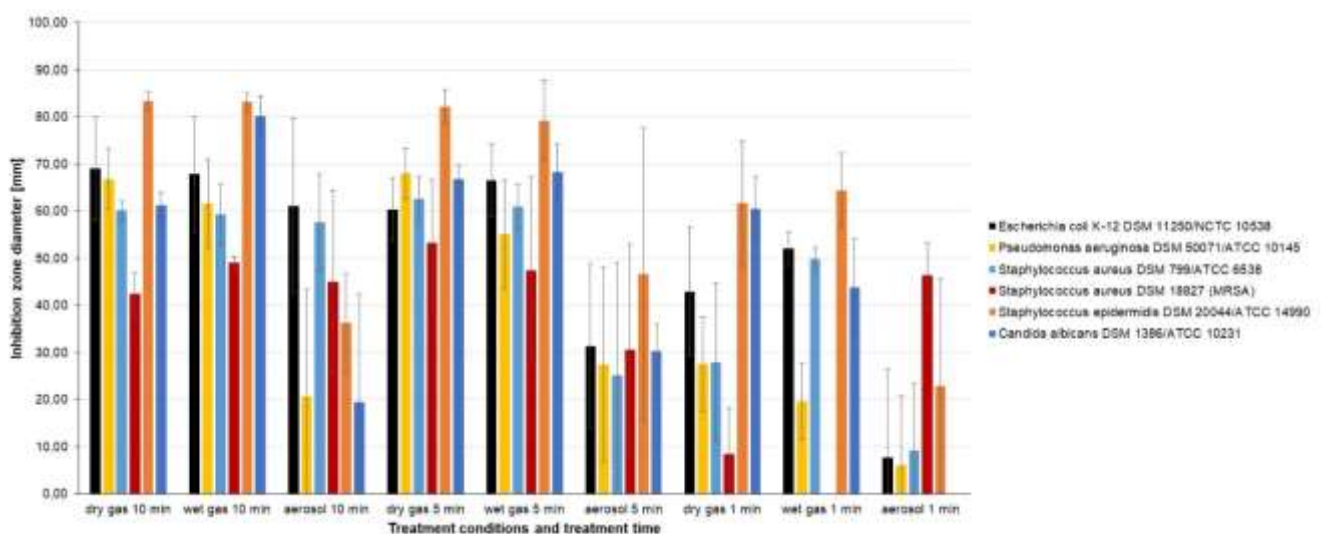


Abbildung 24: Ergebnisse des Hemmhoftests für die DBE-Plasmaquelle gegenüber den getesteten Mikroorganismen (*Escherichia coli* K-12 DSM 11250/NCTC 10538, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071/ATCC 10145, *Staphylococcus aureus* DSM 799/ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* DSM 18827 (MRSA - Methicillin-resistenter *S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* DSM 20044/ATCC 14990 und *Candida albicans* DSM 1386/ATCC 10321) für trockene und feuchte Luft sowie Aerosol; Elektrodenmaterial: Edelstahl; Spannung: 120 V; Behandlungszeit: 1, 5, 10 min; Abstand DBE-Öffnung - Nährmediumoberfläche: 5 mm; Arbeitsgas: 0,74 slm N₂, 0,26 slm O₂, 300 sccm Stickstoff für die Absaugdüse am Gehäuse; Betrieb der Aerosol Pumpeinheit: 200µl pro Minute mit entionisiertem Wasser (n=6).

Der Hemmhofdurchmesser stieg mit Zunahme der Behandlungszeit bei allen getesteten Mikroorganismen. Der Hemmhofdurchmesser lag für die behandelten Bakterien (einschließlich MRSA) im Bereich von 0 bis 83 mm. Die antimikrobielle Wirksamkeit der angefeuchteten Luft war in den meisten Fällen ähnlich oder leicht höher als für trockene Luft. Die Wirkung des plasmabehandelten Aerosols war geringer als mit trockener oder angefeuchteter Luft. Tendenziell sank die antimikrobielle Wirksamkeit für trockene und angefeuchtete Luft (5 und 10 min Behandlungszeit) gegenüber den getesteten Mikroorganismen von links nach rechts in der Reihenfolge:

S. epidermidis > *E. coli* ≥ *C. albicans* > *P. aeruginosa* ≥ *S. aureus*

Eine Steigerung der antimikrobiellen Wirkung der DBE-Plasmaquelle konnte durch eine Erhöhung der Betriebsspannung von 120 V auf 175 V erreicht werden (Abbildung 25).

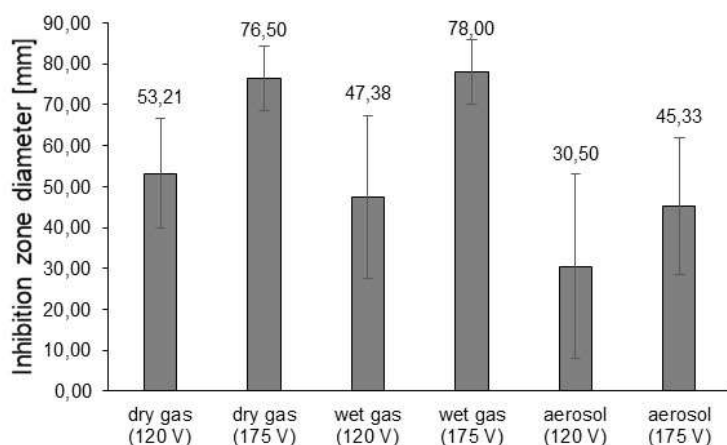


Abbildung 25: Ergebnisse des Hemmhoftests für die DBE-Plasmaquelle gegenüber *Staphylococcus aureus* DSM 18827 (MRSA - Methicillin-resistenter *S. aureus*) für trockene und feuchte Luft sowie Aerosol; Elektrodenmaterial: Edelstahl; Spannung: 120 V bzw. 175 V; Behandlungszeit: 10 min; Abstand DBE-Öffnung - Nährmediumoberfläche: 5 mm; Arbeitsgas: 0,74 slm N₂, 0,26 slm O₂, 300 sccm Stickstoff für die Absaugdüse am Gehäuse; Betrieb der Aerosol Pumpeinheit: 200µl pro Minute mit entionisiertem Wasser (n=6).

So stieg bei *Staphylococcus aureus* DSM 18827 (MRSA - Methicillin-resistenter *S. aureus*) als Testmikroorganismus der Hemmhofdurchmesser und damit die antimikrobielle Wirksamkeit bei 175 V im Vergleich zu 120 V für trockene bzw. angefeuchtete Luft um 31% bzw. 37%. Auch für das Plasma-behandelte Aerosol wurde ein größerer Hemmhof bei 175 V nachgewiesen. Allerdings lagen die Werte unter denen, die bei entsprechender Spannung mit trockener und feuchter Luft erhoben wurden.

Außerdem konnte bei ansonsten gleichen Testbedingungen gezeigt werden, dass eine Vergrößerung des Abstandes zwischen DBE-Öffnung und Flüssigkeitsoberfläche (30 mm statt 5 mm) in einer geringeren antimikrobiellen Wirksamkeit resultierte (Abbildung 26).

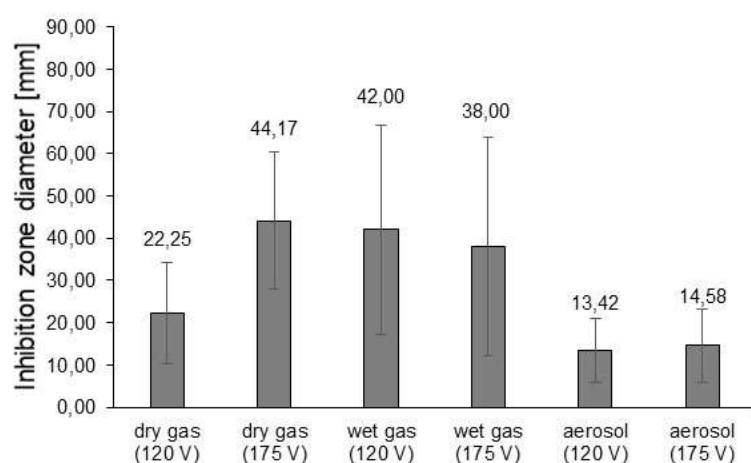


Abbildung 26: Ergebnisse des Hemmhoftests für die DBE-Plasmaquelle gegenüber *Staphylococcus aureus* DSM 18827 (MRSA - Methicillin-resistenter *S. aureus*) für trockene und feuchte Luft sowie Aerosol; Elektrodenmaterial: Edelstahl; Spannung: 120 V bzw. 175 V; Behandlungszeit: 10 min; Abstand DBE-Öffnung - Flüssigkeitsoberfläche: 30 mm; Arbeitsgas: 0,74 slm N₂, 0,26 slm O₂, 300 sccm Stickstoff für die Absaugdüse am Gehäuse; Betrieb der Aerosol Pumpeinheit: 200µl pro Minute mit entionisiertem Wasser (n=6).

Die Untersuchung der antiviralen Wirksamkeit der DBE-Plasmaquelle erfolgte zunächst mit dem Bakteriophagen-Testmodell unter Verwendung des Phi6-Phagen DSM 21518 als Surrogat zu SARS-CoV-2. Beide Viren sind behüllt und besitzen Ribonukleinsäure (SARS-CoV-2: Einzelstrang-RNS, Phi6-Phage: Doppelstrang-RNS). Der Wirt des Phi6-Phagen (Familie: *Cystoviridae*) ist das Bakterium *Pseudomonas sp.* DSM 21482. Das im Rahmen des Projektes etablierte Bakteriophagen-Testmodell basiert auf der Top-Layer-Methode (siehe Kapitel II.1.1).

Eine Phagensuspension wurde mit der DBE-Plasmaquelle behandelt (Abbildung 27A). Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Viren. Hierzu wurden die Phi6-Phagen zusammen mit dem Wirtsbakterium *Pseudomonas sp.* in sogenannten Weichagar gegeben wird. Dieser Agar enthält nur eine geringe Agarmenge (0,75%). Der Weichagar wurde dann auf Grundagar mit einer höheren Agarmenge (1,5%) aufgebracht. Die so angesetzten Petrischalen wurden über Nacht bei 25°C inkubiert. In dieser Zeit sollten sich die Phagen vermehren und damit einhergehend die Wirtsbakterien lysieren. Dies führt zur Bildung sogenannter plaque-forming units (pfu/ml; Abbildung 27B). Die Ausgangskonzentration der Phagen betrug ca. 10^6 pfu/ml.

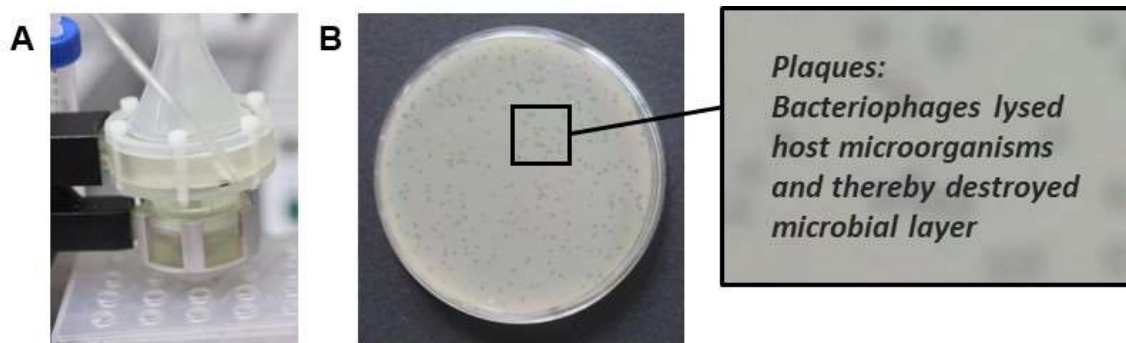


Abbildung 27: Versuchsanordnung zur Bestimmung der antiviralen Wirksamkeit mittels Suspensionstest durch (A) DBE-Plasmaquelle, (B) Petrischale mit plaque-forming units an den Stellen, an denen die Bakteriophagen die Wirtsbakterien lysierten

Es wurden jeweils 300 µl Phagensuspension in einer 24-Well-Platte behandelt (Abstand DBE-Öffnung - Flüssigkeitsoberfläche: 25 mm; Betriebsspannung 120 V). Die Plasma-Behandlungszeit betrug 10 min (n=3). Analog zu den Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit wurde sowohl trockene als auch angefeuchtete Luft (Feuchtigkeitsgehalt von 75%) sowie Aerosol getestet. Als Kontrollen (0 min Behandlungszeit) wurden unbehandelte Phagensuspensionen (d.h. nicht mit Plasma behandelt) mitgeführt. Um eine Wirkung des für die Plasmaquelle genutzten Arbeitsgases (Luft bzw. Aerosol) auszuschließen wurden Gaskontrollen mitgeführt, also Phagensuspensionen, die 10 min nur mit Gas behandelt wurden, ohne das Plasma zu zünden.

Die Reduktion der Virusanzahl wurde als $\log_{10}(N_R)$ bezeichnet. Dieser Wert ergab sich aus der Berechnung

$$\log_{10}(N_R) = \log_{10}(N_0) - \log_{10}(N_S),$$

wobei N_0 die Anzahl der pfu/ml der unbehandelten Kontrolle war und N_S der Anzahl der pfu/ml nach der Behandlung entspricht.

Es konnte unter den gewählten Testbedingungen bei 120 V Betriebsspannung keine antivirale Wirksamkeit, weder mit trockener oder angefeuchteter Luft noch mit Aerosol nachgewiesen werden (Abbildung 28).

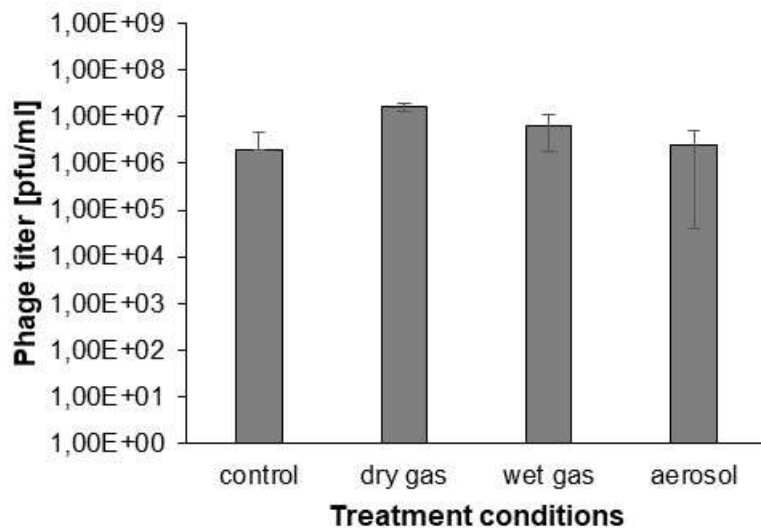


Abbildung 28: Ergebnisse der antiviralen Testung gegenüber dem Phi6-Phagen (Wirtsmikroorganismus: *Pseudomonas sp.*) für die DBE-Plasmaquelle bei trockener und feuchter Luft sowie Aerosol; Elektrodenmaterial: Edelstahl; Spannung: 120 V; Behandlungszeit: 10 min; Abstand DBE-Öffnung - Flüssigkeitsoberfläche: 25 mm; Arbeitsgas: 0,74 slm N₂, 0,26 slm O₂, 300 sccm Stickstoff für die Absaugdüse am Gehäuse; Betrieb der Aerosol-Pumpeinheit: 200µl pro Minute mit Reinstwasser bzw. 100 µl bei Kontrolle (n=3).

Bei Erhöhung der Betriebsspannung auf 175 V wurde demgegenüber eine deutliche Inaktivierung der Phagen (Behandlung von 300 µl Phagensuspension in 24-Well-Platte) bei Verwendung von trockener und angefeuchteter Luft (Reduktion des Virustiters bis zur Nachweisgrenze um 5,6 log-Stufen) nachgewiesen, wohingegen mit DBE-behandeltem Aerosol praktisch keine Inaktivierung erreicht wurde (Abbildung 29).

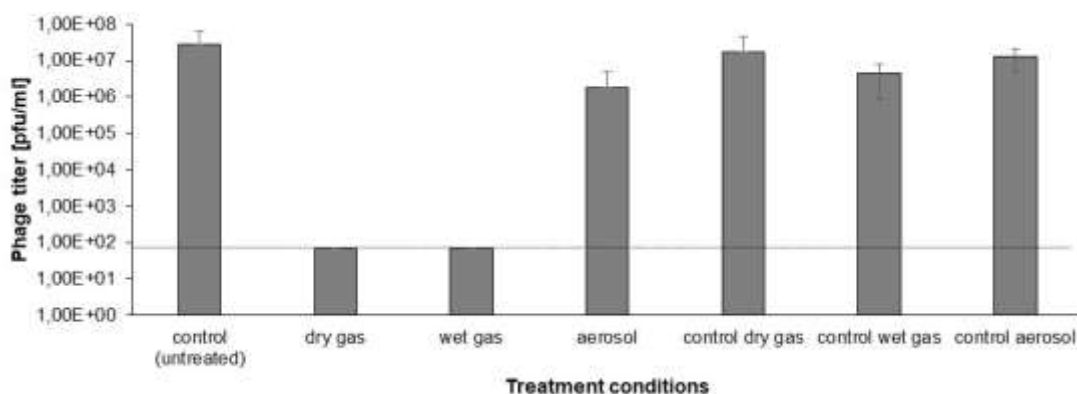


Abbildung 29: Ergebnisse der antiviralen Testung gegenüber dem Phi6-Phagen (Wirtsmikroorganismus: *Pseudomonas sp.*) für die DBD-Plasmaquelle bei trockener und feuchter Luft sowie Aerosol; Elektrodenmaterial: Edelstahl; Spannung: 175 V; Behandlungszeit: 10 min; Abstand DBD-Öffnung - Flüssigkeitsoberfläche: 25 mm; Arbeitsgas: 0,74 slm N₂, 0,26 slm O₂, 300 sccm Stickstoff für die Absaugdüse am Gehäuse; Betrieb der Aerosol Pumpeinheit: 200µl pro Minute mit Reinstwasser bei Plasma bzw. 100 µl bei Kontrollen (n=3; Nachweisgrenze: 70 pfu/ml)

Weiterhin erfolgten Untersuchungen zur viruziden Wirkung der DBE-Plasmaquelle unter Verwendung des im Rahmen des Projektes ebenfalls etablierten, auf Säugetierzellen basierenden *In-vitro*-Infektionsmodells mit dem murinen Hepatitis-Virus (MHV). Für die Experimente wurde die murine Fibroblasten-Zelllinie 17Cl-1 verwendet. Als Reporterviren dienten MHV-A59-eGFP (siehe Kapitel II.1.1).

Im Rahmen des Projektes wurde nach dem Aufbau und der Etablierung dieses Virus-Infektionsmodells im INP ein neuartiges, auf *high-content imaging* (quantitative Mikroskopie) basierendes System der Auswertung von *In-vitro*-Virusinfektionen entwickelt und publiziert, welches es erlaubt, die Dynamiken der Plasma-vermittelten antiviralen Wirkungen in den Wirtszellen besser abzubilden.

Sander Bekeschus, Meike Heuser, Lea Miebach, Marcus Frank, Thomas von Woedtke, Anke Schmidt

Viral inactivation of murine coronavirus via multiple gas plasma-derived reactive species

Redox Biology 82 (2025) 103591; DOI:10.1016/j.redox.2025.103591

Unter Verwendung dieses neuartigen Testverfahrens wurden die antivirale Wirksamkeit der DBE-Plasmaquelle getestet. Dafür wurden 17-CL1-Wirtszellen zunächst mit einem Fluoreszenzmarker versehen. Den Zellen wurde erlaubt, sich in Wells einer Mikrotiterplatte zu vermehren, bis eine beinahe (>90%) vollständige Konfluenz erreicht wurde. Anschließend wurde eine in zahlreichen Vorversuchen etablierte Menge an Viren hinzugegeben. Diese Viren waren entweder unbehandelt oder wurden für 600 s mit DBE-Plasma-behandelter trockener und angefeuchteter Luft sowie Aerosol behandelt. Anschließend wurden die kompletten Wells über 24 h kontinuierlich in einem *high-content imaging*-Fluoreszenz-Mikroskop detektiert.

Aufgrund der Fluoreszenzfärbung der Zellen war sichtbar, in welchen Bereichen die Zellen durch die Virusinfektion bereits eliminiert waren (zytopathischer Effekt). Abbildung 30 zeigt beispielhaft einen unversehrten Zellrasen (rechts), einen durch Virusinfektion stark zerstörten Zellrasen (links) und einen aufgrund partieller Virusinfektion aufgrund von Plasma-inaktivierten Viren nur in Teilbereichen zerstörten Zellrasen.

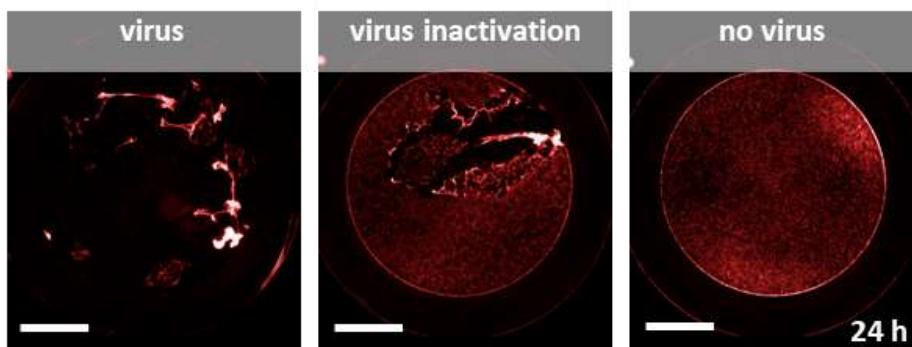


Abbildung 30: Ganz-Well-Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von 17-CL1 Zellen (rot markiert) 24 h nach Viruszugabe. Links: intakter Zellrasen ohne Virusinfektion, rechts: nahezu vollständig durch Virusinfektion zerstörter Zellrasen, Mitte: teilweise intakter Zellrasen mit zerstörten Anteilen nach Plasma-Inaktivierung von Viren.

Die Auswertung erfolgte softwaregestützt, wobei die Fläche, welche von Zellen bewachsen war, kinetisch ausgewertet wurde. Je stärker die Zellen aufgrund der Virusinfektion zerstört wurden, desto stärker verringerten sich die rot fluoreszierenden Bereiche der Zellkultur, was als Verringerung der Zellkonfluenz dargestellt werden konnte (Abbildung 31).

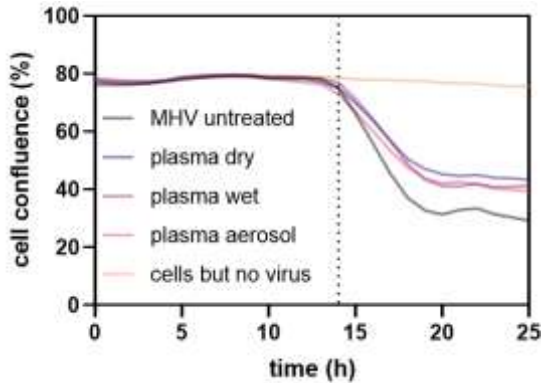


Abbildung 31: Kinetik der Zellkonfluenz über 25 h nach Zugabe von über 600 s mit DBE-Plasma-behandelter trockener (dry) und feuchter (wet) Luft sowie DBD-Aerosol behandelten MHV-Virus suspensionen; unbehandelte MHV-Suspension als Positivkontrolle, Zellkultur ohne Viruszugabe als Negativkontrolle.

Es zeigte sich, dass bei den Zellen ohne Viruszugabe (Negativkontrolle) über 25 h ein intakter Zellrasen erhalten blieb (100 % Konfluenz). Nach Zugabe von un behandelter Virus suspension sank die Konfluenz innerhalb von 15-20 h auf unter 40 % (Positivkontrolle). Diese Abnahme der Konfluenz war leicht verringert nach Zugabe von Virus suspensionen, die mit DBE-Plasma-behandelter Luft bzw. Aerosol behandelt worden waren.

Zur vergleichenden Quantifizierung wurden die Flächen unter den Konfluenz-Kurven (AUC – area under the curve) berechnet (Abbildung 32).

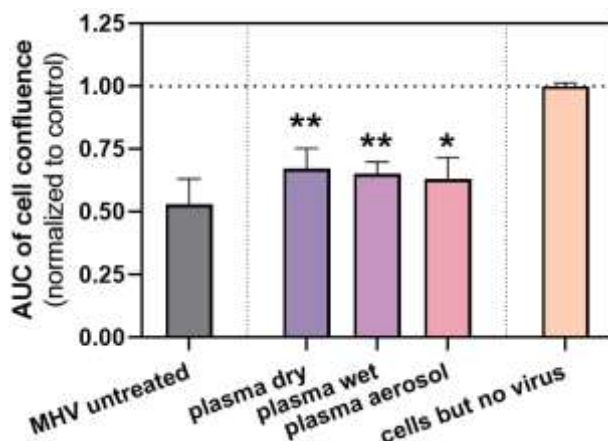


Abbildung 32: Flächen unter den Konfluenz-Kurven (vgl. Abbildung 28) mit nur geringer, aber signifikant-erhöhter Virusinaktivierung und der dementsprechend größeren Fläche intakten Zellrasens.

Diese Auswertung zeigt, dass eine Behandlung der MHV-Suspensionen über 600 s mit DBE-Plasma-behandelter Luft bzw. Aerosol zu einer geringen, aber signifikanten Verringerung des zytopathischen Effektes im Vergleich zur Positivkontrolle führte, während gleichzeitig keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen DBE-Behandlungsmodi festzustellen

waren. Bei der Exposition der Viren mit kürzeren DBE-Behandlungszeiten (bspw. 180 s oder 300 s) waren keine antiviralen Effekte nachweisbar (Daten nicht gezeigt)

Auch für die mit der DBE-Plasmaquelle behandelte Luft bzw. das Aerosol wurden orientierende Untersuchungen zur Zytotoxizität bzw. biologischen Verträglichkeit unter Verwendung von Zellkulturen und Standardassays durchgeführt.

Einer der regelmäßig genutzten Zytotoxizitätsassays ist ein Resazurin-basiertes Verfahren, in welchem metabolisch aktive Zellen Resazurin in fluoreszierendes Resorufin verstoffwechseln. Eine geringere Fluoreszenz kann entweder auf eine erhöhte Anzahl toter Zellen oder auf eine geringere Anzahl der Gesamtzellen, bspw. durch eine Verringerung der Zellteilungsrate, hindeuten. Ein zweites Verfahren ist die Fluoreszenz-Mikroskopie, mit welcher der Anteil terminal toter (DAPI-positiver) Zellen anteilig an allen Zellen relativ bestimmt werden kann. Für die Analyse wurden 5×10^4 humane HaCaT-Keratinocyten in 750 μ l Zellkulturmedium in 12-Well Platten ausgesät und über Nacht anwachsen gelassen. Am nächsten Tag erfolgt die DBE-Behandlung für 180 s pro Well unter den verschiedenen Konditionen (trocken, feucht, Aerosol); Wasserstoffperoxid (100 μ mol/l) diente als Positiv-Kontrolle. Gegenüber der unbehandelten Kontrolle, auf welche normalisiert wurde (100%) zeigte keine der DBE-Behandlungen eine signifikante oder relevante Reduktion der metabolischen Aktivität der Zellen (Abbildung 33 links). In der quantitativen Mikroskopie wurde das Ergebnis bestätigt, d.h. die DBE-Behandlungen zeigten nur einen marginalen Anteil toter Zellen (Abbildung 33 rechts), während die Positivkontrolle Wasserstoffperoxid sowohl die metabolische Aktivität signifikant reduzierte als auch den Anteil terminal toter Zellen erhöhte.

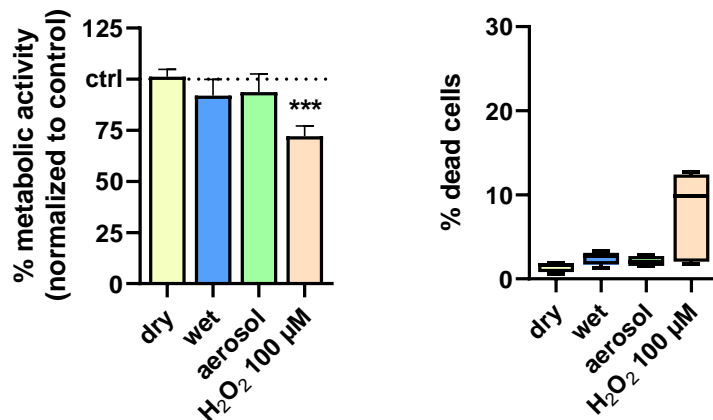


Abbildung 33: Metabolische Aktivität von DBE-Plasma-behandelten (180s) humanen HaCaT Keratinocyten nach 24h Inkubation (links) sowie der Anteil terminal toter Zellen zu diesem Zeitpunkt (rechts).

Um die Wirkung der DBE-Plasmabehandlung weiter hinsichtlich möglicher genotoxischer Eigenschaften zu untersuchen, wurde ein zuvor in unseren Laboren etablierter Mikrokern-Test (cytokinesis-block micronucleus assay; CBMN) genutzt.⁵

Für die Analyse wurden 5×10^4 humane und mit einem Fluoreszenz-Farbstoff-markierte HaCaT-Keratinocyten in 750 μ l Zellkulturmedium in 12-Well Platten ausgesät und über Nacht

⁵ F. Saadati et al., Nanomaterials 12 (2022) 4463, DOI: 10.3390/nano12244463;

anwachsen gelassen. Am nächsten Tag erfolgt die DBE-Behandlung für 180 s pro Well unter den verschiedenen Konditionen (trocken, feucht, Aerosol); Methylmethansulfonat (400 $\mu\text{mol/l}$) diene als Positiv-Kontrolle. Die Zellen wurden für 6 h inkubiert bevor Cytochalasin D, ein Zellteilungs-Inhibitor, hinzugegeben wurde (400 $\mu\text{mol/l}$). Die Zellen wurden weitere 48 h im Brutschrank inkubiert, der Zellüberstand abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Akkutase teilweise abgelöst. Nach weiteren Waschschrritten folgte die Fixierung der Zellen und Färbung der Zellkerne mittels DAPI. Im Anschluss erfolgte das *high-content imaging* (Abbildung 34 links) und die Nutzung eines eigens angefertigten Algorithmus, mit welchem zunächst binukleierte Zellen identifiziert wurden (Abbildung 34 links, Bild oben rechts), gefolgt von der Algorithmus-basierten Markierung des Zytoplasmas (linke Abbildung, unten links) und der Identifikation von Mikrokernen (Abbildung 34 links, Bild unten rechts). Die automatisierte Quantifizierung über mehrere Tausend binukleierte HaCaT-Keratinocyten ergab eine signifikant erhöhte Anzahl von Mikrokernen in der Positivkontrolle (Methylmethansulfonat, MMS), aber nicht in den mit DBE-Plasmen-behandelten Zellen (Abbildung 34 rechts).

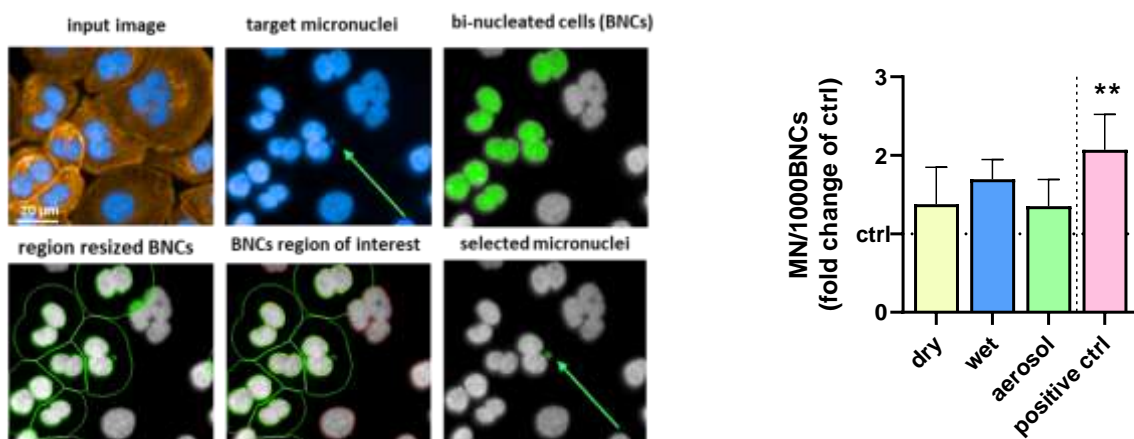


Abbildung 34: Segmentationsstrategie von Mikrokernen in binukleierten HaCaT-Keratinocyten (links) und Mikrokern-Quantifizierung in mit DBE-Plasmen-behandelten (180 s) Zellen 2,5 Tage nach Behandlung (rechts). Die Positivkontrolle (Genotoxizität) war MMS (Methylmethansulfonat).

Im nächsten Schritt wurde die Frage der Gewebe-Kompatibilität der Kaltplasma-Behandlung adressiert. Dazu nutzten wir ein kürzlich von uns etabliertes bzw. optimiertes Verfahren der detaillierten Evaluation des Irritationspotentials des bebrüteten Hühnerembryos (HET-CAM-Modell).⁶ Für die Versuche wurden nur Eier mit vitalen Embryonen genutzt. Nach der Präparation der Chorioallantoismembran des bebrüteten Hühnereis (CAM) wurde entweder eine Behandlung mit nur dem Arbeitsgas (gas) oder mit den DBE-Plasmen der verschiedenen Betriebsmodi für 20 s, 60 s, oder 120 s durchgeführt (Abbildung 35 oben). Längere Plasmabehandlungszeiten waren nicht möglich, da es mit zunehmender Behandlungsdauer zu einem größeren Anteil negativer bzw. reizender Effekte durch das Gas selbst kommt, was sich u.a. durch höhere Austrocknung, ein Reißen der CAM und schließlich die Embryonen-Vitalität einschränkende Effekte bemerkbar macht. Dies ist unabhängig von der hier getesteten DBE auch mit anderen Plasmaquellen beobachtet worden. Dieser Effekt ließ sich bereits bei der Trockengas-DBE-Behandlung (ohne Plasmazündung) sehen (Abbildung 35 unten). Die

⁶ J. Berner et al., ACS Appl. Mater. Interfaces 16 (2024) 34480–34495, DOI: 10.1021/acsami.4c04039

Auswertung des Irritationspotentials erfolgte anhand eines Scoring-Systems nach bis 48 h nach Plasmabehandlung. Trockenes Gas (ohne Plasma) war signifikant reizender als feuchtes Gas oder Aerosol, vermutlich, weil die letzten beiden die Austrocknung der CAM minimierten. Auch bei den Plasmabehandlungen waren die trockenen DBE-Konditionen mit einem höheren Irritationspotential assoziiert als die feuchten oder Aerosol-Konditionen, für 120 s Behandlungszeit sogar signifikant. Für die jeweils gleiche Arbeitsgas-Kondition war die Plasmabehandlung auch signifikant stärker irritativ als die korrespondierende Arbeitsgas-Behandlung (ohne Plasma).

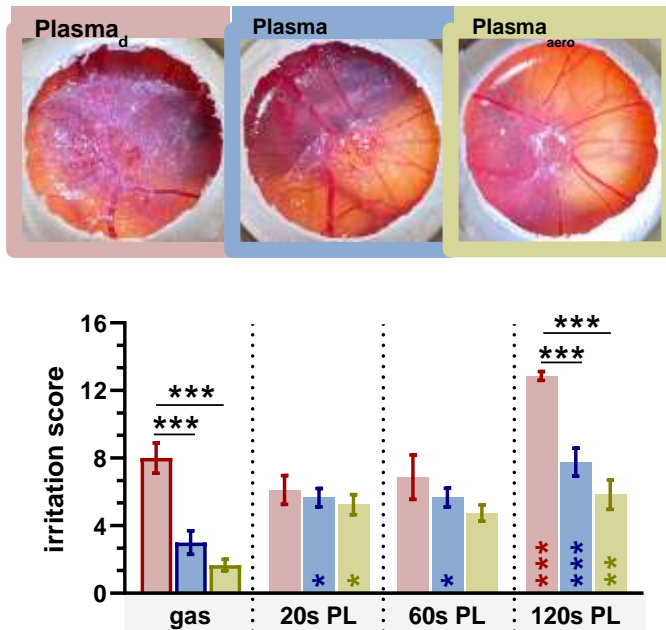


Abbildung 35: Das HET-CAM Modell des bebrüteten Hühnerembryos beispielhaft nach DBE-Plasmabehandlung mit unterschiedlichen Arbeitsgas-Modi (oben), sowie die Quantifizierung des Irritations-Potentials nach einem in-house-etablierten Scoring-Systems (unten). Für die Versuche wurden ca. 250 Eier genutzt.

Generell konnte mit diesen orientierenden Untersuchungen gezeigt werden, dass mit der DBE-Plasmaquelle behandelte trockene und angefeuchtete Luft sowie Aerosol keine zytotoxischen und gentoxischen Effekte auf *in vitro* kultivierte Zellen zeigte. Die mit dem sehr empfindlichen HET-CAM-Test erfolgte Untersuchung auf Gewebetoxizität ergab stärkere Irritationen bei Verwendung von trockener Luft. Dieser Effekt ist aber höchstwahrscheinlich überwiegend auf Austrocknungseffekte und weniger auf die Plasmabehandlung zurückzuführen.

Keine Aussagen lassen sich mit den hier verwendeten Testverfahren im Hinblick auf eine mögliche Lungentoxizität machen. Insbesondere im Falle der Verwendung von DBE-behandelter trockener und angefeuchteter Luft muss damit gerechnet werden, dass diese auch in größerem Umfang eingeatmet wird. Valide und finale Aussagen dazu werden nur in *In-vivo*-Experimenten gemacht werden können.

Zusammenfassend war festzustellen, dass mit der DBE-Plasmaquelle ein Gerät vorgelegt werden konnte, mit dem die Behandlung von Luft und von Aerosol und die anschließende Applikation der so behandelten Medien im oberen Respirationstrakt möglich wird. Die Ergebnisse der Testung der antibakteriellen sowie antiviralen Wirksamkeit (phi6-Phagen,

murines Hepatitis-Virus) ergaben, das trockene bzw. angefeuchtete Luft tendenziell effektiver wirken als plasmabehandeltes Aerosol.

In früheren eigenen Experimenten und in einer Vielzahl von Publikationen konnte die antimikrobielle Wirksamkeit von plasmabehandelten Flüssigkeiten zweifelsfrei nachgewiesen werden. Die Verwendung von DBE-behandeltem Aerosol führte in den hier untersuchten experimentellen Ansätzen entgegen den ursprünglichen Erwartungen zu keiner Verstärkung biologischer Effekte im Vergleich zu DBE-behandelter trockener oder angefeuchteter Luft. Daher ist davon auszugehen, dass bei einer Plasmabehandlung von Aerosolen zusätzliche, nicht allein von der Plasmaquelle abhängige Parameter eine Rolle spielen. Dazu gehören neben der Plasmabehandlungszeit als bekanntem kritischem Parameter möglicherweise auch Faktoren wie die Tröpfchengröße. Hier sind umfangreiche weitere Grundlagen-Untersuchungen erforderlich, da es dazu auch in der Literatur bisher kaum Daten gibt. Einige Aspekte der Plasma-Aerosol-Wechselwirkung wurden im Rahmen des Projektes separat untersucht (siehe Abschnitt II.1.3).

Auf der Basis der vorgelegten Testergebnisse war im Projektverbund beschlossen worden, die weiteren experimentellen Arbeiten bei den Verbundpartnern FZB und LIV auf die Anwendung von plasmabehandelter angefeuchteter Luft zu fokussieren. Dieser experimentelle Ansatz kommt auch den Praxisbedingungen z.B. bei der Beatmung von Patienten am nächsten.

Nach diesen umfassenden Entwicklungen und Untersuchungen wurden im INP gefertigte und geprüfte Exemplare der DBE-Plasmaquelle an die Verbundpartner FZB und LIV weitergegeben und durch Projektmitarbeiter des INP dort installiert und an die erforderlichen experimentellen Gegebenheiten und Anforderungen angepasst. Dazu gehörten auch hier diverse Zuarbeiten zur Einholung verschiedener laborsicherheitstechnischer Genehmigungen im FZB und im LIV sowie zur Erstellung der Tierversuchsanträge durch das LIV. Das INP stand und steht weiterhin bis zum Ende der Projektlaufzeit und darüber hinaus für die Betreuung der weiteren Experimente bei den Verbundpartnern zur Verfügung.

Für die weitere experimentelle *In-vivo*-Testung wurde nach den Vorgaben des Projektpartners LIV eine für Kleintierexperimente kommerziell verfügbare Isofluran-Behandlungskammer so umgebaut, dass die DBE-Plasmaquelle angekoppelt werden und so eine Behandlung mit plasmabehandelter Luft erfolgen kann (Abbildung 35).



Abbildung 35: Mit der DBE-Plasmaquelle ausgerüstete Isofluran-Kammer für die experimentelle Behandlung von Kleintieren mit plasmabehandelter Luft

II.1.3 Ergebnisse der Untersuchungen zu Plasma-Aerosol-Wechselwirkungen

Ein spezielles wissenschaftliches Arbeitspaket des INP war die physikalische und chemische Charakterisierung von plasmabehandeltem Aerosol. Dies war einerseits Bestandteil der Entwicklungsarbeiten für die DBE-Plasmaquelle, die auch mit einem Aerosol betrieben werden und entsprechend charakterisiert werden sollte. Weiterhin waren detaillierte Untersuchungen zur Charakterisierung der Aerosoleigenschaften (Tröpfchengröße, Verteilung und Dichte, Flüssigkeitsdiagnostik) geplant, um die antimikrobielle und antivirale Wirksamkeit des DBE-behandelten Aerosols zu optimieren.

Da es sich hierbei um ein neues Arbeitsfeld am INP handelte, wurde viel Kapazität in den Aufbau und die Optimierung geeigneter Untersuchungsmethoden investiert. So wurde für die Bestimmung der Aerosol-Tröpfchengröße ein eigener Messaufbau konzipiert und in Betrieb genommen, der bei der Entwicklung der DBE-Plasmaquelle zur Aerosolbehandlung erfolgreich zum Einsatz kam (siehe Abschnitt II.1.2 und Abbildung 15).

Nachdem festgestellt wurde, dass das mit der DBE-Plasmaquelle behandelte, aus entionisiertem Wasser hergestellte Aerosol mit einer mittleren Tröpfchengröße von 20 µm eine geringere antimikrobielle und antivirale Wirksamkeit aufwies im Vergleich zu trockener und angefeuchteter Luft, wurde im Projektverbund entschieden, die weiteren biologischen Testungen insbesondere bei den Projektpartnern FZB und LIV auf DBE-behandelte angefeuchtete Luft zu konzentrieren, um den Bearbeitungsfortschritt des Gesamtverbundes nicht zu verzögern (siehe Abschnitt II.1.2). Damit verbunden wurde beschlossen, die Arbeiten zur Plasma-Aerosol-Wechselwirkung inhaltlich von der Entwicklung und Optimierung der DBE-Plasmaquelle zu trennen und separat weiter voranzutreiben.

Es ist aus umfangreichen eigenen Vorarbeiten sowie aus der Literatur bekannt, dass die Behandlung von wässrigen Flüssigkeiten mit kaltem Atmosphärendruckplasma dazu führt, dass diese Flüssigkeiten biologisch, beispielsweise antimikrobiell wirksam werden. Diese biologische Wirksamkeit resultiert aus dem Übergang reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) aus der Plasma- in die Flüssigkeitsphase bzw. der sekundären Bildung von RONS in der Flüssigkeit infolge von Plasma-Flüssigkeits-Wechselwirkungen. Für derartige plasmabehandelte Flüssigkeiten werden auch medizinische Anwendungsmöglichkeiten diskutiert.⁷ Die Arbeitshypothese für die geplante Teilaufgabe in diesem Projekt war, dass eine DBE-Plasmabehandlung eines Aerosols zu einem analogen Übergang bzw. zur Bildung von RONS in den Aerosoltröpfchen führt, woraus eine entsprechende biologische Wirksamkeit des Aerosols resultiert, die gegebenenfalls stärker als die entsprechende Wirksamkeit von plasmabehandelter Luft ist. Die grundsätzliche Möglichkeit einer solchen Plasma-Aerosol-Wechselwirkung ist unstrittig.⁸ Ein Teilziel des Projektes war es daher, die methodischen Grundlagen für eine systematische Untersuchung von Plasma-Aerosol-Wechselwirkungen im INP zu schaffen und ein solches Aerosol für die

⁷ F. Tampieri et al., Plasma Process. Polym. 20 (2023) e2300077, DOI:10.1002/ppap.202300077; T. von Woedtke et al., Plasma Process. Polym. 22 (2025) e2400255, DOI:10.1002/ppap.202400255

⁸ A. Stancampiano et al., Appl. Sci. 9 (2019) 3861; DOI:10.3390/app9183861; M. Janda et al., Plasma Process. Polym. 22 (2025) e2400275, DOI:10.1002/ppap.202400275

Behandlung des oberen Respirationstraktes zu optimieren. Nachdem der erste Ansatz des DBE-behandelten Aerosols im Rahmen der Projektbearbeitung nicht zielführend war, wurden die wissenschaftlichen Untersuchungen dazu separat fortgeführt. Für diese Arbeiten wurde insbesondere die neunmonatige kostenneutrale Verlängerung des Projektes genutzt.

Für ein plasmabehandeltes Aerosol ist insbesondere im Hinblick auf die beabsichtigte Anwendung im Respirationstrakt und die Applikation der in der Flüssigkeit enthaltenen Wirkspezies vor allem der Größe und das Verteilungsprofil der Aerosol-Tröpfchen von Bedeutung. Darüber hinaus gilt es, die in den Aerosol-Tröpfchen erzeugten chemischen Verbindungen zu charakterisieren und unter verschiedenen Behandlungsbedingungen zu vergleichen. Für diese Untersuchungen, insbesondere die Charakterisierung reaktiver Spezies in den Aerosol-Tröpfchen, standen zu Projektbeginn keine Untersuchungsmethoden im INP zur Verfügung.

Der Aufbau einer optischen Methode zur Detektion der Partikelgrößenverteilung und deren Anwendung im Rahmen der Entwicklung und Optimierung der DBE-Plasmaquelle wurde bereits beschrieben (siehe Abschnitt II.1.2). Im Zwischenbericht zum Berichtsjahr 2022 wurden erste Ergebnisse zur Optimierung der Aerosolverteilung vorgestellt. Um den weiteren Methodenaufbau von Beginn an unabhängig vom Entwicklungsfortschritt der DBE-Plasmaquelle vorantreiben zu können und insbesondere ein Verfahren für die Speziesdetektion in den Aerosol-Tröpfchen aufzubauen, wurde zunächst ein Testsystem entwickelt und erprobt, mit dem eine Aerosolbehandlung unter Verwendung des bekannten und bewährten, mit Argon betriebenen Atmosphärendruckplasmajets kINPen realisiert werden konnte. Der kINPen ist für derartige erste Untersuchungen zur Aerosolbehandlung von Vorteil, da er hinsichtlich seiner Gas- und Flüssigkeitschemie als auch im Hinblick auf das elektrische Verhalten sehr gut charakterisiert ist.⁹ Ein separater Aerosolgenerator und der kINPen wurden parallel zueinander in einer Kammer angeordnet (Abbildung 36). In der Kammer wurde Druckluft mit einer Durchflussrate von 3 slm von der Seite eingeleitet, um die Aerosole in Richtung des Plasmaaustrittsbereichs zu drücken. Der für den kINPen-Betrieb verwendete Argon-Arbeitsgasfluss betrug 3 slm. Für den Aerosolgenerator, bei dem es sich um eine kommerzielle Sprühdüse der Firma SinapTec handelte, wurde Phosphatpuffer (ohne Kochsalzlösung) als flüssiges Medium mit einer Durchflussrate von 1 l/min für die Aerosolerzeugung verwendet.

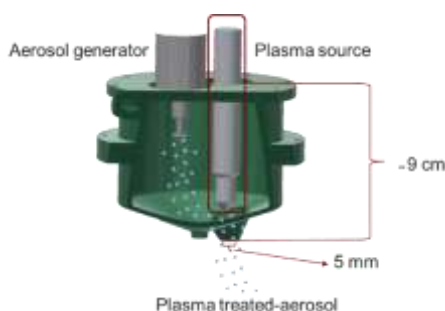


Abbildung 36: Versuchsaufbau zur Behandlung eines Aerosols mit dem Atmosphärendruckplasmajet kINPen

⁹ S. Reuter et al., J. Phys. D: Appl. Phys. 51 (2018) 233001, DOI:10.1088/1361-6463/aab3ad

Um die optimale Position des Plasmajets für eine maximale Aerosolbehandlung und Sammlung des Aerosols zu bestimmen, wurde seine vertikale Position in der Kammer von 0 bis 50 mm variiert. Die Masse der am Ausgang der Kammer gesammelten Aerosole wurde unter drei verschiedenen Bedingungen gemessen: ohne Argon-Gasfluss und ohne gezündetes Plasma, mit Argon-Gasfluss, aber ohne Plasmazündung und sowohl mit Argon-Gasfluss als auch mit Plasmazündung. Die Ergebnisse zeigten, dass die Positionierung des Plasmajets bei 40 oder 50 mm die Aerosolsammlung maximierte, insbesondere wenn der Argon-Gasfluss und die Spannung abgeschaltet waren. Angesichts der Stabilität der gesammelten Aerosolmasse in der 40-mm-Position wurde diese Anordnung für die nachfolgenden Experimente beibehalten.

Zur Untersuchung der Größenverteilung der Aerosole kam ein Shadowgraph-Verfahren zur Anwendung (siehe auch Abschnitt II.1.2, Abbildung 15). Dabei wurde der Aerosolpfad mit einer Blitzlampe beleuchtet und Bilder mit einer an einem Quester-Mikroskopobjektiv befestigten Kamera aufgenommen (Abbildung 37).

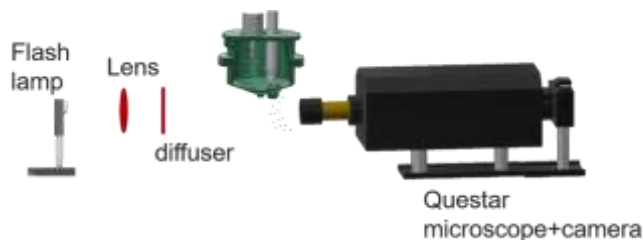


Abbildung 37: Shadowgraph-Testaufbau zur Bestimmung der Aerosol-Tröpfchen-Größenverteilung

Die Bilder mit einer Auflösung von $0,38 \mu\text{m}/\text{px}$ wurden mit einem Python-Programm analysiert, um die Größenverteilung unter verschiedenen Bedingungen zu bestimmen: bei ausgeschaltetem Argon-Gasfluss und ausgeschalteter Spannung, bei eingeschaltetem Argon-Gasfluss und ausgeschalteter Spannung sowie bei eingeschaltetem Argon-Gasfluss und eingeschalteter Spannung zur Plasmaerzeugung. Der Spitzenwert der Aerosol-Tröpfchen-Größenverteilung lag unter allen Bedingungen zwischen 20 und $30 \mu\text{m}$. Die Aktivierung des Gasflusses verbreiterte die Größenverteilung und die Zündung des Plasmas verlängerte sie leicht (Abbildung 38).

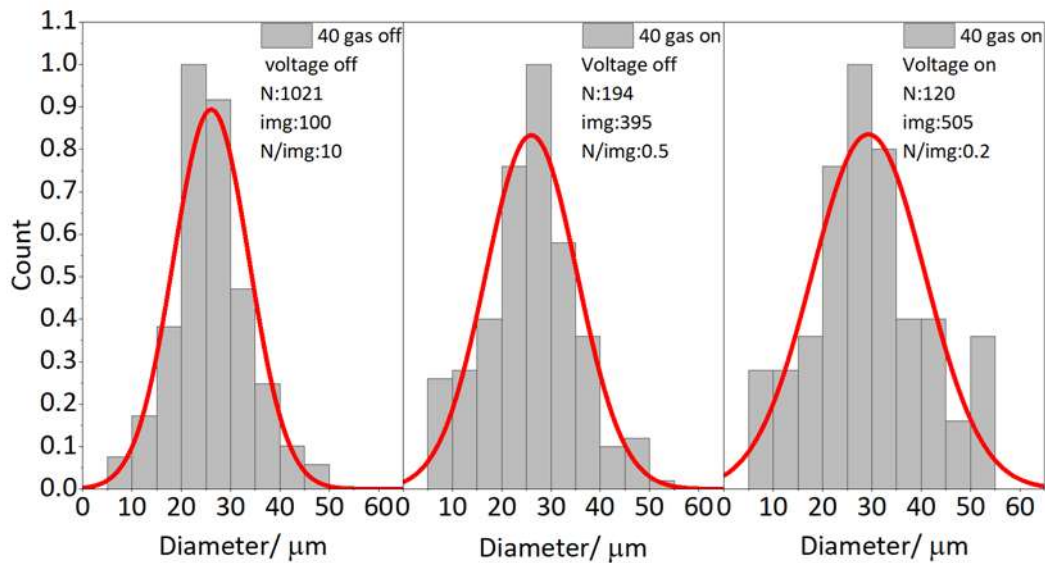


Abbildung 38: Größenverteilung der Aerosol-Tröpfchen bei 40-mm-Positionierung des Plasmajets in der Aerosol-Behandlungskammer unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. (N: Anzahl der für die statistische Auswertung berücksichtigten, detektierten Aerosol-Tröpfchen, img: Anzahl der für die statistische Auswertung berücksichtigten Bilder, N/img: Anzahl der detektierten Aerosol-Tröpfchen pro Bild)

Um die chemischen Veränderungen, d.h. die durch Plasmabehandlung in den Aerosoltröpfchen generierten reaktiven Spezies zu untersuchen, wurde der Farbstoff 2',7'-Dichlordihydrofluoresceindiacetat (H_2DCFDA) als Indikator für reaktive Sauerstoffspezies in einer Konzentration von $50 \mu\text{mol/l}$ in einem phosphatgepufferten Lösungsmittel verwendet. Die aerosolisierte Farbstoff-Puffer-Lösung wurde einer Plasmabehandlung unterzogen um zu untersuchen, ob das Plasma chemische Reaktionen innerhalb des Aerosols auslösen kann. Es wurden drei Varianten untersucht: eine Kontrollprobe der nicht aerosolisierten Flüssigkeit, eine aerosolisierte Probe ohne Plasmabehandlung und schließlich eine aerosolisierte Probe, die mit Plasma behandelt wurde. Die Fluoreszenzintensität dieser Proben wurde mit einem Plattenlesegerät gemessen, das auf eine Anregungswellenlänge von 495 nm und eine Emissionswellenlänge von 521 nm eingestellt war, mit einem Probenvolumen von $100 \mu\text{l}$ und einer Aerosol-Sammelzeit von 5 min . Das Experiment wurde dreimal wiederholt. Die Ergebnisse zeigten einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität in den mit Plasma behandelten Aerosolproben, was darauf hindeutet, dass die Plasmabehandlung chemische Veränderungen in der Flüssigkeit auslöste (Abbildung 39).

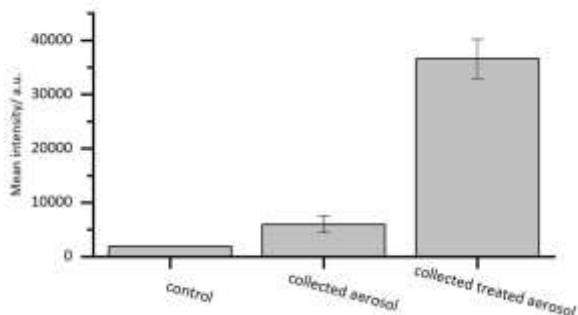


Abbildung 39: Fluoreszenz-Intensität von mit Plasma behandelten und nicht behandelten Aerosolen

Um die Mechanismen der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies in den Aerosoltröpfchen weiter aufzuklären, wurde ein weiterer experimenteller Messaufbau realisiert (Abbildung 40).

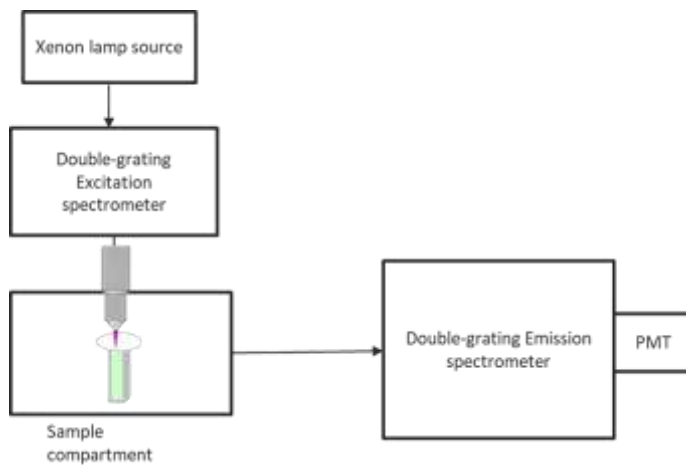


Abbildung 40: Schematischer Aufbau des verwendeten Fluoreszenzspektrometers inklusive des Testaufbaus in der Probenkammer zur Untersuchung des Einflusses von VUV- bzw. UV-Strahlung bei der Bildung reaktiver Spezies in der Flüssigkeit durch Plasmabehandlung

Ein MgF_2 - und ein Quarz-Fenster wurden über einer mit der H_2DCFDA -Lösung gefüllten Küvette platziert, um die Auswirkungen der verschiedenen vom Plasma abgegebenen Strahlungsarten zu trennen. Das MgF_2 -Fenster ließ sowohl VUV- als auch UV-Strahlung durch, während das Quarzfenster nur UV-Strahlung durchließ. Diese Anordnung diente dazu, die spezifische, vom Plasma emittierte Strahlung zu bestimmen, die möglicherweise für die chemischen Veränderungen in der Flüssigkeit verantwortlich ist. Der Plasmajet wurde 15 min vor Beginn der Messung aktiviert, wobei ein Abstand von 5 mm zum Fenster eingehalten wurde.

Die Fluoreszenz-Messung erfolgte über ca. 110 min kontinuierlich mit einem Photomultiplier-Detektor. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität unter allen Testbedingungen deutete darauf hin, dass der Strahlungsanteil des Plasmas tatsächlich eine Fluoreszenzreaktion des Farbstoffs auslösen konnte. Daraus ergab sich die Hypothese, dass die durch Plasmabehandlung induzierte Fluoreszenz hauptsächlich auf die energiereichere VUV-Strahlung und nicht auf den UV-Bereich zurückzuführen war (Abbildung 41).

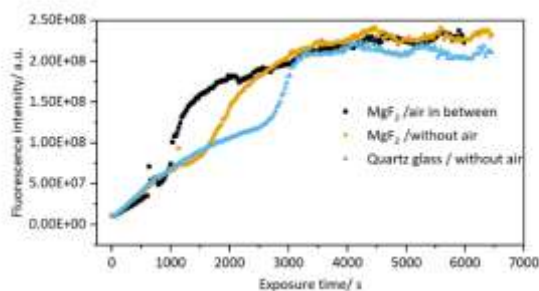
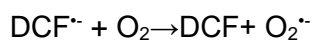
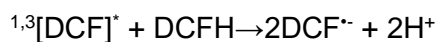
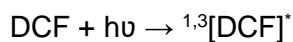


Abbildung 41: Fluoreszenzmessung in Flüssigkeit in Abhängigkeit von der Einwirkung plasmagenerierter VUV- bzw. UV-Strahlung

Es war anhand dieser Ergebnisse jedoch nicht zu entscheiden, ob die Fluoreszenz durch aufgrund der Strahlungseinwirkung in der Flüssigkeit gebildete reaktive Sauerstoffspezies induziert wurde oder durch eine direkte Wechselwirkung des Farbstoffes mit der absorbierten Strahlung. Dies gab Anlass, den Mechanismus einer möglichen Photooxidation des Farbstoffs aufgrund der Photoneneinwirkung weiter zu untersuchen.

Der Photooxidationsprozess wird durch folgende Reaktionsgleichungen veranschaulicht, die zeigen, wie sich der Farbstoff durch einen autokatalytischen Prozess selbst verstärken kann, wenn er Photonen im Wellenlängenbereich von 300 bis 500 nm (dem Absorptionspeak von DCF) ausgesetzt wird:



Dies könnte aufgrund der Selbstproduktion des Farbstoffs in Gegenwart von Licht zu einem falsch positiven Ergebnis führen. Eine Studie zeigte jedoch, dass die Zubereitung der Farbstofflösung in einem niedrigen sauren pH-Bereich den Photooxidationseffekt abschwächen kann.¹⁰ Diese Aussage wurde bei verschiedenen pH-Werten (pH: 6,5, pH: 5, pH: 2,1) überprüft, wobei sich ergab, dass bei einem stark sauren pH-Wert von 2,1 die Fluoreszenz tatsächlich deutlich reduziert war (Abbildung 42).

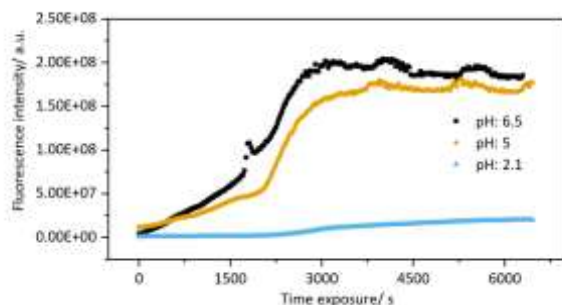


Abbildung 42: Einfluss des pH-Wertes auf die H₂DCFDA-Fluoreszenz nach Einwirkung plasmagenerierter VUV- bzw. UV-Strahlung

Dies war ein deutlicher Hinweis darauf, dass die beobachtete Fluoreszenzreaktion in H₂DCFDA-Lösung nach Einwirkung von plasmagenerierter VUV- bzw. UV-Strahlung möglicherweise nicht auf plasmagenerierte reaktive Spezies, sondern auf eine Photooxidation des Farbstoffes zurückzuführen war.

Weitere Experimente bei saurem pH und Plasmaeinwirkung durch MgF₂- und Quarz-Fenster (nur VUV- bzw. UV-Strahlung) sowie nach direkter Plasmabehandlung ohne Fenster zeigten jedoch, dass der Farbstoff trotz der Verringerung des Photooxidationseffekts durch pH-Absenkung bei direkter Plasmaeinwirkung ohne Fenster empfindlich auf reaktive Spezies

¹⁰ D. Yu et al., Sensors and Actuators B: Chemical 339 (2021) 129878, DOI:10.1016/j.snb.2021.129878

reagierte, was auf seine Funktionalität bei der Erkennung von durch Plasmabehandlung induzierten chemischen Veränderungen hinwies (Abbildung 43).

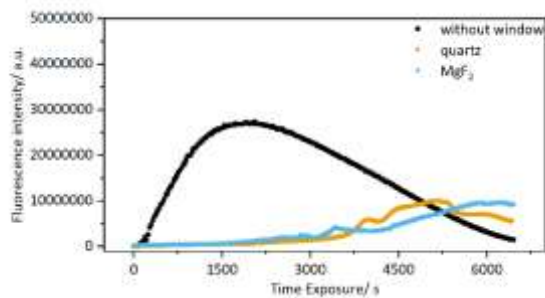


Abbildung 43: H₂DCFDA-Fluoreszenz bei saurem pH nach Einwirkung von plasmagenerierter VUV- bzw. UV-Strahlung allein sowie nach direkter Plasmaeinwirkung (ohne Fenster)

Damit konnte im Ergebnis des Projektes eine Methode aufgebaut werden, die – wenn auch mit Einschränkungen – ermöglicht, eine Bildung reaktiver Sauerstoffspezies infolge Plasmabehandlung direkt im Aerosol zu detektieren.

Eine Anwendung dieser Messmethodik zur weiteren Optimierung der Parameter der DBE-basierten Plasmabehandlung von Aerosolen (Tröpfchengröße, Behandlungszeit, Einwirkungszeit etc.) zur Erzielung nutzbarer antimikrobieller und vor allem antiviraler Effekte war im Rahmen der Projektlaufzeit nicht mehr möglich und muss weiteren Forschungsarbeiten vorbehalten bleiben. Die im Rahmen des Projektes erzielten methodischen Fortschritte bilden eine sehr gute Grundlage, dass sich das INP auf dem Gebiet der Untersuchung von Plasma-Aerosol-Wechselwirkungen zukünftig weiter profilieren kann. Über die therapeutische Anwendung im Respirationstrakt hinaus sind Anwendungen plasmabehandelter Aerosole zur Desinfektion und Infektionsprävention sowie auf dem Gebiet der Lebensmittelhygiene hochaktuell.

II.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Im Rahmen des Gesamtprojektes „PlasmaplusCorona – PPC“ wurden im Teilprojekt PPC-INP zwei kalte Atmosphärendruckplasmaquellen bereitgestellt und *in vitro* charakterisiert, die für eine antiinfektive Behandlung des oberen Respirationstraktes geeignet sind.

Mit dem neongetriebenen Mikroplasmajet konnte auf ein bereits vorhandenes Plasmaquellenkonzept zurückgegriffen werden. Im Rahmen des Projektes wurde diese Plasmaquelle so optimiert, dass sie in den Laboratorien der Verbundpartner FZB und LIV selbständig betrieben werden konnte. Das in diesem Zusammenhang erstellte, validierte und publizierte Testkonzept zur reproduzierbaren und vergleichbaren Charakterisierung von Jet-Plasmaquellen ist grundsätzlich auch auf andere Plasmaquellen übertragbar und kann zukünftig für eine Qualitätskontrolle bei der Herstellung von Klein-Geräteserien im Labormaßstab weiter angewendet werden. Auf der Basis der Arbeiten des INP konnte mit dem Mikroplasmajet im Gesamtverbund mit den Projektpartnern erstmalig ein *Proof-of-concept* für die Anwendbarkeit einer plasmabasierten antiinfektiven Behandlung des Respirationstraktes vorgelegt werden, welches den Nachweis der Verringerung klinischer

Infektionssymptome *in vivo* an einem Tiermodell einschließt. Damit wurden die Grundlagen für die Erschließung eines neuen Anwendungsfeldes der Plasmamedizin gelegt.

Mit dem Mikroplasmajet ist eine direkte lokale Plasmabehandlung der Schleimhaut des oberen Respirationstraktes, insbesondere des Mund-Rachenraumes möglich. Die Grenzen des Verfahrens liegen in der mangelnden Erreichbarkeit schwer zugänglicher Bereiche und im zeitlichen Aufwand, da zur Gewährleistung einer angemessenen Einwirkungszeit die Schleimhautoberfläche sukzessive mit dem Plasmajet abgefahren werden muss.

Als Alternative wurde im Projekt eine auf einer dielektrisch behinderten Entladung (DBE) basierende Plasmaquelle konzipiert und konstruiert, die eine Plasmabehandlung von Luft oder einem Aerosol ermöglicht, welches unmittelbar anschließend im oberen Respirationstrakt appliziert werden und sich dort verteilen kann. Hierfür musste ein neues technisches Plasmaquellenkonzept erarbeitet werden. Im Ergebnis des Projektes liegt eine Plasmaquelle vor, die die Behandlung von trockener und angefeuchteter Luft sowie eines Aerosols ermöglicht und die ebenfalls für weitere experimentelle Arbeiten bei den Verbundpartnern einsatzbereit ist.

Damit steht ein auf der Wirkung von kaltem Atmosphärendruckplasma basierendes Gerät bzw. Verfahren zur Verfügung, welches perspektivisch zu einem Medizinprodukt zur lokalen Behandlung des Respirationstraktes von infizierten Personen weiterentwickelt werden kann, um damit einen Ausbruch der Erkrankung zu verhindern bzw. deren Auswirkungen zu reduzieren und eine Weiterverbreitung des Virus durch die infizierte Person einzudämmen.

Aufgrund des hohen Test- und Optimierungsaufwandes bei beiden Plasmaquellenkonzepten sowie einem hohen Aufwand an notwendigen Genehmigungsverfahren bei den Projektpartnern FZB und LIV zur Ermöglichung der Verwendung der Plasmageräte in deren Laboratorien sowie der Einholung der Genehmigungen für Tierexperimente am LIV konnte mit der DBE-basierten Plasmaquellen im Rahmen der Projektlaufzeit keine *In-vivo*-Validierung des Verfahrens realisiert werden.

Aus dem gleichen Grund wurden in Abweichung von der ursprünglichen Planung im Rahmen der Projektlaufzeit keine Untersuchungen an SARS-CoV-2 durchgeführt. Es wurden alle Untersuchungen mit repräsentativen Modellviren durchgeführt, die keine S3-Laborbedingungen erfordern, aber dennoch die angestrebten wissenschaftlichen Aussagen ermöglichen. Auf der Grundlage des aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstandes ist auf der Basis der vorgelegten Ergebnisse von einer Wirksamkeit der getesteten Methoden auch gegen SARS-CoV-2 auszugehen.

Im INP wurden im Rahmen des Projektes Testmethoden zur Bestimmung der antiviralen Wirksamkeit von kalten Atmosphärendruckplasmaquellen etabliert und optimiert. Damit wurde über die unmittelbare Arbeit im Projekt hinaus das Methodenspektrum zur Testung der biologischen Wirksamkeit von Plasmaquellen um einen wichtigen und in der Vergangenheit von Auftraggebern und Kooperationspartnern wiederholt nachgefragten Aspekt erweitert, der nunmehr dauerhaft zur Verfügung steht.

In der Gesamtvorhabensbeschreibung wurden vier Zielparameter für die Erreichung der technischen und wissenschaftlichen Arbeitsziele des Gesamtverbundes definiert:

1. Bereitstellung optimierter Plasmaquellenkonzepte für die präklinische *In-vitro*- und *In-vivo*-Testung auf antivirale Wirksamkeit im Respirationstrakt (INP)
2. Erfolgreiche experimentelle Anwendung des auf der Air-Liquid-Interface (ALI)-Kultur menschlicher Atemwegsepithelzellen basierenden Infektionsmodells zur Untersuchung plasmabasierter Behandlungsverfahren *in vitro* (FZB)
3. Evaluierung der antiviralen Wirksamkeit und Verträglichkeit der plasmabasierten Behandlung des Respirationstraktes im infektiösen SARS-CoV-2-Hamstermodell (LIV)
4. Bereitstellung von mindestens einem wirksamen und verträglichen plasmabasierten Verfahren zur antiinfektiösen Behandlung des Respirationstraktes für die Weiterentwicklung zu einem Medizinprodukt (Ergebnis Gesamtverbund)

Der überwiegend in der Verantwortung des INP liegende Zielparameter 1 konnte vollständig erfüllt und damit die Voraussetzungen geschaffen werden, auch die anderen Zielparameter vollständig (Zielparameter 2) bzw. weitestgehend (Zielparameter 3 und 4) zu erfüllen.

Das bedeutendste Gesamtergebnis des Projektes ist, dass mit den im Verbund erarbeiteten Ergebnissen erstmalig ein *Proof-of-concept* der Anwendbarkeit plasmabasierter antiinfektiöser Behandlungsverfahren im Respirationstrakt vorgelegt werden konnte.

II.2 Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die bewilligten Projektmittel in Höhe von 1.163.738,65€ wurden vollumfänglich im Rahmen des Vorhabens eingesetzt. Der größte Anteil wurde wie auch geplant für Personalkosten aufgewendet. Zudem wurden Mittel für Verbrauchsmaterialien und Dienstreisen eingesetzt.

II.3 Darstellung der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Greifswald hat sich unter Federführung des INP in den vergangenen Jahren zu einem international sichtbaren und wirksamen Forschungsstandort auf dem neuen Forschungsgebiet Plasmamedizin etabliert. Dies war insbesondere möglich durch die langjährige Förderung des am INP etablierten Zentrums für Innovationskompetenz (ZIK) „*plasmatis* – Plasma plus Zelle“ durch das BMBF. Mit dem ZIK *plasmatis* wurde am INP eine exzellente personelle und methodische Expertise, flankiert durch eine hochmoderne technische Ausstattung aufgebaut und etabliert, mit der sich das INP eine international sichtbare wissenschaftliche Führungsposition auf dem Gebiet der Plasmamedizin erworben hat. Schwerpunkt der Arbeiten war zunächst die Anwendung kalter Atmosphärendruckplasmen bei der Wundheilung; hier ist eine Einführung dieser innovativen Therapieoption in die klinische Praxis bereits erfolgt. Ein gegenwärtiger umfangreicher Forschungsschwerpunkt ist die Plasmaanwendung in der Krebstherapie; hier werden erste klinische Anwendungen für die nahe Zukunft als realistisch angesehen. Ein weiteres Forschungsfeld ist die Anwendung von Kaltplasma in der Zahnmedizin.

Da die Plasmamedizin auch international eine relative neue Therapieoption darstellt, ist die Prüfung und Erschließung weiterer medizinischer Anwendungsfelder eine weiterhin aktuelle Aufgabe. Das INP spielt mit seinen langjährigen Erfahrungen auf dem Gebiet der Entwicklung medizinischer Plasmaquellen und deren Überführung in die industrielle Produktentwicklung und -vermarktung einerseits und die klinische Anwendung andererseits hier nach wie vor eine wichtige Rolle.

Stimuliert durch die SARS-CoV-2-Pandemie zu Beginn dieses Jahrzehnts geriet der obere Respirationstrakt als Ort der Infektion und Übertragung von Viren und anderen Infektionserregern in den Mittelpunkt des medizinischen und wissenschaftlichen Interesses. Mit der beträchtlichen Anzahl von COVID-19-Patienten, die intensivmedizinisch beatmet werden mussten, wuchs zudem das Bewusstsein für die lebensbedrohliche beatmungsassoziierte Pneumonie, die durch verschiedene pathogene Bakterien verursacht wird. Da die Therapie mit Antibiotika, Virustatika und Immuntherapeutika insbesondere aufgrund bakterieller Resistenzen und Veränderungen von Viren durch Mutationen an Grenzen kommt, ist die Suche nach alternativen Therapieoptionen eine aktuelle Herausforderung.

Bereits kurz nach dem Ausbruch der Covid-19-Pandemie wurde physikalisches Plasma als eine mögliche Option zur Unterstützung der Therapie und Infektionsprävention bei viralen Pandemien diskutiert.¹¹ Aus langjährigen Forschungen ist die effektive antimikrobielle, aber auch antivirale Wirksamkeit sowohl von kaltem Atmosphärendruckplasma selbst als auch von plasmabehandelten Flüssigkeiten bekannt. Das INP hat zu diesem wissenschaftlichen Erkenntnisstand wesentliche Beiträge geliefert.

Damit war es naheliegend, die Forschungsarbeiten des INP auch auf das innovative und hochaktuelle Gebiet der antiinfektiven Plasmabehandlung des Respirationstraktes auszudehnen. Im Rahmen des Projektes „PlasmaplusCorona – PPC“ wurden dafür wesentliche technische und wissenschaftliche Grundlagen geschaffen. Mit den Leibniz-Instituten FZB und LIV konnten Forschungspartner gewonnen werden, die die präklinische und klinische Expertise auf dem Gebiet von infektiösen Erkrankungen des Respirationstraktes sowie der Virologie mitbringen, die unbedingt erforderlich ist, um technische Innovationen wie die Anwendung kalter Atmosphärendruckplasmen auch tatsächlich medizinisch nutzbar zu machen.

Um dieses für alle drei Verbundpartner neue medizinische Anwendungsfeld für Plasmaquellen effektiv zu erschließen, bedurfte es jedoch zusätzlicher finanzieller und materieller Kapazitäten, die mit der Förderung des Projektes bereitgestellt wurden.

Für die Konzeption, den Bau und die physikalische Charakterisierung der Plasmaquellen konnte im INP auf langjährige Erfahrungen zurückgegriffen werden, die für das spezielle Anwendungsfeld nutzbar gemacht wurden. Die am INP vorhandene labortechnische Ausstattung und methodische Expertise konnte weitestgehend genutzt werden, so dass vor

¹¹ S. Bekeschus et al., IEEE Trans. Rad. Plasma Med. Sci 4 (2020) 391-399 2020, DOI:10.1109/TRPMS.2020.3002658; N. Misra et al. Plasma Process. Polym. 18 (2021) e2000215, DOI:10.1002/ppap.202000215

allem personelle Kapazitäten für die Projektbearbeitung bereitgestellt werden mussten. Insbesondere die Ergebnisse zur vergleichenden Charakterisierung und Bewertung des Mikroplasmajets, die in diesem Projekt erzielt wurden, um am INP sowie bei den Projektpartnern stabil und reproduzierbare arbeitende Plasmaquellen zur Verfügung zu haben, lassen sich auch auf andere Plasmaquellenkonzepte anwenden. Damit liegt ein neues Testkonzept vor, das zukünftig für eine Qualitätskontrolle bei der Herstellung von Klein-Geräteserien im Labormaßstab auch für den Technologietransfer in industrielle Plasmaquellenentwicklungen weiter nutzbar gemacht werden kann.

Mit der Bereitstellung zweier im Wirkungsprinzip und im Hinblick auf die Applikation unterschiedlicher Plasmaquellenkonzepte und deren anwendungsbezogene Erforschung bei Kooperationspartnern mit spezieller Expertise auf dem Gebiet der Lungenerkrankungen und der Virologie wurden wichtige Grundlagen für die Anwendung plasmamedizinischer Behandlungskonzepte im Respirationstrakt geschaffen, die zukünftig unter möglicher Beteiligung von Industriepartnern zur Entwicklung von anwendungsspezifischen Medizinprodukten führen können. Dieser Entwicklungsstand wäre ohne die Projektförderung nicht oder nur mit deutlicher zeitlicher Verzögerung erreichbar gewesen.

Darüber hinaus hat das INP mit dem Aufbau, der Etablierung und Optimierung zweier Testmodelle zur Untersuchung der antiviralen Wirksamkeit von kalten Atmosphärendruckplasmaquellen sein umfangreiches Portfolio biologischer Testverfahren um eine wichtige Komponente erweitert. Über die in diesem Projekt im Mittelpunkt stehende therapeutische Plasmaanwendung ist das Thema Virusinaktivierung auch auf dem Gebiet der Lebensmittel- und Umwelthygiene relevant und wurde in der Vergangenheit wiederholt nachgefragt.

II.4 Darstellung des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere die Verwertbarkeit der Ergebnisse – auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft – im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplanes

Die Anwendung von auf kaltem Atmosphärendruckplasma basierenden Geräten bzw. Verfahren zur Behandlung des Respirationstraktes ist ein innovatives Gebiet und erweitert die Möglichkeiten der Plasmamedizin. Die in diesem Projekt fokussierte Therapie von SARS-CoV-2-Infektionen bzw. COVID-19-Erkrankungen stellt nur einen – derzeit besonders aktuellen – Anwendungsfall dar. Die bisher vorliegenden Ergebnisse des Projektpartners LIV, der die tierexperimentelle *In-vivo*-Validierung zunächst mit einem Influenza-Infektionsmodell durchgeführt hat, belegen die Anwendbarkeit auch auf andere Infektionserreger des Respirationstraktes. Damit eröffnen sich weitere Möglichkeiten für anwendungsorientierte Forschungsprojekte gemeinsam mit den derzeitigen, aber auch mit neuen Verbundpartnern, vor allem Industriepartnern.

Auf der Basis des mit dem Projekt „PlasmaplusCorona – PPC“ erreichten Forschungs- und Entwicklungsstandes können zwei Forschungsrichtungen – gegebenenfalls parallel – verfolgt werden.

Zum einen ist auf der Basis der DBE-Plasmaquelle zu Behandlung von (angefeuchteter) Luft eine Weiterentwicklung dieses Quellenkonzeptes und seine technische Anpassung und Integration in medizinische angewendete Beatmungssysteme anzustreben. Dafür ist eine Kooperation mit einschlägigen Industriepartnern erforderlich, die einerseits auf dem Gebiet der Beatmungstechnik, andererseits auf dem Gebiet der Entwicklung und Herstellung von Plasmaquellen tätig sind. Hierfür sind im Anschluss an das Projekt geeignete Partner sowie Finanzierungsmöglichkeiten zu erschließen.

Zum anderen bilden die erzielten Ergebnisse sehr gute Voraussetzungen für weitere anwendungsorientierte Forschungsprojekte. So ist eine Erweiterung der Forschung zur Plasmawirksamkeit auf andere bakterielle und virale Infektionen der Atemwege (z.B. Influenza) sowie der Mundhöhle (z.B. Schleimhautmykosen) vorgesehen. Hier können die bereits im Projekt PPC mitarbeitenden Verbundpartner FZB und LIV ihre spezielle Expertise umfassend einbringen. Es ist geplant, auch im Hinblick auf weitere Partner und Fördermöglichkeiten, die Kontakte und Netzwerke der Leibniz-Forschungsverbände „Gesundheitstechnologien“, in dem INP und FZB Mitglied sind sowie „INFECTIONS in an Urbanizing World - Humans, Animals, Environments“, in dem FZB und LIV Mitglied sind, zu nutzen.¹² Wichtige Voraussetzung für die Einwerbung entsprechender Forschungsprojekte ist die weitere Publikation der Forschungsergebnisse aus dem Projekt PPC, insbesondere der Resultate, die mit den Infektionsmodellen der Verbundpartner FZB und LIV gewonnen wurden. Dies wird auch nach Beendigung des Projektes von allen drei Projektpartnern schnellstmöglich angestrebt.

Schließlich geben die vorliegenden Ergebnisse auch wichtige Impulse für weitere Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Plasmamedizin. Von Beginn an war neben der Überführung von Plasmaquellenkonzepten in die industrielle Weiterentwicklung und medizinische Anwendung die Grundlagenforschung zu den Mechanismen biologischer Plasmaeffekte ein wesentlicher Aspekt dieses neuen Forschungsfeldes. So konnten in den vergangenen Jahren Mechanismen der Wechselwirkung mit Säugetierzellen und in gewissem Umfang auch mit Bakterien bzw. Pilzen umfassend aufgeklärt werden. Größerer Forschungsbedarf besteht jedoch noch bei der Untersuchung der Mechanismen antiviraler Plasmawirkungen. Dies liegt einerseits daran, dass hier – anders als bei Säugetierzellen und Bakterien – keine Beeinflussungen zellulärer Stoffwechsel- und Signalprozesse durch plasmagenerierte reaktive Spezies (vor allem RONS) ursächlich sein können. Andererseits ist auch aufgrund der deutlich aufwendigeren Kultivierungs- und Nachweismethoden für Viren die Zahl der auf diesem Gebiet tätigen plasmamedizinischen Arbeitsgruppen begrenzt. Diese Expertise konnte im INP im Rahmen des Projektes auf- und ausgebaut werden, so dass jetzt beste Voraussetzungen für weitere Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet bestehen, die durch weitere Kooperationen mit den Forschungspartnern FZB und LIV auch zukünftig konsolidiert werden können.

Mit der Etablierung von bisher zwei Testmethoden zur Untersuchung und der antiviralen Wirksamkeit von kalten Atmosphärenruckplasmen hat das INP sein einschlägiges Testspektrum um eine wesentliche, die seit Jahren etablierten Methoden zur Untersuchung der Wirkung von Plasma auf ein breites Spektrum an Mikroorganismen ergänzende und in den vergangenen Jahren wiederholt von Industriepartnern nachgefragte Komponente erweitert. Damit wird die Expertise des INP in der umfassenden Charakterisierung von Plasmaquellen und –geräten zur Anwendung in Medizin und Lebenswissenschaften deutlich ausgebaut. Dies eröffnet neue Möglichkeiten der gemeinsamen Forschung mit Industriepartnern im Rahmen von bilateralen und Verbundprojekten, womit das Einsatzspektrum kalter

¹² <https://www.leibniz-healthtech.de/>; <https://leibnizinfections.de/en/>

Atmosphärendruckplasmen nicht nur in Medizin und Hygiene, sondern beispielsweise auch in Landwirtschaft und Lebensmitteltechnologie erweitert und in entsprechenden Produktlösungen umgesetzt werden kann.

Zur Feststellung der Vergleichbarkeit der Funktionsparameter der einzelnen Exemplare der im INP angefertigten Labormuster der Jet-Plasmaquelle, die in verschiedenen Laboren auch bei den Verbundpartnern zum Einsatz kommen, wurden im Rahmen des Projektes ausführliche Untersuchungen zur Vergleichbarkeit von Prototypen der Plasmajets durchgeführt. Auf der Basis dieser multiparametrischen Charakterisierungen wurde ein Testkonzept zur reproduzierbaren und vergleichbaren Charakterisierung von Jet-Plasmaquellen erarbeitet, das auch zukünftig für eine Qualitätskontrolle bei der Herstellung von Klein-Geräteserien von Plasmaquellen im Labormaßstab geeignet ist und dem INP für weitere Arbeiten auf dem Gebiet der Plasmaquellenentwicklung und -testung sowie als wissenschaftliches Kooperationsangebot für externe Partner zur Verfügung steht.

Schließlich eröffnet die im Rahmen des Projektes aufgebaute Messmethodik zur Charakterisierung plasmabehandelter Aerosole Möglichkeiten weiteren der wissenschaftlichen Erschließung dieses ebenfalls relativ neuen Forschungsfeldes und ergänzt und erweitert die langjährige Forschungs- und Transfer-Expertise des INP auf dem Gebiet der plasmabehandelten Flüssigkeiten. Über die therapeutische Anwendung im Respirationstrakt hinaus sind Anwendungen plasmabehandelter Aerosole zur Desinfektion und Infektionsprävention sowie auf dem Gebiet der Lebensmittelhygiene hochaktuell.

Für die wissenschaftliche Anschlussfähigkeit sollen deshalb Fördermittelanträge an verschiedene Stiftungen und Institutionen gestellt werden, insbesondere beim Bundesministerium für Bildung und Forschung, dem Europäischen Fonds für Regionale Entwicklung sowie dem European Research Council. Für die in diesem Verbundprojekt zusammenarbeitenden Forschungsinstitute kommt darüber hinaus eine Förderung innerhalb der Leibniz-Gemeinschaft in Frage. Gespräche dazu laufen bereits im Rahmen des Leibniz-Forschungsverbundes Gesundheitstechnologien.

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

Bereits zum Zeitpunkt der Beantragung des Projektes „PlasmaplusCorona – PPC“ war bekannt, dass die Firma terraplasma medical GmbH Garching¹³ in einem Entwicklungsprojekt an einer technischen Lösung zur Applikation von Plasma im oberen Atemtrakt arbeitet, wobei das von dieser Firma 2019 auf den Markt gebrachte, auf einer Oberflächen-DBE beruhende Gerät plasma care®, ein CE-zertifiziertes Medizinprodukt zur Wundheilung, in Kombination mit einem entsprechenden Adaptersystem unter dem Namen „plasma intensive care (PIC)“ zur Anwendung kommen soll. Primäre Zielstellung dieser Anwendung ist die antiseptische Behandlung der oberen Atemwege beatmeter Patienten und damit die Verhinderung von Sekundärinfektionen. Das Konzept ist mittlerweile zum Patent angemeldet.¹⁴ Der Entwicklungsansatz dieser Firma zielt ausschließlich auf eine Anwendung plasmabehandelter

¹³ <https://www.terraplasma-medical.com/>

¹⁴ WO2022008684A1; EP3936176A1

Luft ab. Es gibt zwei Publikationen, in denen mit diesem System erhobene Forschungsergebnisse offengelegt sind. Die Publikation von Karrer et al. 2024¹⁵ konzentriert sich im Wesentlichen auf die zytotoxische *In-vitro*-Charakterisierung der mit dem Gerät generierten plasmabehandelten Luft. In einer weiteren Publikation von Reichold et al. 2025¹⁶ wird die Wirksamkeit des PIC-Konzeptes mit einem DBE-Plasma-behandelten Aerosol verglichen. Auch hier liegt der Fokus auf Untersuchungen der Zytotoxizität *in vitro*. Es sind bisher keine Resultate zur antimikrobiellen oder antiviralen Wirksamkeit bekannt. Hinweise zu dem System sind auf der Website der Firma aktuell nicht mehr direkt zu finden.

Zu nennen wäre weiterhin die Zusammenarbeit der Firma relyon Plasma GmbH Regensburg mit dem Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung Braunschweig mit dem Ziel, die Anwendbarkeit des MediPlas-Ozongenerators der Firma relyon zur Behandlung chronisch-entzündlicher Erkrankungen der Lunge zu untersuchen.¹⁷ Hier sind über die Pressemitteilung hinaus keine weiteren Ergebnisse bekannt.

Die Viomed Medical GmbH Pinneberg propagiert ein System PulmoPlas[®],¹⁸ mit dem offenbar in Kooperation mit der Medizinischen Hochschule Hannover die Anwendung von Kaltplasma zur Abtötung von Bakterien in den Atemwegen geprüft werden soll, um Ventilator-assoziierte Pneumonie (VAP) zu verhindern.¹⁹ Konkrete Ergebnisse aus diesen Studien sind bisher ebenfalls nicht bekannt.

2024 ist eine klinische Studie einer chinesischen Arbeitsgruppe zur Anwendung von in ein Aerosol überführtem plasmabehandeltem Wasser bei COVID-19-Patienten publiziert worden.²⁰

Alle genannten Aktivitäten betreffen prinzipiell plasmabasierte Verfahren zur Anwendung im Respirationstrakt und belegen einerseits die hohe Aktualität und Anwendungsrelevanz der Thematik. Andererseits ist das INP im Verbund mit dem FZB und LIV aufgrund der durch die drei Partner abgebildeten breiten und umfassenden Expertise und des verfügbaren Methodenspektrums von der Plasmaquellenentwicklung und -charakterisierung über die Verfügbarkeit von spezifischen *In-vitro*-Infektionsmodellen bis hin zu tierexperimentellen *In-vivo*-Studien wissenschaftlich und technologisch konkurrenzfähig auf diesem innovativen Anwendungsgebiet der Plasmamedizin.

Schließlich hat die Firma WK-MedTec GmbH Bückeberg ein Gerät Plasm[®]Heal auf den Markt gebracht, bei dem ein plasmabehandeltes Aerosol zum Einsatz kommt.²¹ Das Gerät ist allerdings für die Wundbehandlung, nicht für den Einsatz im Respirationstrakt bestimmt.

¹⁵ S. Karrer et al., Cells 13 (2024) 1411, DOI:10.3390/cells13171411

¹⁶ L.Z. Reichold et al., Int. J. Mol. Sci. 26 (2025) 255, DOI:10.3390/ijms26010255

¹⁷ <https://www.relyon-plasma.com/mediplas-ozongenerator-am-hzi/>

¹⁸ <https://www.viomed.de/pulmoplas/>

¹⁹ https://www.breath-hannover.de/news-medien/news/news-detailseite.html?tx_news_pi1%5Bnews%5D=816&cHash=803bcb3eec7ce3a8a8b9285da7031691

²⁰ Zhao et al., BMC Infectious Diseases 24 (2024) 960, DOI:10.1186/s12879-024-09886-w

²¹ <https://www.plasmoheal.com/>

II.6 Erfolgte und geplante Veröffentlichungen

Referierte Publikationen

- D.M. Mrochen, L. Miebach, H. Skowski, R. Bansemer, C.A. Drechsler, U. Hoffmann, M. Hein, U. Mamat, T. Gerling, U. Schaible, Th. von Woedtke, S. Bekeschus. Toxicity and virucidal activity of a neon-driven micro plasma jet on eukaryotic cells and a coronavirus. *Free Radic. Biol. Med.* 191 (2022) 105–118; DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2022.08.026
- Th. von Woedtke, G. Gabriel, U.E. Schaible, S. Bekeschus. Oral SARS-CoV-2 reduction by local treatment: a plasma technology application? *Plasma Process. Polym.* 20 (2023) e2200196; DOI:10.1002/ppap.202200196
- S. Bekeschus, H. Skowski, V. Hahn, R. Bansemer, T. Gerling, K.-D. Weltmann, T. von Woedtke. A fast and reliable microplate reader assay to assess the antiviral efficacy of cold plasma devices. *Plasma Process. Polym.* 21 (2024) e2400104; DOI:10.1002/ppap.202400104
- H. Jablonowski, U. Hoffmann, R. Bansemer, S. Bekeschus, T. Gerling, T. von Woedtke. Characterization and comparability study of a series of miniaturized neon plasma jets. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 57 (2024) 195202; DOI:10.1088/1361-6463/ad2566
- S. Iseni, T.M.C. Nishime, T. Gerling. Transition from afterglow to streamer discharge in an atmospheric capacitively coupled micro-plasma jet. *Appl. Phys. Lett.* 125 (2024) 203502; DOI:10.1063/5.0232114
- S. Bekeschus, M. Heuser, L. Miebach, M. Frank, T. von Woedtke, A. Schmidt. Viral inactivation of murine coronavirus via multiple gas plasma-derived reactive species. *Redox Biology* 82 (2025) 103591; DOI:10.1016/j.redox.2025.103591

Alle Publikationen (außer Iseni et al. 2024) sind frei zugänglich (open access). Mindestens zwei weitere Publikationen sind in Kooperation mit den Verbundpartnern in Planung bzw. bereits in Arbeit.

Weitere Publikationen

- R. Bansemer, D.M. Mrochen, L. Miebach, H. Skowski, C.A. Drechsler, U. Hoffmann, M. Hein, U. Mamat, T. Gerling, U. Schaible, S. Bekeschus, Th. von Woedtke. Antivirale Wirkung eines patientenverträglichen Atmosphärendruckplasmajets gegen Coronaviren. *WOMag - Kompetenz in Werkstoff und funktioneller Oberfläche* 12 (2023) No. 7-8, 16-17; https://www.wotech-technical-media.de/womag/ausgabe/2023/07-08/16_bansemer_adp_07-08j2023/16_bansemer_adp_07-08j2023.php

Konferenzbeiträge - Vorträge

- The Future of Redox Biology, Siena, Italy, 17.-19. Juni 2022 (<https://sfrr.org/past-sfrr-related-conferences>)
 - D.M. Mrochen, H. Skowski, R. Bansemer, C.A. Drechsler, M. Hein, U. Mamat, T. von Woedtke, S. Bekeschus. Toxicity and anti-coronavirus activity of a neon-driven micro plasma jet
- ICPM9 - 9th International Conference on Plasma Medicine, Utrecht, Niederlande, 27. Juni - 1. Juli 2022 (<https://www.aanmelder.nl/126611>)
 - K. Hadian, R. Rataj, H. Jablonowski, R. Bansemer, S. Bekeschus, R. Brandenburg, V. Hahn, D.M. Mrochen, T. von Woedtke, T. Gerling. Electrical and optical investigation of the long-term operation of an endoscopic plasma device
- 9th Central European Symposium on Plasma Chemistry (CESPC9) + COST Action CA19110 Plasma Applications for Smart and Sustainable Agriculture (PIAgri), Vysoké Tatry, Slovakia, 4.-9. September 2022 (https://plagri.eu/wp-content/uploads/2023/10/CESPC_PIAgri_Book_of_Abstracts.pdf)
 - M. Schmidt, V. Hahn, R. Rataj, U. Hoffmann, H. Skowski, S. Bekeschus, T. von Woedtke. Non-thermal plasma for generation of antimicrobial aerosol
- ICPM10 - 10th International Conference on Plasma Medicine together with IWPCT9 - 9th International Workshop on Plasma for Cancer Treatment, Portorož, Slowenien, 8.-13. September 2024 (https://f6-ge.ijs.si/icpm10/?page_id=1269):
 - H. Jablonowski, U. Hoffmann, R. Bansemer, K. Hadian Rasnani, M. Schmidt, R. Rataj, S. Bekeschus, T. Gerling, K.-D. Weltmann, T. von Woedtke. Establishing a set of measurements to monitor plasma source duplicates in collaborative groups through systematic investigation and correlation of parameters
 - T. von Woedtke, N. Mounogou Kouassi, S. Bekeschus, U. Hoffmann, R. Bansemer, T. Gerling, V. Hahn, H. Skowski, M. Schmidt, R. Rataj, K. Hadian Rasnani, H. Jablonowski, M. Hein, J. Akoh Arrey, U. Mamat, K.-D. Weltmann, U.E. Schaible, G. Gabriel. Local plasma jet application in the oral cavity to combat respiratory virus infections

Weitere Präsentationen von Ergebnissen sind auch nach offizieller Beendigung des Projektes „PlasmaplusCorona – PPC“ vorgesehen.