

Aus dem Institut für Biomedical Engineering
Abteilung für Medizintechnik und Regenerative Medizin

**Evaluierung der Raman-Mikrospektroskopie für das
Monitoring und die Bestimmung der funktionellen
Gewebeeindringtiefe der Behandlung mit
physikalischem Niedertemperaturplasma basierend auf
primärem und patientenspezifischem Gewebematerial**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Wenzel, Thomas Manfred

2022

Dekan: Professor Dr. Bernd Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. K. Schenke-Layland
2. Berichterstatter: Professorin Dr. D. Thorwarth
3. Berichterstatter: Professor D. B. Aydeniz

Tag der Disputation: 27.01.2022

Inhaltsverzeichnis	
Abbildungsverzeichnis	2
Tabellenverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	3
1 Einleitung	6
1.1 Zervix uteri	7
1.2 Zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN)	9
1.3 Niedertemperaturplasma	14
1.4 Raman-Effekt	18
1.5 True Component Analysis (TCA) und Principal Component Analysis (PCA)	21
1.5.1 Funktionsweise der TCA	21
1.5.2 Funktionsweise der PCA	23
1.6 Fragestellung	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Materialien	26
2.1.1 Chemikalien	26
2.1.2 Biologisches Material	27
2.1.3 Laborzubehör	28
2.1.4 Laborgerät	28
2.1.5 Software	29
2.2 Methoden	29
2.2.1 Probengewinnung und -behandlung	29
2.2.2 Schnitttherstellung	32
2.2.3 Raman-Mikrospektroskopie	33
2.2.4 Auswertung der Raman-Messungen	35
2.2.5 Histologie	40
3 Ergebnisse	42
3.1 Methodenetablierung	42
3.1.1 Vergleich der Konservierungsmethoden	42

3.1.2	Identifikation der Komponenten	45
3.1.3	Molekulare Unterschiede der Epithelschichten	48
3.1.4	Raman-gestützte Unterscheidung plasmabehandelter und Kontrollgewebe	51
3.1.5	Einflüsse durch Behandlungsdauer und Temperatur	52
3.1.6	Funktionelle Gewebepenetrationstiefe einer Plasmabehandlung mit APCIII und kINPen	54
3.2	Plasmaspezifische Effekte auf Morphologie und Struktur molekularer Gewebekomponenten	55
3.3	Plasma-spezifische Effekte auf molekulare Eigenschaften der analysierten Gewebekomponenten	59
3.3.1	Komponentenspezifische Effektivität der Plasmabehandlung (kINPen® und APCIII)	59
3.3.2	Korrelation von Messtiefen und Scores	64
3.3.3	Einfluss von Behandlungsdauer und Inkubationsdauer	65
3.3.4	Vergleich der Plasmaquellen	67
4	Diskussion	74
4.1	Plasmaquellen	75
4.2	Raman-Mikrospektroskopie	76
4.3	Analyse der Raman-Spektren	78
4.4	Analyse molekularer Effekte von Niedertemperaturplasmen	79
4.5	Bestimmung der Gewebepenetrationstiefe	85
4.6	Einfluss von Behandlungsdauer und Inkubationsdauer	89
5	Zusammenfassung	91
	Literaturverzeichnis	94
6	Anhang	106
7	Erklärung zum Eigenanteil	133
8	Veröffentlichungen	134
9	Danksagung	135

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Makroskopische und mikroskopische Einteilung des Zervixgewebes.....	8
Abbildung 2: Histologische Klassifikation der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN).	12
Abbildung 3: Auswirkung von physikalischem Plasma auf zelluläre Komponenten und Aufbau der Plasmageräte.....	17
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Raman-Effekts.....	19
Abbildung 5: Schemata zur True Component Analysis (TCA).	22
Abbildung 6: Prinzip der Principal Component Analysis (PCA).....	24
Abbildung 7: Schematischer Aufbau des Raman-Mikrospektroskops.....	35
Abbildung 8: Raman-Spektrum der frischen, unbehandelten Probe 002.	43
Abbildung 9: Evaluierung einer geeigneten Konservierungsmethode.....	44
Abbildung 10: Übersichtsdarstellung des zervikalen Epithels.	46
Abbildung 11: Identifizierung von superfizialen Gewebekomponenten.	47
Abbildung 12: Identifizierung von basalen Gewebekomponenten.....	48
Abbildung 13: Darstellung der Unterschiede zwischen superfizialer und basaler DNA in unbehandeltem Zervixgewebe mittels Raman-Mikrospektroskopie.	50
Abbildung 14: Detektion plasmaspezifischer DNA-Veränderung.	52
Abbildung 15: Einfluss von Behandlungsdauer und Temperatur während der Gewebebehandlung mit APCIII.	53
Abbildung 16: Ermittlung der Messtiefe.	55
Abbildung 17: Repräsentative TCA humaner Gewebeproben nach Behandlung mittels kINPen® und APCIII.	57
Abbildung 18: Vergleich der mean grey values (MGVs).	58
Abbildung 19: Relative Effekte einer fünfminütigen Plasmabehandlung auf DNA und Lipid-Komponenten.	64
Abbildung 20: Veränderung des Plasmaeffekts mit Zunahme der Epitheldicke.	65
Abbildung 21: Einfluss der Behandlungsdauer auf DNA- und Lipidkomponenten.	67
Abbildung 22: Unterscheidung der Plasmageräte in der PCA.	69

Abbildung 23: Unterschied zwischen kINPen® und APCIII.	73
Abbildung 24: Zusammenfassung der gerätespezifischen Reichweite und Effektivität.	92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prävalenz, Persistenz, Regression und Progression von CIN I – III.	12
Tabelle 2: Chemikalien.....	26
Tabelle 3: Benutztes Zubehör	28
Tabelle 4: Verwendete Geräte	28
Tabelle 5: Eingesetzte Software für Messungen und Analyse	29
Tabelle 6: Aufstellung aller verwendeter Gewebeproben und deren initialen Verarbeitung.	30
Tabelle 7: Ablaufplan der Russell-Movat-Pentachrom-Färbung.	40
Tabelle 8: Messtiefe der jeweiligen Basalzellscans.	55
Tabelle 9: Raman-Banden (in rel. cm^{-1}) der Loadings nach fünfminütiger kINPen®-Behandlung und deren molekulare Zuordnung.	59
Tabelle 10: Raman-Banden (in rel. cm^{-1}) der Loadings nach fünfminütiger APCIII-Behandlung und deren molekulare Zuordnung.	60
Tabelle 11: Spezifische Raman-Banden (in rel. cm^{-1}) für die Plasma Geräte kINPen® und APCIII und deren Zuordnung.	70

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μm	Mikrometer
abs.	absolut
ANOVA	Analysis of variance
APPJ	atmospheric pressure plasma jets
bzw.	beziehungsweise
CAP	Cold atmospheric plasma

CCD counts	Charge-coupled device counts
CIN	Zervikale intraepitheliale Neoplasie
DBE	Dielektrikum-behinderten Entladungen
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
ER	endoplasmatisches Retikulum
h	Stunden
HLA	human leucocyte antigen
HPV	humanen Papillomviren
HR	Hochrisiko (der HP-Viren)
Kryo	Kryokonserviert
l/min	Liter pro Minute
Max.	Maximum/maximal
MGV	durchschnittliche Grauwert (mean grey value)
MHz	Megahertz
min	Minuten
Min.	Minimum/minimal
ml	Milliliter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
ns.	Nicht signifikant
NR	Niedrigrisiko (der HP-Viren)
Pap-Abstrich	Zytologie nach Papanicolaou
Para	Paraffin eingebettet
PC	Hauptkomponente
PCA	Principal Component Analysis
PFA	Paraformaldehyd
rel. cm ⁻¹	Relative Zentimeter hoch minus eins
RNS	Stickstoffradikale
RONS	Sauerstoff- und Stickstoffradikale
ROS	Sauerstoffradikale
s	Sekunden
Sup.	Superfiziell/Superfizial

TCA	True Component Analysis
u.B.	Behandlung unter kontinuierlicher Bewegung
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
W	Watt
Δ	Delta (Differenz)

1 Einleitung

Physikalische Plasmen sind ein natürlicher Bestandteil unserer Umwelt. Seit einigen Jahren besteht das Bestreben diese energiereichen und elektrisch leitenden Gase, wie sie in Blitzen, Polarlichtern und Sonnenwinden vorkommen, als nicht-thermische Gewebebehandlung in der modernen Medizin zu etablieren. Aufgrund des noch in weiten Teilen unbekanntem Potenzials sog. Kaltplasmen haben sich hieraus zahlreiche Anwendungsgebiete ergeben. Im Bereich der Wundversorgung konnten Nachweise für eine gesteigerte Heilungstendenz und -geschwindigkeit gefunden werden (Isbary *et al.*, 2012; G. Isbary *et al.*, 2013; Kartaschew *et al.*, 2015; Scharf *et al.*, 2019). Im Bereich der Onkologie spannt sich ein großes Feld auf, das neben der Therapie von Melanomen und Brustkrebs, auch die von Prostata-, Zervix-, Pankreaskarzinomen und Gliomen umfasst (Ahn *et al.*, 2011; Partecke *et al.*, 2012; Arndt *et al.*, 2013; Köritzer *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Siu *et al.*, 2015; Feil *et al.*, 2019). Nicht zuletzt findet physikalisches Plasma Einsatz bei der Desinfektion von Wunden und Oberflächen (Lackmann *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). Dabei entfaltet sich seine Wirkung im Wesentlichen durch antiproliferative Prozesse, die zur Apoptose oder Seneszenz von Zellen führt (Ahn *et al.*, 2011; Arndt *et al.*, 2013; Utsumi *et al.*, 2013; Siu *et al.*, 2015; Bourdens *et al.*, 2019).

Ein solcher Therapiemechanismus wäre für viele neoplastische Erkrankungen wünschenswert und tatsächlich scheint die Behandlung des Zervixkarzinoms mit Plasmaquellen vielversprechend zu sein (Feil *et al.*, 2020). Bislang konnte in aussichtsreichen Studien gezeigt werden, dass die Behandlung der Vorstufen (zervikale intraepitheliale Neoplasien = CIN) ebenso erfolgreich ist und schon nach kurzen Zeiträumen (3 – 6 Monate) eine Remission (Tumorfreiheit) eintritt (Henes *et al.*, 2020). So könnten operative Verfahren zur Behandlung höherer CIN Stufen potenziell vermieden werden. Durch die unkomplizierte Anwendung von physikalischem Plasma ist es zudem möglich, eine Behandlung gewebeschonend im klinischen Alltag durchzuführen.

Da der Ursprung neoplastischer Veränderungen in der basal gelegenen, stark proliferierenden Zellschicht des Epithels liegt, stellt sich die Frage, ob diese Zellen von einer Plasmatherapie erreicht werden. In vorausgegangenen Studien wurden unterschiedliche Werte für die erreichbare Eindringtiefe ermittelt, die zwischen einigen Mikrometern und wenigen Zentimetern schwanken (Dobrynin *et al.*, 2012; Partecke *et al.*, 2012; Duan, Lu and He, 2017; Szili *et al.*, 2018). Gerade für die dünnen Schichten menschlicher Epithelien spielt eine präzise Detektion der funktionellen Veränderungen durch physikalisches Plasma eine wichtige Rolle. Die Funktionsweise von physikalischen Plasmen ist bislang noch nicht vollständig geklärt, weshalb es einer Methode bedarf, die feinste molekulare Unterschiede erfasst. Bereits in Experimenten von Brauchle *et al.* konnten mit der Raman-Mikrospektroskopie molekulare Zellmechanismen wie Apoptose- und Nekrosevorgänge in Osteosarkomzellen erfolgreich verfolgt werden (Brauchle *et al.*, 2015). Aus diesem Grund scheint die Laser basierte Raman-Mikrospektroskopie als zudem kontaktlose und markerunabhängige molekulare Analyseverfahren besonders geeignet für die Bestimmung der Eindringtiefe von physikalischem Plasma in gesundes Zervixgewebe zu sein.

1.1 Zervix uteri

Für diese Studie wurden Ex-vivo-Proben aus der Portioregion der Zervix uteri verwendet. Der Uterus (lat., Gebärmutter) liegt im Becken der Frau und ist aufgrund seiner Periodik ein sehr proliferatives Organ. Neben den Tuben, die von ihm abgehen, wird er unterteilt in Fundus, Korpus und Zervix. Die Zervix erstreckt sich aus dem Uterus heraus vom Isthmus uteri über den Zervixkanal bis zur Portio vaginalis. Dabei bildet die Portio den Übergang in die Scheide. An dieser Stelle geht auch das einschichtige schleimbildende Zylinderepithel der Zervix in mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel über. Neben der Anzahl der Schichten unterscheiden sich diese darüber hinaus durch die Morphologie ihrer Zellen (Abbildung 1). Auf der Basallamina bauen sich unmittelbar die Basalzellen in ihrer typischen hochprismatischen Gestalt mit ausgeprägten Zellkernen auf. Hierauf folgen wenige Schichten der ähnlichen

Parabasalschicht. Die Intermediärschicht ist die breiteste Schicht und bildet den kontinuierlichen Übergang zur Superfizialschicht. Diese besteht vor allem aus flachen Zellen, die über einen kleinen Zellkern verfügen. Hier sorgen Zellen für die mechanische Stabilität und besitzen zum Teil Glykogenspeicher. Aufgrund des ständigen hormonell bedingten Auf- und Abbaus sowie der Umwandlung der verschiedenen Schleimhauttypen ineinander (Metaplasie) ist die Portio besonders vulnerabel für die Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV) und birgt ein hohes Risiko, Mutationen und damit Zellkernalterationen auszubilden. Zudem verlagert sich die Grenze zwischen den Epithelien erst in der Postmenopause zurück in den Zervikalkanal.

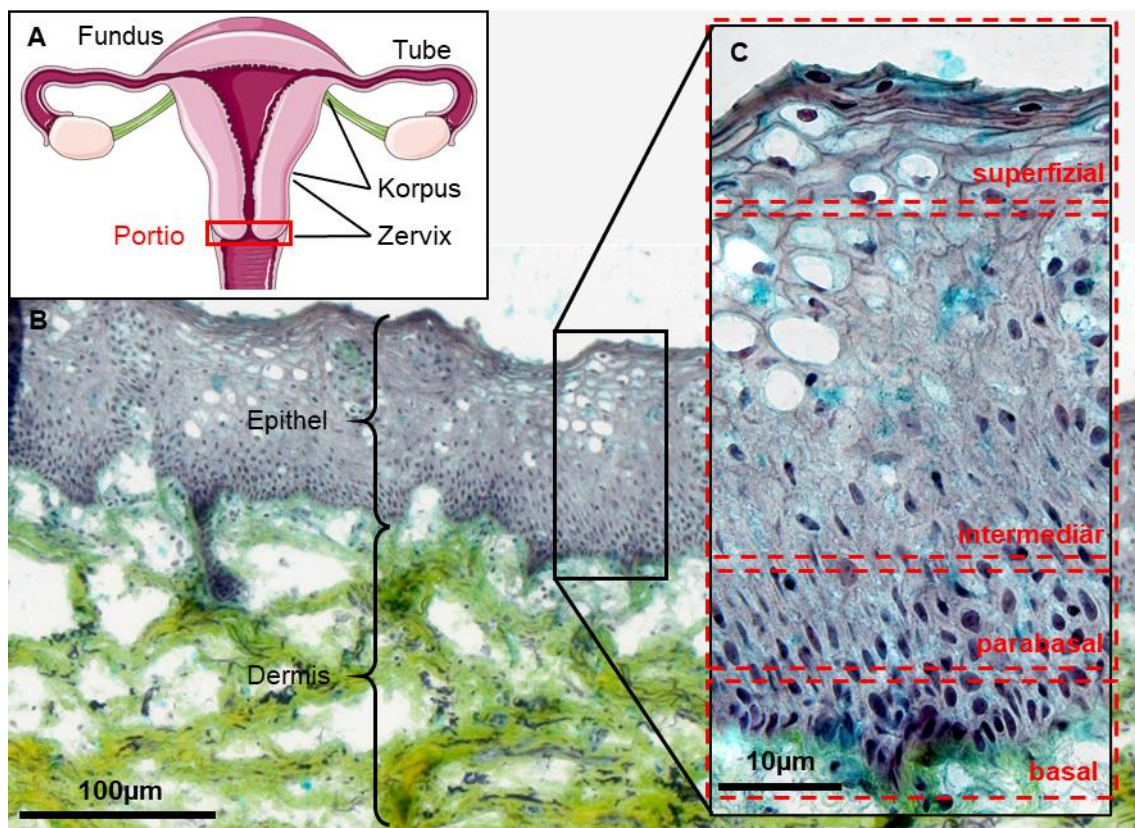


Abbildung 1: Makroskopische und mikroskopische Einteilung des Zervixgewebes.
A: Schematische Darstellung eines Uterus (modifiziert nach Uterus (CC BY 3.0, 2019)). Rot markiert die Portioregion. B und C: Hellfeldaufnahmen eines Movat-Pentachrom-gefärbten 10 µm Zervixquerschnitts. Einteilung in die histologisch bekannten Schichten: superfizial, intermediär, parabasal und basal. B: Maßstabsleiste entspricht 100 µm. C: Maßstabsleiste entspricht 10 µm.

1.2 Zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN)

Die CIN ist eine Präkanzerose des Gebärmutterhalses. Sie betrifft vorwiegend junge Frauen (20 – 30 Lebensjahr) und zeigte in einer amerikanischen Kohortenstudie mit rund 150.000 Teilnehmerinnen eine Inzidenz von 1,2 pro 1.000 Frauen für die niedriggradige CIN I und eine von 0,8 bzw. 0,7 für die hochgradigen CIN II und III (Insinga, Glass and Rush, 2004). In Deutschland wurden im Jahr 2012 rund 1,58 % (entspricht 255.013 Patientinnen) auffällige Papanicolaou-Abstriche (Pap-Abstrich) festgestellt. Als auffällig wurden Abstriche gewertet, die nach der Münchner Nomenklatur II einen Grad III oder höher der existierenden Grade I-V in der Histologie aufwiesen. Wurden Befunde weiter abgeklärt, so zeigten sich in über 80 % der höhergradigen Pap-Abstriche (IIID, IVa IVb) vor allem verschiedene CIN Stufen aber auch Zervixkarzinome (S3-Leitlinie Prävention des Zervixkarzinoms, 2017).

Das Zervixkarzinom ist mit einer Inzidenz von 6,6 % weltweit nach wie vor das vierthäufigste Karzinom der Frau (Bray *et al.*, 2018). Dabei finden sich Erkrankungen in Afrika häufiger als auf den meisten anderen Kontinenten (Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, 2018). In Deutschland lag die jährliche Neuerkrankungsrate bei 11,2 pro 100.000 Frauen (Robert Koch Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2013). Die Mortalität des Zervixkarzinoms liegt in Teilen Afrikas bei 30 %, aber auch in Europa endet die Erkrankung noch bei rund 3 % letal (Bray *et al.*, 2018). Ungeachtet der Mortalität, ist die Diagnose eines Karzinoms für viele Patienten ein einschneidendes Erlebnis und führt häufig zu psychischen Folgeerkrankungen (Kangas, Henry and Bryant, 2002; Rao *et al.*, 2019). Die primäre Therapie des Zervixkarzinoms ist eine Operation oder Radio-(chemo-)therapie. Je nach prä-/intraoperativem Befund wird eine radikale Hysterektomie (Gebärmutterentfernung inklusive Adnexe) einer Radio-(chemo-)therapie untergeordnet. Zur generellen Stadienbestimmung der Erkrankung gehören neben geeigneter Bildgebung auch Lymphknotenbiopsien, die zu Beinödemen und Einschränkungen im Alltag führen können. Ist eine Remission erreicht, sind die Betroffenen angehalten für drei Jahre alle drei Monate, nachfolgend alle 6

Monate, zur Nachsorge zu erscheinen. Anamnese, körperliche inklusive rektovaginale Untersuchung, SpekulumEinstellung und Zytologie sind dabei durchzuführen und können bei Bedarf durch zusätzliche Verfahren ergänzt werden (Therapie und Nachsorge nach (S3-Leitlinie Zervixkarzinom, 2014)).

Es ist allgemein anerkannt, dass fast allen Zervixkarzinomen und damit auch der CIN eine Infektion mit HPV der Hochrisikoklasse (HR) vorausgeht. Zu diesen zählen besonders die Typen 16 und 18 (in 70 % beim Zervixkarzinom vorhanden), aber auch 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68 sind bestätigte HR-Typen (Bzhalava *et al.*, 2013). Neben einigen Mischtypen sind die Typen 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81 als Niedrigrisikotypen (NR) klassifiziert und begünstigen die Entstehung von Genitalwarzen/Kondylomen. Von allen 176 identifizierten HPV-Genotypen befallen lediglich 40 das Genital (Muñoz *et al.*, 2003; International Agency for Research on Cancer, 2012).

Diese dringen in die teilungsaktiven Basalzellen ein und nutzen deren Replikationsmechanismen. Dabei liegen kodierende Bestandteile von NR-Typen meist extrachromosomal vor, während jene von HR-Typen in die DNA integriert werden. Das Genom des Virus besteht aus drei wesentlichen Abschnitten, der ‚long control region‘, die als Regulationseinheit dient und Replikation, sowie Proteinsequenzierung kontrolliert, der Region für frühe Gene, zu denen E1 – E8 zählen und der Region für späte Gene (L1 und L2). Frühe Gene spielen in der Anfangsphase bezüglich Virusgenomreplikation, Zellregulation und Umgestaltung der zellulären Strukturen zum Erhalt des Virus eine entscheidende Rolle. Hingegen sind die späten Gene wichtig für Synthese des Viruskapsids und der damit einhergehenden Verbreitung. Teilen sich nun Basalzellen, differenzieren die nach superfizial wandernden Tochterzellen, was zu einer uneingeschränkten Vermehrung der Viruspartikel führt. Dabei stimulieren die Gene E6 und E7 einen erneuten Eintritt der Zelle in den Replikationszyklus. Zusammen mit L1 werden sie zur Differenzierung zwischen NR- oder HR-Typen herangezogen. E6 und E7 werden normalerweise durch die Repressorgene E2 und E8-E2c inhibiert. Durch die Integration des Virusgenoms in das Wirtsgenom, können E2 und E8-E2c einen Funktionsverlust erleiden, wodurch es zu einer Dysregulation von Zellzyklus

und Proliferation kommt. Durch bislang ungeklärte Evasionsmechanismen wird ein Ausheilen verhindert und es kommt im Verlauf zu Neoplasien (Absatz nach (S3-Leitlinie Prävention des Zervixkarzinoms, 2017)).

Solange die Neoplasie oberhalb der Basallamina im Epithel liegt, wird von der CIN gesprochen. Gefürchtet ist die Progression zum Zervixkarzinom, welches durch ein invasives Wachstum über die Basallamina hinaus charakterisiert wird. Als weitere Ursachen für die Entstehung der CIN wird eine multifaktorielle Genese diskutiert, bei der unter anderem HLA Typen, Immunsuppression und Rauchverhalten eine Rolle spielen (Arends, Buckley and Wells, 1998).

Für Diagnostik und Vorsorge ist der Abstrich des Gebärmuttermundes und -halses und die HPV-Testung entscheidend. Damit verbunden sind die seit 2020 aktualisierten Screeningalgorithmen, denen zu Folge Frauen ab dem 35. Lebensjahr nur noch alle drei Jahre einen Pap-Abstrichtest erhalten. Jedoch wird dieser fortan mit einem HPV-Abstrichtest kombiniert. Durch diese Tests wird die Morphologie von Zervixzellen auf vorhandene Zellkernalterationen sowie das Vorliegen verschiedener Subtypen des HP-Virus untersucht. Somit soll eine fundiertere Einschätzung über mittelgradige Pap-Abstriche (Grad II und III nach Münchner Nomenklatur) ermöglicht werden und die damit verbundene Therapieempfehlung verbessern. Ergänzend sind Biopsien ab Grad III üblich, die histologisch nach den typischen CIN-Kriterien klassifiziert werden. Diese bestehen aus der erreichten Höhe der Neoplasie (von der Basalschicht ausgehend) und dem Verlust ihres regulären Aussehens (Entdifferenzierung). Hieraus ergeben sich drei Grade; CIN I – III. Bei der CIN I finden sich neoplastische Veränderungen (Zell- und Zellkernpleomorphien, vermehrte und atypische Mitosen, Verlust der Polarität und Verschiebung des Kern-Plasma-Verhältnisses) in bis zu einem Drittel der Gesamthöhe, bei der CIN II in bis zu zwei Drittel und bei der CIN III erstrecken sich die Veränderungen über das gesamte Epithel (Abbildung 2).

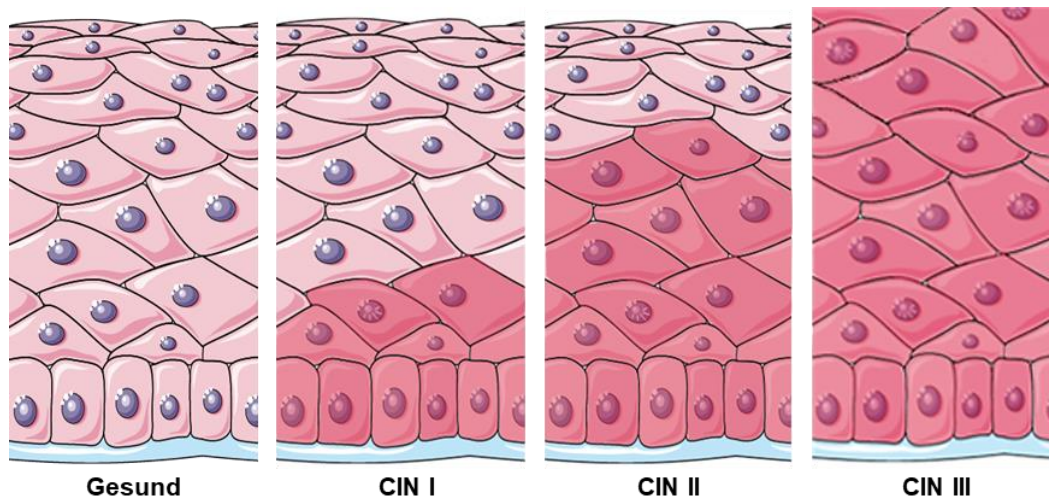


Abbildung 2: Histologische Klassifikation der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN).

Schematische Darstellung der Zell- und Zellkernalterationen durch dunklere Färbung. Von links nach rechts: Gesundes, mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel der Zervix, CIN I, CIN II, CIN III. (modifiziert nach Stratified squamous epithelium (CC BY 3.0, 2019)).

In einer Langzeitstudie beobachtete Östör den Verlauf einer CIN mit dem Ergebnis, dass auch schon die Stufen I und II ein Risiko bergen direkt in ein Zervixkarzinom überzugehen (Östör, 1993). Außerdem beschrieb die Arbeitsgruppe Wahrscheinlichkeiten zu Persistenz und Regression der jeweiligen Läsionen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Prävalenz, Persistenz, Regression und Progression von CIN I – III.
Modifiziert nach (Östör, 1993) und (Peto et al., 2004).

Läsion	Prävalenz	Persistenz	Regression	Progression zu CIN III / Zervixkarzinom
CIN I	3,82 %	30 %	60 %	10 % / 1 %
CIN II	0,38 %	40 %	40 %	20 % / 5 %
CIN III	0,67 %	< 55 %	33 %	--- / > 12 %

Aufgrund der Regressionswahrscheinlichkeit von 40 bis 60 %, die von Östör ermittelt wurden, wird therapeutisch bei der CIN I und II (Grad IIID1 und 2 nach Münchner Nomenklatur III; D entspricht dysplastisch) vor allem abwartend agiert und eine Verlaufskontrolle angestrebt. Allerdings besteht in wenigen

Fällen das Risiko einer Progression (5 – 12 %) zu höhergradigen Formen der CIN oder dem Zervixkarzinom. Persistieren die Läsionen länger als zwei Jahre, sind derzeit dieselben invasiven Verfahren notwendig wie im Falle einer Progression (S3-Leitlinie Prävention des Zervixkarzinoms, 2017). Sowohl die elektrochirurgische Schlingenexzision (LEEP-Exzision; Loop Electrosurgical Excision Procedure), bei der die Läsion ausgeschnitten wird, als auch die Verbrennung des dysplastischen Gewebes (Laservaporisation) sind mit einer Narkose, einem zumeist ambulanten Krankenhausaufenthalt, sowie Schmerzen, Gewebeverlust und peri-/postoperativen Risiken verbunden (Sadler *et al.*, 2004; Henk *et al.*, 2010; Ribeiro Cubal *et al.*, 2012; Brucker *et al.*, 2014; De Rosa *et al.*, 2017; Hillemanns *et al.*, 2019). Zu den besonders einschneidenden Komplikationen zählt die bis zu zehnfach erhöhte Frühgeburtlichkeit nach operativem Eingriff an der Zervix uteri (Sadler *et al.*, 2004; S3-Leitlinie Prävention des Zervixkarzinoms, 2017). Schon zuvor sind Blutungen oder Rückstände von dysplastischem Gewebe Gründe für mögliche Reoperationen und bergen ein erhöhtes Risiko für Schmerzen und Dyspareunie. Gerade bei älteren Patientinnen steigt zudem das Risiko für Zervixstenosen, die sich vor allem durch Schmerzen zeigen und ein Abflusshindernis von Menstrualblut bewirken (Baldauf *et al.*, 1996). Neben allen physischen Einschränkungen stellt ein positiver Befund oder auch eine Fehldiagnose (falsch-positiv) eine enorme psychische Belastung dar, die häufig mit gesteigerter Angst und Stigmatisierung einhergehen (Maissi *et al.*, 2004; McCaffery *et al.*, 2004; Frederiksen *et al.*, 2015). Zuletzt bedeutet eine derart ausgedehnte Therapie und deren Konsequenzen auch eine finanzielle Belastung für das Gesundheitssystem. Werden all diese Aspekte ins Verhältnis zu dem geringen Risiko einer Progression gesetzt, muss von einer ernstzunehmenden Übertherapie bei bis zu 8-9 von 10 Patientinnen ausgegangen werden, die mit gesteigerter Morbidität und Nachteilen für die Betroffenen einhergeht (Ostör, 1993). Da die CIN bei rechtzeitigem Erkennen eine sehr gute Prognose hat, bedarf es einer non- bzw. minimal-invasiven Therapie, die kosteneffizient, patienten- und gewebeschonend sowie möglichst frei von Komplikationen ist.

1.3 Niedertemperaturplasma

Physikalisches Plasma beschreibt den gasförmigen Zustand von Materie, der zusätzlich mit Energie angereichert ist (Langmuir, 1928). Frank-Kamenetskii beschreibt physikalisches Plasma als elektrisch leitendes Gas, da sich Elektronen von ihren Atomen trennen und es zur Entstehung von Ionen kommt (Frank-Kamenetskii, 1964). Zur Ionisation von Gasen kommt es beispielsweise durch radioaktive Strahlung, extreme Temperaturen, Mikrowellen oder elektrische Spannung. Ergänzend ist der Prozess der Autoionisation zu erwähnen (Gross, 2013).

Für die Generierung von nicht thermischen Plasmen aus Edelgasen ist insbesondere eine hohe elektrische Spannung entscheidend. Diese Spannung sorgt zwischen zwei Elektroden für einen Stromfluss, der im Megahertzbereich durch High-frequency-Generatoren periodisch umgekehrt wird. Die rasante Periodik sorgt dafür, dass die kinetische Energie nur ausreicht, um Elektronen in Bewegung zu versetzen. Einmal angefangen kommt es zu weiteren Stoßionisationen (Ionisation durch Kollision von Teilchen), die zu einer Kettenreaktion führen. Durch diesen Prozess wird das Gas aktiviert, elektrisch leitend und es entsteht ein thermisches Ungleichgewicht. Diese Dysbalance setzt sich aus atmosphärisch warmen Atomkernen/Neutralteilchen (ungefähr Raumtemperatur) und einigen 10.000 °C heißen Elektronen zusammen. Jedoch wird die Temperaturentwicklung aufgrund des Massenunterschieds und des Verhältnisses zueinander über die Atomkerne/Neutralteilchen definiert und gibt dem Niedertemperaturplasma letztlich seinen Namen. Oberflächen, die mit diesem Plasma in Berührung kommen, sind demnach einem reaktiven Gasgemisch ausgesetzt (Absatz nach (Metelmann, von Woedtke and Weltmann, 2016)).

Im Gegensatz zu den klassischen Niedertemperaturplasmen, zu denen auch der kINPen® als konventionelle Kaltplasmaquelle zählt, ist das APCIII (argon plasma coagulation 3) ein thermisches, physikalisches Plasma. Es besitzt zwei Elektroden, von denen eine aktive Elektrode zur Behandlung genutzt wird,

während die Erdungselektrode am Patienten/der Probe angebracht ist. In seiner thermochirurgischen Verwendung findet eine Erhitzung des Gewebes durch Energieumwandlung der angelegten Spannung statt, die direkt proportional zum elektrischen Widerstand und im Quadrat zum Stromfluss ist (Kähler *et al.*, 2009; Weiss, Utz, *et al.*, 2019; Wenzel *et al.*, 2020). Durch den sogenannten „precise mode“ ist es möglich die Spannung deutlich zu senken und eine gleichbleibende Behandlungsstärke unabhängig der Entfernung zum Gewebe zu erreichen (Kähler *et al.*, 2009). In Kombination mit einer kontinuierlichen Bewegung der Behandlungselektrode können thermische Schäden am Gewebe verhindert werden, wodurch eine Art Niedertemperaturplasma entsteht (Weiss, Utz, *et al.*, 2019). Deshalb werden in dieser Arbeit beide Plasmen aus Gründen der Übersicht vorrangig als Niedertemperaturplasmen bezeichnet. Als monopolarer und ebenfalls kontaktloses Koagulationsverfahren ist die APC Technologie bei endoskopischen Untersuchungen weit verbreitet und seit langem etabliert (Farin and Grund, 1994). In der neuesten Generation (VIO® 3 APCIII) bietet es auch für dieses alternative nicht-thermische Anwendungsverfahren Vorteile durch langjährige Erfahrung und breite Verfügbarkeit.

Seit mehreren Jahren untersuchen diverse Studien die Wirkkomponenten von Niedertemperaturplasmen und deren Effekte auf biologisches Gewebe (Kalghatgi *et al.*, 2011; Georg Isbary *et al.*, 2013; von Woedtke, Metelmann and Weltmann, 2014). Dabei war es möglich verschiedene Komponenten zu identifizieren, die in einem Positionspapier vom nationalen Zentrum für Plasmamedizin, einer deutschlandweiten Vereinigung von Forschern, Unternehmen und Universitäten, ihrer Wirkung nach gewichtet wurden (Nationales Zentrum für Plasmamedizin, 2014). Hierzu gehören neben UV-Strahlung, sichtbarem Licht, Ionen, Wärme und elektromagnetischer Strahlung insbesondere radikale Spezies und chemische Verbindungen (Abbildung 3A). Es wird zurzeit angenommen, dass Sauerstoff- und Stickstoffradikale (RONS) bei der Applikation an biologischem Gewebe den größten Einfluss vermitteln (Kim and Chung, 2016; Duan, Lu and He, 2017; Lackmann *et al.*, 2019). Hierzu konnte nachgewiesen werden, dass das APCIII eine höhere Konzentration an

RONS produziert als der kINPen® (Weiss, Utz, *et al.*, 2019). Die intrazellulären Oxidationsprozesse greifen mitunter Regulationsmechanismen an, die für Zellzyklus, Zellform und Zelltod, sowie die Proliferation und Migration zuständig sind (Weiss *et al.*, 2015; Weiss, Barz, *et al.*, 2019). In aktuellen Studien konnten antiproliferative Prozesse anhand von Fibroblasten nachgewiesen werden, sowie ein Eintritt in die zelluläre Seneszenz bereits nach dreiminütiger Behandlung (Bourdens *et al.*, 2019; Weiss, Barz, *et al.*, 2019). Partecke *et al.*, die die Apoptoseneigung von Tumorzellen an soliden pankreatischen Adenokarzinomen im Eiermodell bestimmten, legten ebenso eine molekulare Veränderung auf Zellebene nahe (Partecke *et al.*, 2012). Darüber hinaus wurde von Adachi *et al.* bei der Apoptoseinduktion der behandelten humanen Adenokarzinomzellen der Lunge eine Beteiligung von mitochondrialen Strukturen festgestellt (Adachi *et al.*, 2015).

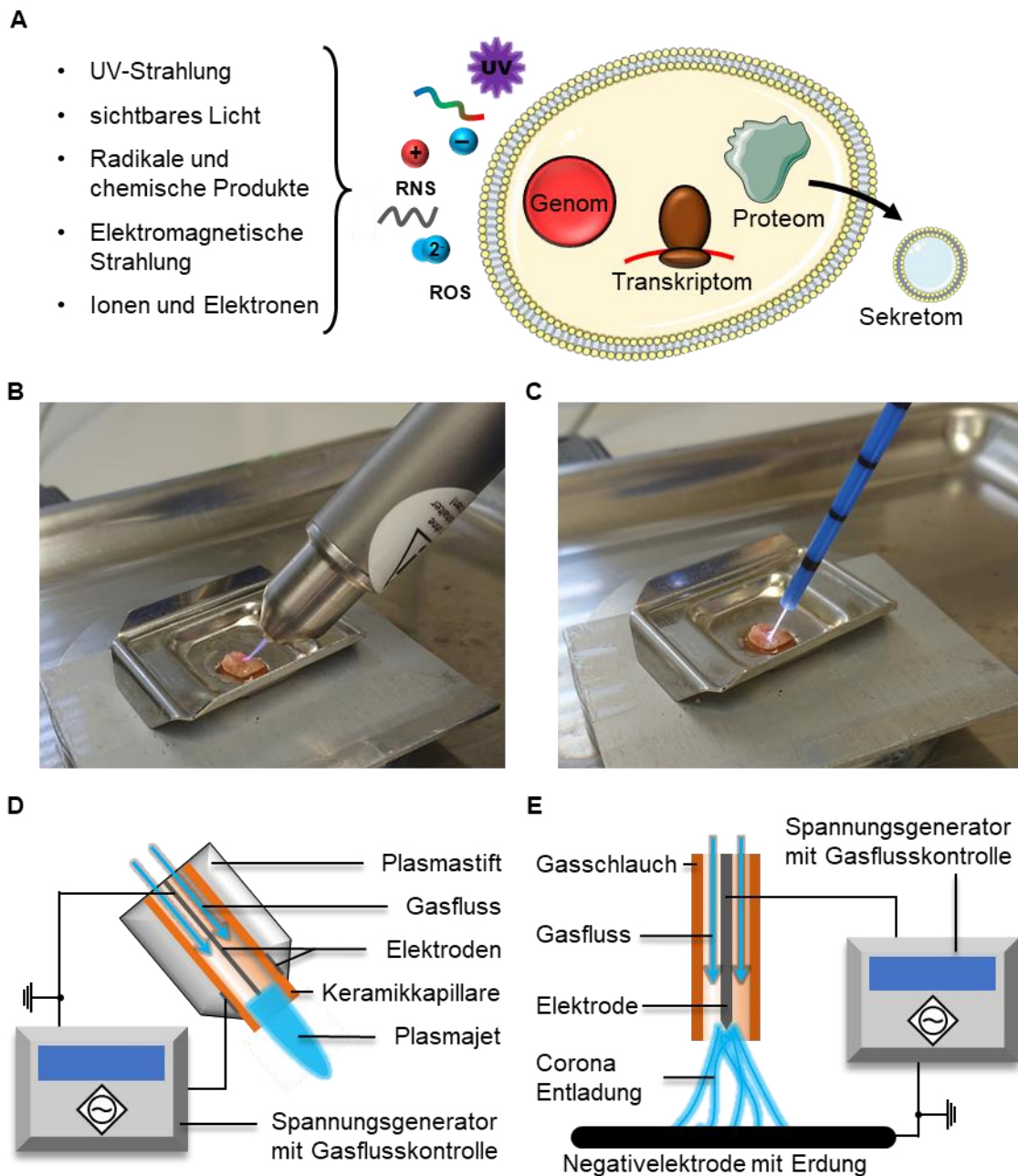


Abbildung 3: Auswirkung von physikalischem Plasma auf zelluläre Komponenten und Aufbau der Plasmageräte.

A: Faktoren des physikalischen Plasmas und die zellulären Komponenten, auf die sie wirken (Metelmann, von Woedtke and Weltmann, 2016). (modifiziert nach Vakuole, Protein (CC BY 3.0, 2019)). B und C: Verwendete Plasmageräte während der Behandlung. B: kinPen®; C: APCIII D: Aufbau des kinPen®. Der hohe Gasfluss treibt das durch elektrische Spannung erzeugte Plasma als Jet aus. E: Aufbau des APCIII. Nicht-thermische Anwendung durch starke Reduktion der angelegten Spannung. Die Corona Entladung des Plasmas folgt dem Verlauf des Stromkreises. (B – D modifiziert nach (Wenzel et al., 2019, 2020)).

Eine Vielzahl an Studien über Niedertemperaturplasmen wurden zu den sogenannten Plasmajets (APPJ = atmospheric pressure plasma jets) durchgeführt, zu denen auch der in dieser Studie verwendete kINPen® MED (Neoplas Tools) gehört (Abbildung 3B). Nur Wenige befassten sich in diesem Anwendungsbereich mit thermischen Plasmaquellen, unter denen das VIO® 3, APCIII (Erbe Elektromedizin) in seiner nicht thermischen Einstellung einzuordnen wäre (Abbildung 3C). Technisch betrachtet, entzündet der kINPen® das Plasma innerhalb der Keramikkapillare zwischen einer zentral gelegenen und einer das Dielektrikum zirkulär umgebenden Elektrode. Die Bildung des Plasmaeffluents erfolgt durch die elektrische Feldgeometrie und den Gasfluss, der im Sinne einer Druckerhöhung zusammen mit der Gassorte für die Zündbarkeit bedeutend ist. Nach Zündung des Gases entsteht ein ein bis zwei Zentimeter langer Effluent in Form eines abgerundeten Kegels (Abbildung 3B und 3D). Im Falle des APCIII ist die zirkuläre Elektrode extern angebracht. Daraus ergibt sich, dass sich meist der Patient oder das Untersuchungsmaterial zwischen den Elektroden und damit im Stromkreis befinden (Abbildung 3C und 3E). Die Form des erzeugten Plasmas wird als Corona-Entladung bezeichnet (Absatz nach (Metelmann, von Woedtke and Weltmann, 2016)). Verglichen mit dem kINPen®, bei dem das Plasma orthogonal zum Stromkreis ausgetrieben wird, wandert das Plasma des APCIII entlang des Stromkreises. Durch den Aufbau sind sowohl Unterschiede des Gasflusses als auch des Energieaufwands bei der Erzeugung gegeben. Aus diesem Grund und besonders durch die jetzt schon breite Verfügbarkeit des APCIII stellt ein Vergleich mit dem für die Kaltplasmaanwendung bekannteren kINPen® mittels einer Methode, die bereits feinste molekulare und biochemische Veränderungen unabhängig von vordefinierten Endpunkten detektieren kann, Chancen und Möglichkeiten für die Plasmamedizin dar.

1.4 Raman-Effekt

Der Raman-(Mikro)Spektroskopie liegt der sogenannte Raman-Effekt zugrunde. Dieser wurde vom Physiker C. V. Raman, der sich mit der Streuung von Licht

beschäftigte, erstmalig beschrieben. Der Raman-Effekt umschreibt eine Wellenlängenänderung von Photonen nach energetischer Interaktion mit Molekülen. Durch sehr geringe Mengen kinetischer Energie kommt es zur Anregung eines Moleküls mit monochromatischem Licht (Photonen einer Wellenlänge), wobei diese Anregung durch Schwingungen der einzelnen Atome zu sich selbst und zueinander gekennzeichnet ist. Ein energetisch verändertes Photon wird zu gestreutem Licht und dann als Raman-Streuung bezeichnet, die aufgrund der geringen Streubreite äußerst molekulspezifisch ist (Hellerer, 2004). Bleibt eine Änderung des Energieniveaus aus, entsteht Rayleigh-Strahlung, die in ihrer Wellenlänge unverändert zur Anregungsquelle ist. Sie macht den überwiegenden Teil in spektroskopischen Untersuchungen aus, weil dieser Effekt viel häufiger auftritt als Raman-Streuung (Abbildung 4A).

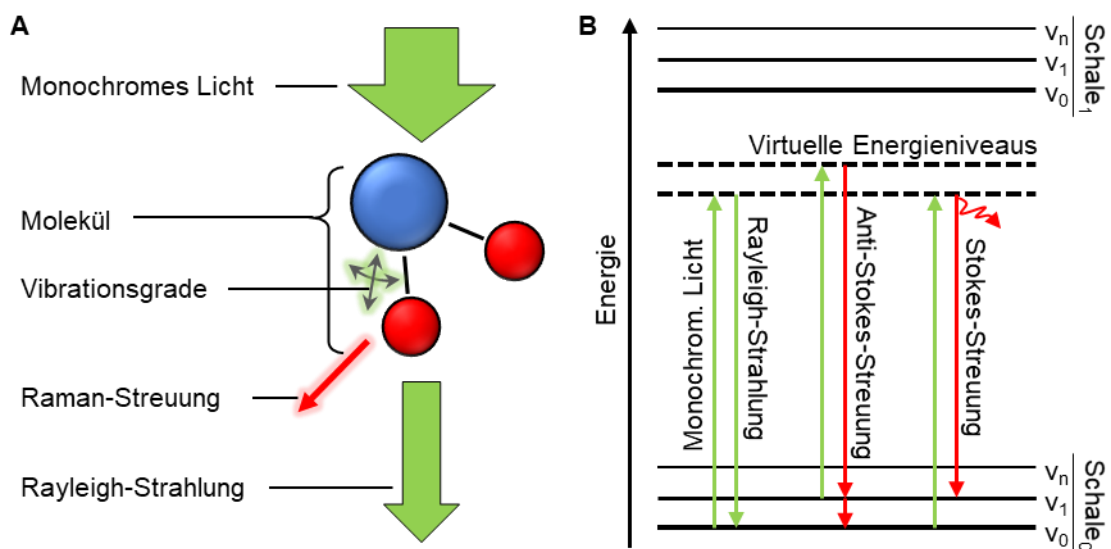


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Raman-Effekts.

A: Raman-Effekt. Nach Anregung werden molekulare Verbindungen in Schwingung versetzt. Bleibt die Energie der Photonen unverändert, wird dies Rayleigh-Strahlung genannt. Findet ein energetischer Austausch mit dem Molekül statt, ändert sich die Energie und damit die Wellenlänge der gestreuten Photonen. Die sogenannte Raman-Streuung gilt als Fingerabdruck des Moleküls. B: Jablonski-Diagramm. Schale_{0-n} sind reelle Energieniveaus mit verschiedenen Vibrationszuständen (ν_{0-n}). Durch Anregung mit monochromatischem Licht wird ein virtuelles Niveau (Vibrationszustand) erreicht. Neben der Rayleigh-Strahlung kann durch Abgabe von Energie Stokes- und durch Aufnahme von Energie Anti-Stokes-Streuung entstehen. (Modifiziert bereits publiziert in (Wenzel et al., 2019)).

Im Jablonski-Diagramm wird deutlich, wie sich die Energie am Molekül verhält (Abbildung 4B). Als Basis sollte das Schalenmodell der Atomphysik dienen, welches Elektronen zusammenfasst, die ein ähnliches energetisches Niveau besitzen. Innerhalb dieser Schalen befinden sich die Elektronen in einem stabilen Zustand. Durch die Anregung mit monochromatischem Licht, wird kinetische Energie zwischen Photon und Elektron übertragen, wodurch das Elektron vorübergehend auf ein zwischen den Schalen befindliches, virtuelles Energieniveau angehoben wird. Aufgrund der Instabilität des angeregten Zustandes verliert es jedoch die gewonnene Energie sofort wieder und gibt diese an das Photon zurück. Fällt ein Elektron in den ursprünglichen Zustand zurück, so bleibt die Energie am Photon und damit die Wellenlänge erhalten – es ergibt sich die bereits erwähnte Rayleigh-Strahlung. Die Raman-Streuung fasst demnach die Anti-Stokes- und Stokes-Streuung (Gewinn bzw. Verlust an Energie am Photon) zusammen. Die Stokes-Streuung ist bei der Untersuchung von Molekülen meistens am aussagekräftigsten (Gardiner, 1989).

Stokes-Streuung eines angeregten Gewebes kann mittels Spektrographen aufgefangen, in ein elektrisches Signal umgewandelt und ausgelesen werden, welches sich als Spektrum darstellt. Im Spektrum sind additiv sämtliche Streuungssignale aller Moleküle dargestellt, die am Messpunkt angeregt wurden. Aus zahlreichen Experimenten in der Vergangenheit lassen sich die gängigen Moleküle mit der Literatur identifizieren. Daneben sind auch Aussagen zu Temperaturverhalten, Kristallinität und weiteren strukturellen Eigenschaften möglich. Eine grundlegende Voraussetzung ist jedoch, dass das untersuchte Molekül polarisierbar ist. Demnach sollte es unter Schwingung oder Rotationsmoment zum Dipol werden können, wodurch sich auch die Brechung von Licht ändert. Diese Voraussetzungen sind in biologischem Gewebe durch die komplexen Moleküle gegeben.

Die Raman-Mikrospektroskopie ermöglicht durch ihre Funktionsweise die Beurteilung von vielseitigen, molekularen Vorgängen. Sie hat als laserbasiertes Verfahren das Potenzial eine markerunabhängige, kontaktlose Analyse von Gewebe und dadurch auch eine Detektion sämtlicher molekularer Unterschiede zu leisten.

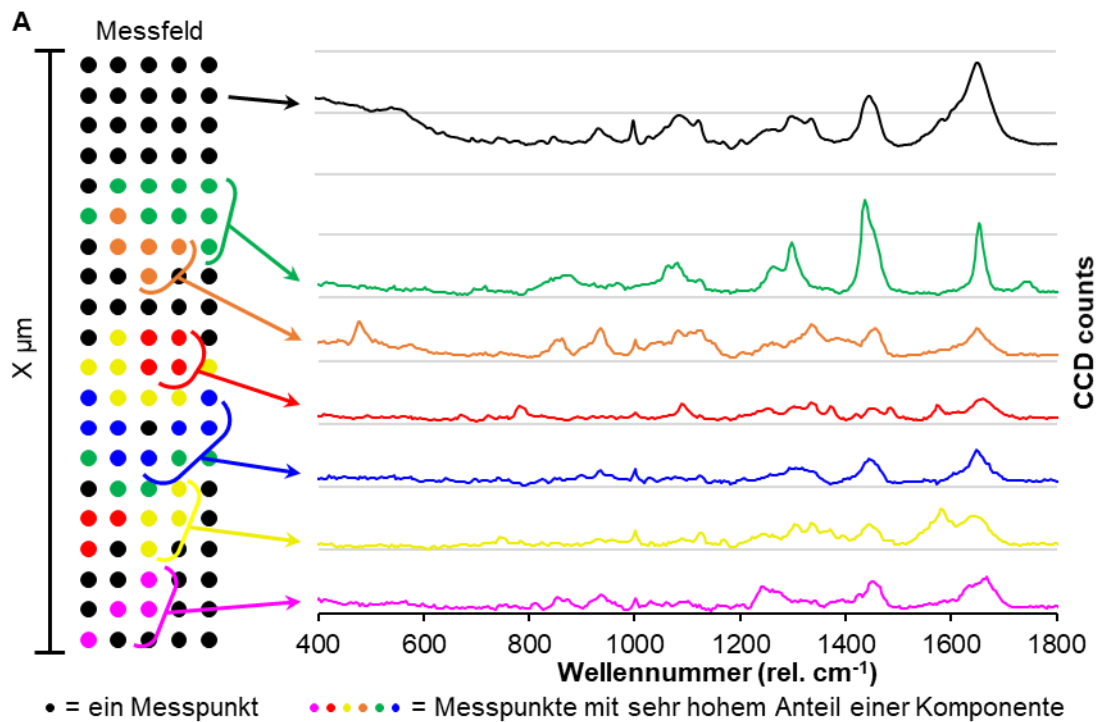
1.5 True Component Analysis (TCA) und Principal Component Analysis (PCA)

Um feinste Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zu detektieren, werden die gewonnenen Spektren häufig primär mit Hilfe spezieller Datenverarbeitungsmethoden analysiert. Zur Auswertung der Raman-Messergebnisse wurden in dieser Studie zwei unterschiedliche Verfahren genutzt, die auch schon in der Vergangenheit erfolgreich Anwendung fanden (Daum *et al.*, 2019; Marzi *et al.*, 2019; Zbinden *et al.*, 2019). Diese Verfahren sind die TCA und PCA.

1.5.1 Funktionsweise der TCA

Die True Component Analysis (TCA) ist ein in Project FIVE (WITec, Ulm, Deutschland) implementierter Algorithmus zur direkten Auswertung von Messungen und bildet die Basis für bildanalytische Verfahren. Während einer Raman-Messung werden die Spektren von zahlreichen Messpunkten aufgenommen und erfasst. Somit werden mit einem Messdurchgang $X_1 * X_2$ Datenpunkte generiert, die abhängig von der Schrittgröße (Distanz zwischen zwei Messpunkten) die Auflösung und das Messfeld bestimmen (Abbildung 5A). Jeder einzelne Messpunkt besitzt ein sich definierendes Spektrum, das abhängig von den darin vorkommenden molekularen Strukturen ist. Bei der strukturellen Analyse von wenig komplexen Stoffen liegen im Idealfall Referenzspektren vor, die aus Messungen reiner Molekülgruppen stammen (nur ein Polymer oder nur DNA). Auf deren Basis lassen sich gemessene Spektren prozentual aufschlüsseln. Ein gemessenes Spektrum (\vec{S}_i) setzt sich zusammen aus: der Matrix wirklicher Komponenten (\hat{B}) multipliziert mit den Verhältnissen, die durch den Vektor (\vec{H}_i) beschrieben werden, und einem Error-Vektor (\vec{E}_i), welcher undefinierbare Vektoren zusammenfasst (Abbildung 5B). Vereinfacht ausgedrückt, kann in einem Gemisch aus verschiedenen Stoffen die Konzentration der unterschiedlichen Komponenten bestimmt werden, wenn diese als reines Spektrum vorliegen. In komplexem, menschlichem Gewebe liegen zahllose Moleküle vor, für die je ein gewebespezifisches und teilweise

individuelles Isolat hergestellt werden müsste, um eine spektrale Aussagekraft zu gewinnen. Da dies meist nicht zu leisten ist, werden Spektren aus Messungen extrahiert, die einen besonders hohen Anteil einer Komponente repräsentieren (zum Beispiel: DNA, Lipide, Protein). Sie werden herangezogen, um eine Aussage über die Aufteilung der übrigen Messpunkte zu machen (Abbildung 5A). Ein derartiges Verfahren ist wissenschaftlich etabliert (Marzi *et al.*, 2019; Zbinden *et al.*, 2019). Oftmals werden zur Bereinigung der Spektren Hintergrund oder Banden anderer Spektren manuell subtrahiert. Extrahierte Referenzspektren, die erneut in die Messung eingefügt werden, bilden abhängig von der Übereinstimmung jeden Messpunkt in relativer Intensität ab.



B

$$\vec{S}_i = \hat{B} \vec{H}_i + \vec{E}_i$$

$$\bullet = \begin{pmatrix} Y \\ Y \\ Y \\ Y \\ Y \\ Y \\ Y \end{pmatrix} = \begin{bmatrix} \bullet \\ \bullet \\ \bullet \\ \bullet \\ \bullet \\ \bullet \\ \bullet \end{bmatrix} \begin{pmatrix} 0,10 \\ 0,45 \\ 0,23 \\ 0,01 \\ 0,17 \\ 0,09 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} E \\ E \\ E \\ E \\ E \\ E \\ E \end{pmatrix}$$

Abbildung 5: Schemata zur True Component Analysis (TCA).

*A: Vereinfachte Darstellung zur Extraktion der vorliegenden Komponenten aus einer Messung. In einem $X_1 * X_2$ großen Messfeld wird eine gewünschte Anzahl an Messpunkten festgelegt. Hieraus ergibt sich die Auflösung. Jeder Messpunkt ist über ein spezifisches Spektrum i (S_i) definiert. Dieses wird durch die molekularen Bestandteile charakterisiert. Messpunkte mit einem sehr hohen Anteil einer Molekülgruppe können als Referenz genutzt, extrahiert und zur Erklärung der übrigen Messpunkte herangezogen werden. Referenzkomponenten (Basis-Spektren) lassen sich mittels gegenseitiger Subtraktion optimieren. B: Erklärung der übrigen Spektren. Hierbei gilt: Spektrum i (S_i) entspricht dem Produkt aus der Matrix der Basis-Spektren (\vec{B}) und den Mixwerten von i (\vec{H}_i) plus dem Error-Spektrum (\vec{E}_i) (Werte beispielhaft). (Modifiziert publiziert in (Wenzel et al., 2019)).*

1.5.2 Funktionsweise der PCA

Die Principal Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse; PCA) ist eine in der Datenanalyse etablierte Methode zur Reduktion der Datenmenge und anschließenden Beurteilung von Eigenschaften verschiedener Gruppen, sowie zur Identifikation von Unterschieden (Krafft *et al.*, 2003; Ong, Lim and Liu, 2012). Basis der Auswertung ist die Ergründung der Varianz (Maß für die Abweichung vom Erwartungswert) in einer Datenmenge. Jede Eigenschaft (e) wird in einem e -dimensionalen Koordinatensystem durch eine Achse beschrieben. Anschließend werden alle Datenpunkte im Koordinatensystem eingetragen und erhalten dadurch einen festen Abstand zum Ursprung (Abbildung 6A). Dieser Abstand ist die Hypotenuse (c) eines rechteckigen Dreiecks. Ausgehend vom Winkel am Ursprung werden die Ankatheten (A) so lange rotiert bis die Summe aller quadrierten Ankatheten den größten Wert ergeben.

$$Summe_A = A_1^2 + A_2^2 + \dots + A_e^2 = PC1$$

Diese Gerade repräsentiert die Achse der Hauptkomponente 1 (PC-1) und bildet gleichzeitig die größte Varianz innerhalb der Daten ab. PC-2 ergibt sich, indem eine senkrecht auf PC-1 stehende Gerade, die ebenfalls durch den Ursprung zieht, solange rotiert wird, bis abermals die größte $Summe_A$ erreicht ist. PC-3 steht danach senkrecht zu PC-1 und -2. Nach diesem Schema wird mit allen weiteren PCs verfahren. Die Werte der Gegenkatheten dienen in einem zweidimensionalen Koordinatensystem mit den PCs 1 und 2 als Hauptachsen nun als neue Koordinaten für die zuvor eingetragenen Datenpunkte (Abbildung 6A). Durch farbliche Kodierung von zuvor definierten

Untergruppen (z. B.: superfizial und basal; behandelt und unbehandelt) ist eine Aussage darüber möglich, welche Hauptkomponente für diese Untergruppen den größten Unterschied beschreibt. Mathematisch betrachtet wird in einer Matrix die Varianz der Untergruppen mit der Varianz der Eigenschaften verglichen, was als Kovarianzmatrix bezeichnet wird.

Der Wert von $\text{Summe}_A(\text{PC-1})$ gilt dabei als Eigenwert. Ein zugehöriger Vektor der Länge 1 ist demnach der Eigenvektor. Dieser setzt sich anteilig aus allen Eigenschaften zusammen, den sogenannten Loadings. Aus diesen lässt sich ablesen, welche Eigenschaften ausschlaggebend für den Unterschied sind, der durch PC-1 ausgedrückt wird. Die Hypotenuse kann ebenfalls als Ursprungsvektor betrachtet werden, der durch die Werte der Eigenschaften (Scores) definiert ist. Sämtliche Originaldaten, die durch die PCA vereinfacht werden, lassen sich durch Multiplikation von Loadings und Scores rekonstruieren. Zusammengefasst sind alle Daten durch eine Score-Matrix (S) multipliziert mit einer Loadings-Matrix (transponiert) (L^T) plus einer Matrix für nicht kalkulierbaren Vektoren (E) abgebildet (Abbildung 6B).

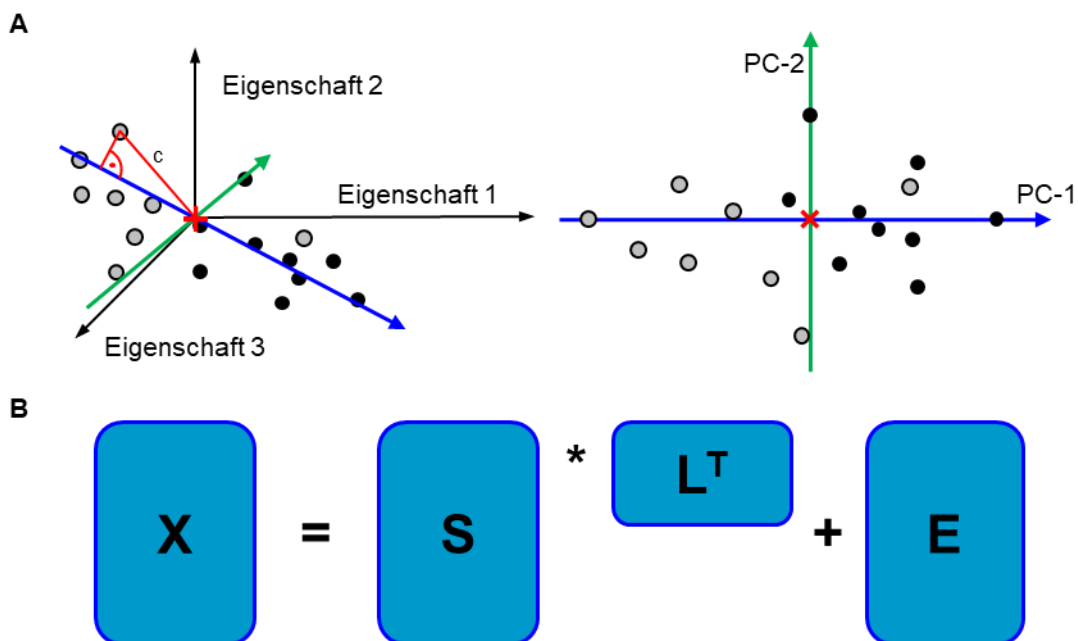


Abbildung 6: Prinzip der Principal Component Analysis (PCA).

Die PCA untersucht, ob Eigenschaften in einem Kollektiv existieren, die zur Unterscheidung mehrerer Gruppen dienen. A: Schematische Umwandlung eines mehrdimensionalen Koordinatensystems in ein Zweidimensionales. Links: Dreidimensionales Koordinatensystem, inklusive zwei darin enthaltener Vektoren, die zwei Hauptkomponenten (Principal Component

= PC) repräsentieren. c markiert die Hypotenuse des rechtwinkligen Dreiecks zur Berechnung der PCs. Rechts: Zweidimensionale Projektion der Vektoren aus A in eine Ebene. Es ergibt sich ein zweidimensionales Koordinatensystem, welches die unterscheidungsrelevanten Eigenschaften in den PCs zusammenfasst. B : Reduzierte Matrizes zur Verdeutlichung des PCA-Konzepts und der Hauptkomponentenbestimmung, wobei die Matrix X durch S , die Score-Matrix, L^T , die Loadings-Matrix (transponiert) und E die Error-Matrix für unkalkulierbare Werte beschrieben wird. Die Datenmenge X wird also durch das Produkt aus Scores und Loadings plus die Fehlerwerte repräsentiert. (A modifiziert publiziert in (Wenzel et al., 2019)).

Spektren aus einer Raman-Messung können ausgelesen werden, wobei jede Wellennummer (laserrelatierte Wellenlänge) einer Eigenschaft entspricht. Die gemessenen Spektren sind dabei die zugehörigen Werte. Die PCA ermöglicht demnach die Unterscheidung von Untergruppen in einer Datenmenge und darüber hinaus eine Identifikation der ursächlichen Wellennummern.

1.6 Fragestellung

Niedertemperaturplasma ermöglicht die non-invasive Behandlung von humanem Gewebe und zeigte in diversen Studien Wirksamkeit gegen unterschiedliche humane Erkrankungen, insbesondere Tumorerkrankungen und Wundheilungsstörungen. Hauptwirkmechanismus dabei scheint der Einfluss plasmainduzierter reaktiver Spezies auf Gewebe und Zellen zu sein. Jedoch konnte bisher die Frage nach der funktionellen Gewebepenetration von Niedertemperaturplasma nur unzureichend beantwortet werden. Die Wahl geeigneter Indikationen für eine Plasmatherapie insbesondere von oberflächlichen Karzinomen und Krebsvorstufen, zu denen auch die CIN zählt, hängt entscheidend von der Kenntnis der funktionellen Gewebepenetration in unterschiedliche menschliche Gewebe ab. Ziele dieser Studie sind (i) die Untersuchung plasmainduzierter biochemischer Veränderungen unterschiedlicher Gewebekomponenten in Struktur und Morphologie, sowie (ii) die Evaluation der funktionellen Gewebepenetration in primärem humanem Gewebe der Zervix uteri. Die erhobenen Ergebnisse könnten zukünftig das kontaktlose und markerunabhängige Monitoring des Behandlungserfolgs mithilfe der Raman-Mikrospektroskopie ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

Name	Artikelnummer	Hersteller
1 % (m/v) Alcianblau-Lösung (250 ml)	5500, Lot: 172430	Sigma Aldrich (Fluka)
1 % (v/v) Essigsäure-Lösung (500 ml), 3 % (v/v) Essigsäure-Lösung (250 ml)	1000631011	Merck
4% Paraformaldehyd (PFA)	16005	Sigma-Aldrich
10 % (m/v) Alkoholische Hämatoxylin-Lösung (50 ml)	BP2424, Lot: 412330	Fisher Scientific
2 % (m/v) Eisenchlorid-Lösung (250 ml), 10 % (m/v) Eisenchlorid-Lösung (50 ml)	5192.1	Roth
2-Propanol	20843 - 2,5 L	VWR
5 % (m/v) Na-Thiosulfat-Lösung (250 ml)	S/7250	Fisher Scientific
5 % (m/v) Phosphorwolframsäure (500 ml)	2635.3	Carl Roth
Brilliant Crocein-Säurefuchsin-Lösung (250 ml)	10156	Morphisto
CaCl	C-34005	PromoCell
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	14190-094, Lot: 1892388	Gibco@life technologies TM
Eindeckmedium Isomount® 2000	5547535	Fa. Labonord
Ethanol abs.	A1613, 2500PE; Lot: 8Q013199	PanReac AppliChem
Jod-Jodkalium-Lösung (50 ml)	I/0500/48 60400	Fisher Scientific Fluka

Keratinocyte growth medium 2	C-20011	PromoCell
Kryoeinbettmedium	TissueTek® O.C.T. TMCompound; Lot: 1626101005	Sakura Finetek Germany GmbH
PapPen (ImmEdge)	H-4000	Vector Laboratories
Paraffin	39502004	McCormick scientific
Penicillin/Streptomycin	15140-122	Thermo Fischer
Saffron du Gâtinais (250 ml)	5A-394	Waldeck
SupplementMix	C-39016	PromoCell
Xylol	131769.1612; Lot: 0001124397	PanReac AppliChem

2.1.2 Biologisches Material

Eingeschlossen wurden Patientinnen, bei denen eine vaginale Hysterektomie am Department für Frauengesundheit Tübingen erfolgte. Zu den Indikationen für die Hysterektomie zählten 14 Patientinnen mit Deszensus vaginalis et uteri, eine Patientin mit Pulsionszystozele (014), eine Patientin mit Totalprolaps und Myom des Fundus (023) und eine Patientin mit Hypermenorrhoe (028). Onkologische Erkrankungen führten zum Ausschluss aus der Studie. Zum Zeitpunkt der Entnahme waren alle bis auf zwei Patientinnen (017, 028) postmenopausal. Das durchschnittliche Alter betrug 64,58 Jahre (36 bis 79 Jahre). Für den Hauptversuch (3.3.1) ergab sich für den kINPen® ein Durchschnitt von 61 Jahren (36 bis 78 Jahre) und für das APCIII ein Durchschnitt von 62,4 Jahren (46 bis 79 Jahre). Gewebe, dessen Epithel nicht rosig und intakt war oder ein abnormes Erscheinungsbild präsentierte, wurde aus der Studie ausgeschlossen.

2.1.3 Laborzubehör

Tabelle 3: Benutztes Zubehör

Name	Artikelnummer	Hersteller
Chirurgisches Einmalskalpell	BA221; Lot: 4508952742	B-Braun; Aesculap AG
Einbettkassetten	Lot: 031801	R. Langenbrick
Einmalplastikpinzetten	H7 301; Lot: 20170316	MediWare
Falcons 50ml		
Gießformen (Metall)		
Gießformen (Plastik)	Verschiedene Größen	
Glaspipetten	Verschiedene Größen	
Objektträger	03-0060; Lot: 070816	R. Langenbrick
Pasteurpipetten (Plastik)	ST2600111	neoLab
Petrischalen		
Glasküvetten		
Deckgläser	Verschiedene Größen	

2.1.4 Laborgerät

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Gerät	Produktname	Hersteller
Abzug	Captair M321	Erlab
Feinwaage	M-Power	Sartorius
Gefrierschrank -20°C	Froster Labo 730	Kirsch
Gefrierschrank -80°C	Hera Freezer HFU700TV60	Thermo Scientific
Kryotom 1	2800 Frigocut E	Reichert-Jung
Kryotom 2	Microm HM 560	Thermo Scientific
Kühlschrank 4°C „Fridge 1“	FKS 3600	Liebherr
Kühlschrank mit Gefrierfach „Histo“	Comfort	Liebherr
Laserthermometer	Infrarot-Temperaturmessgerät	Owim GmbH & Co. KG
Mikroskop u. Lichtquelle - Stereo-	Discovery.V12 CL 1500 ECO	Carl Zeiss

Mikrotom	Microm HM 340E STS III Cool Cut	Thermo Scientific
Paraffineinbettmaschine	STP120	Thermo FischerScientific
Paraffinstation	EG 1160	Leica
Plasmagerät 1	kINPen® MED	Neoplas Tools
Plasmagerät 2	VIO® 3, APCIII	Erbe Elektromedizin
Raman-Mikrospektroskop	alpha 300 R	WiTec

2.1.5 Software

Tabelle 5: Eingesetzte Software für Messungen und Analyse

Bezeichnung	Produktname	Hersteller
Analysesoftware	TheUnscrambler X 10.5	camo
Bildverarbeitungsprogramm	ImageJ	Wayne Rasband (NIH)
Mikroskopie-Programm	ZEN Blue	Carl Zeiss
Programmiersoftware	MatLab R2018a	The MathWorks
Raman-Analyseprogramm	Project FIVE 5.0	WiTec
Raman-Messprogramm	Control FIVE 5.0	WiTec
Statistikprogramm	GraphPad Prism 6.0	GraphPad software

2.2 Methoden

2.2.1 Probengewinnung und -behandlung

Gesundes mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel von zervikalen Uterusproben wurde im Rahmen anderweitig indizierter operativer Eingriffe am Department für Frauengesundheit Tübingen gewonnen. Die Verarbeitung des Gewebes erfolgte nach informierter Einwilligung der Patientinnen. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen beraten (649-2017B02). Makroskopisch unauffällige Gewebeanteile wurden fachärztlich identifiziert und für die Studie perioperativ gewonnen. Der Transport der Proben erfolgte in sterilem DPBS bei 4 °C. Alle Proben wurden, wie folgt, innerhalb einer Stunde nach Entnahme behandelt:

Tabelle 6: Aufstellung aller verwendeter Gewebeproben und deren initialer Verarbeitung.

Behandlungszeit für physikalisches Plasma und Kontrolle entsprachen einander. Bis 017 erfolgte die Behandlung mittels kINPen®; ab 022 mittels APCIII. Nativ = ohne Behandlung, sup. = superfizielle Behandlung, u.B. = Behandlung unter kontinuierlicher Bewegung, punktuell = punktuelle Behandlung, frisch = keine Konservierung, kryo = Kryokonservierung, para = Paraffineinbettung.

Probennummer	Behandlung	Konservierung	24 h Test
002	nativ	frisch, para, kryo	nein
006	sup. punktuell: 5 min	para, kryo	nein
012	sup. u.B. 5 min	para, kryo	nein
013	sup. u.B. 5 min	kryo	ja
014	sup. u.B. 5 min	kryo	ja
015	sup. u.B. 5 min	kryo	ja
016	sup. u.B. 5 min	kryo	ja
017	sup. u.B. 5 min	kryo	ja
022	sup. u.B. 2 u. 5 min	kryo	ja
023	sup. u.B. 2 u. 5 min	kryo	ja
024	sup. u.B. 2 min	kryo	ja
025	sup. u.B. 2 min	kryo	ja
026	sup. u.B. 2 min	kryo	ja
027	sup. u.B. 2 u. 5 min	kryo	ja
028	sup. u.B. 2 u. 5 min	kryo	ja
029	sup. u.B. 5 min	kryo	ja
031	sup. u.B. 5 min	kryo	ja

Die Verarbeitung erfolgte semisteril in einer Petrischale, wobei die Gewebeproben kontinuierlich mit DPBS feucht gehalten wurden. Das Gewebe wurde im Weiteren mit einem Einmalskalpell in zwei vergleichbare Stücke

geteilt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Integrität erhalten blieb und die Gewebestücke in ihrer Beschaffenheit einander ähnlich waren. Die Behandlung mit kINPen® (Gasfluss 4 l/min, Spannung 65 V, Frequenz 1,1 MHz) oder APCIII (Gasfluss 1,6 l/min, Leistungsabgabe maximal 2 W, „precise APC“-Modus) erfolgte mit einer Ausnahme (006 punktuell) unter gleichförmigen Bewegungen in einem Abstand von rund 7 mm. Die Behandlungsdauer war dabei entweder zwei oder fünf min und erfolgte in 30-Sekundenintervallen, wobei das Gewebe in jeder Pause mit DPBS befeuchtet wurde (siehe Tabelle 6). Für die Kontrollgewebe des kINPen® wurde die Energetisierung des Argongasstroms deaktiviert; für die des APCIII wurden die Gewebeprobe lediglich für denselben Zeitraum DPBS-befeuchtet an der Luft belassen, da eine Gasapplikation ohne Plasmazündung nicht möglich war. Die erwähnte punktuelle Behandlung mit dem kINPen® wurde durchgeführt, um eine mögliche Ausdehnung zu beurteilen. Allerdings war ein markerloses Wiederauffinden der behandelten Stelle in der weiteren Prozessierung zu unzuverlässig. Anschließend wurden die behandelten Proben für die verschiedenen Versuchsansätze in kleinere Stücke geteilt (~ 3-5 * 10 * 10 mm – Höhe * Breite * Länge), wobei die Fläche des Epithels durch die Breite und Länge definiert war. Ein Teil der Proben wurde für 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und feuchter Atmosphäre in keratinocyte growth factor 2 mit SupplementMix, CaCl Lösung und Penicillin/Streptomycin (Mischung nach Herstellerangaben) inkubiert, bevor sie ebenfalls konserviert wurden (Tabelle 6).

2.2.1.1 Temperaturbestimmung

Zur genauen Beurteilung der thermischen Verhältnisse, die sich durch das APCIII ergeben, erfolgte im Rahmen der Versuchsreihe die Bestimmung der Temperatur. Die Messung selbst wurde mit einem Laserthermometer (Owim GmbH & Co. KG) durchgeführt, wobei die Temperatur vor Beginn der Behandlung als Referenz diente. Für die Befeuchtung des Gewebes wurde nur DPBS verwendet, welches sich auf Raumtemperatur befand. Eine Messung erfolgte nach jedem Behandlungsintervall (30 Sekunden) vor erneuter

Befeuchtung. Der gesamte Messzeitraum belief sich dabei auf zwei min. Insgesamt erfolgten drei Messwiederholungen, die anschließend gemittelt wurden.

2.2.2 Schnittherstellung

2.2.2.1 Paraffinschnitte

Die vorbereiteten Proben wurden je nach Größe in 10 - 15 ml 4 % Paraformaldehyd (PFA) eingelegt und über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Nach darauffolgender Inkubation in 20 ml DPBS für die gleiche Zeit, erfolgte die Paraffinierung der Proben. Für jeweils eine Stunde durchliefen die Gewebeproben in nachstehender Reihenfolge Ethanol (70 %, 90 %, 96 %), zwei Mal 2-Propanol (100 %), 1:1 Xylol/2-Propanol, zwei Mal Xylol, zwei Mal Paraffin (bei 60 °C). Nach Paraffinierung wurden die Proben direkt in Paraffinblöcke gegossen, wobei die Ausrichtung des Epithels senkrecht zur späteren Schnittfläche verlief. Nach Aushärten des Blockes wurden Schnitte mit einem Mikrotom angefertigt, die anschließend für mindestens eine Stunde auf einer Wärmeplatte bei 37 °C verblieben. Die Lagerung erfolgte im 4 °C kalten Kühlschrank. Für die Entparaffinierung wurde eine Verdünnungsreihe mit Ethanol vorbereitet. Danach durchliefen die Sektionen jeweils 2 Bäder in angegebener Reihenfolge Xylol, 100 % Ethanol, 96 % Ethanol, 70 % Ethanol, 50 % Ethanol und DPBS. Die Objektträger wurden so in die Behälter gestellt, dass sie komplett mit Flüssigkeit bedeckt waren und verblieben dort für jeweils fünf min und zuletzt in DPBS bis zur Weiterverarbeitung. Zu messende Proben wurden aus der DPBS genommen und der Rand um das Gewebe herum vorsichtig gesäubert. Um Austrocknung zu vermeiden, wurde die Probe in sicherem Abstand mit einem Pap-Pen umrandet und sofort wieder mit DPBS befeuchtet.

2.2.2.2 Kryoschnitte

Eine Gießform aus Plastik wurde mit Kryoeinbettmedium befüllt, worin die zugeschnittenen Gewebeproben mit der epithelialen Fläche orthogonal zum Boden des Gefäßes standen. Somit war die Epithelschicht senkrecht zur späteren Schnittfläche. Nach fünf bis zehn min im Medium wurde die Kryokonservierung im -80 °C Gefrierschrank durchgeführt. Das Gewebe verblieb dort für mindestens eine Nacht. Die Herstellung der Schnitte erfolgte mittels Kryotom. Pro Ansatz wurden mindestens vier Schnitte hergestellt, welche anschließend bei -20 °C aufbewahrt wurden. Zur Weiterverarbeitung wurde nach Trocknen des Objektträgerrandes die Probe mit einem Pap-Pen umzeichnet und steril mit DPBS fünfmal gewaschen. Nach Abwaschen des Kryoeinbettmediums wurde die Gewebeprobe kontinuierlich nass gehalten.

2.2.3 Raman-Mikrospektroskopie

Alle Messungen wurden mit einem kommerziell erworbenen Raman-Mikrospektroskop (alpha 300 R, WITec), ausgestattet mit einem grünen Laser der Wellenlänge 532 nm, und der Software Control FIVE 5.0 (WITec, Ulm, Deutschland) durchgeführt. Zur Dokumentation und Identifikation der Messregion und -tiefe wurden mit 10-fachen und 50-fachen (frisches Gewebe) oder 63-fachen (Gewebeschnitte) Objektiven das zu untersuchende Epithel in der Hellfeldeinstellung aufgenommen.

Für den Vergleich zwischen frischem, kryokonserviertem und Paraffin eingebettetem Gewebe erfolgten Messungen mit der Größe von 20 x 20 µm, einer Schrittweite der Messpunkte von 1 µm horizontal wie senkrecht und einer Messdauer pro Punkt von 1 s. Hierbei wurde das frische Gewebe bei 50-facher Vergrößerung und die Gewebeschnitte bei 63-facher Vergrößerung im Stratum intermediale gemessen.

Zur Beurteilung der funktionellen Gewebepenetration der verwendeten Niedertemperaturplasmen erfolgten Messungen an kryokonservierten Schnitten mit einer Größe von 50 x 50 µm, einer Schrittweite von 0,5 µm und einer Messdauer pro Punkt von 0,1 s. Aufgrund des Pathomechanismus der CIN und

als Positivkontrolle wurden je zwei Messungen in der Superfzialschicht (spindelförmige Zellen mit kleinem Zellkern) bzw. der Basalschicht (kuboide Zellen mit großem Zellkern) durchgeführt. Vor jeder Versuchsreihe erfolgte eine Probemessung. So konnte auch die Art des Gewebeschnittes (Querschnitte) bestimmt werden, mit welchem der größte Informationsgewinn möglich war. Messungen wurden nur dann eingeschlossen, wenn sie weitgehend störungsfrei und der Schnitt flach und nahezu lückenlos war.

Über den Lasergenerator wird monochromatisches Licht erzeugt, welches durch das Objektiv auf das Gewebe fällt. Durch den beschriebenen Raman-Effekt (1.4) kommt es zum Energieaustausch der Photonen mit dem Gewebe. Durch die Änderung der Wellenlänge entsteht polychromatisches Licht. Dieses verläuft geradlinig durch den dichroitischen Spiegel und wird über einen Kerbfilter in monochromatisches Licht (dem Lasergenerator entsprechende Wellenlänge) und erregtes Licht (differierende Wellenlängen) aufgetrennt. Die modulierten Photonen werden durch eine Lochblende gebündelt, vom Spektrographen aufgenommen und in ein elektrisches Signal umgewandelt (Abbildung 7). Die Umwandlung erfolgt dabei an einem ladungsgekoppelten Bauteil (Charge-coupled device = CCD). Dieses besitzt Fotodioden, welche Energie von Photonen aufnehmen und dadurch die Wellenlänge bestimmen können. Die gängige Einheit bei der Raman-Mikrospektroskopie sind CCD-counts (Y-Achse), also die Anzahl der gemessenen Photonen einer bestimmten Wellenlänge. Anschließend werden die gemessenen Wellenlängen zur Wellenlänge des verwendeten Lasers relativiert und es kommt zur sogenannten Wellennummer (X-Achse).

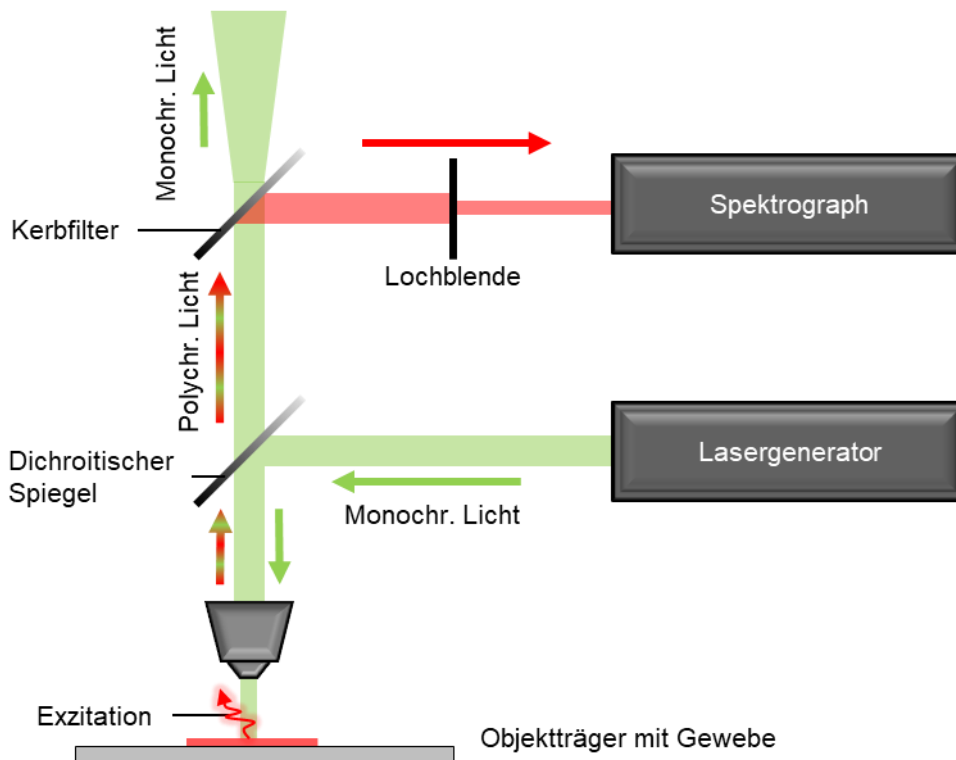


Abbildung 7: Schematischer Aufbau des Raman-Mikrospektroskops.

Über den Lasergenerator wird monochromatisches Licht erzeugt (Monochr. Licht), welches durch ein Objektiv auf das Gewebe fällt. Durch die Exzitation der Photonen am Gewebe entsteht polychromatisches Licht (polychr. Licht). Dieses verläuft geradlinig durch den dichroitischen Spiegel und wird über einen Kerbfilter in monochromatisches Licht (dem Lasergenerator entsprechende Wellenlänge) und angeregtes Licht (differierende Wellenlängen) aufgetrennt. Die gestreuten Photonen werden durch eine Lochblende gebündelt vom Spektrographen aufgenommen und in ein elektrisches Signal umgewandelt. (Modifiziert publiziert in (Wenzel et al., 2019, 2020)).

2.2.4 Auswertung der Raman-Messungen

Sämtliche Raman-Messungen wurden vor der Auswertung vorbehandelt. Hierfür erfolgte eine Hintergrundkorrektur und eine Reduktion der kosmischen Strahlung mit dem Programm Project FIVE 5.0 (WITec). Die Messungen wurden in ihrer Höhe auf 30 µm zugeschnitten, um Messartefakte und -ungenauigkeiten zu reduzieren. Anschließend wurden die Daten einer Messkondition (Zeitpunkt, Behandlungsdauer und Zellschicht) horizontal nebeneinander zusammengefügt mit Ausnahme des Vergleichs der Konservierungsmethode und der Messtiefenbestimmung.

2.2.4.1 Bildanalyse

2.2.4.1.1 Vergleich der Konservierungsmethoden

Um eine Aussage über die Raman-Eignung der Konservierung treffen zu können, wurde für alle Spektren einer Messung ein Durchschnittsspektrum erzeugt. Die gewonnenen Spektren wurden in eine gemeinsame Grafik eingespeist und anschließend anhand der Kriterien: Intensität, Präzision der Banden, Hintergrundrauschen und Gewebebelastung der Methode miteinander verglichen. Als Referenz für die Normalisierung diente hierbei die Laserbande (0 – 100 rel. cm^{-1}).

2.2.4.1.2 Identifikation der Komponenten

Zur genauen Auswertung der Proben wurden die am meisten vertretenen spektralen Signaturen des Epithels bestimmt. Dies wurde über die TCA (True Component Analysis) erreicht. Datenpunkte mit besonders hohem Gehalt spezifischer Banden konnten so den zellulären Bestandteilen des Epithels (DNA, Lipide, Glykogen, endoplasmatisches Retikulum, Proteine und Kollagen) zugeordnet werden. Die gewonnenen Spektren wurden über den gesamten Messbereich gemittelt, bevor sie aus der Messung als Spektrum extrahiert wurden. Zuletzt erfolgte die Korrektur des jeweiligen Hintergrunds. Für die ausgelesenen Spektren wurden Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt.

2.2.4.1.3 Intensitäten der Komponenten

Für jede Kondition wurden die Komponenten der Kontrollen ($n = 5$), wie im Absatz zuvor beschrieben, identifiziert und aus der Messung als Raman-Bild und als Spektrum ausgelesen, welches anschließend als Referenzspektrum in die korrespondierenden Messungen von plasmabehandelten Gewebeproben eingesetzt wurde. Für die Kontrollspektren wurden Grafiken von plasmabehandeltem Gewebe mit gleichen CCD count-Einstellungen (0 – 10000) ausgelesen. Die gewonnenen Grafiken wurden mittels ImageJ (Wayne

Rasband) zu 8-Bit konvertiert, dunkle Areale ausgeschlossen (Grenzbereich 5 – 255) und letztlich der durchschnittliche Grauwert (mean grey value, MGV) bestimmt. Für diese wurden pro Kondition der Durchschnitt und die Standardabweichung bestimmt, bevor sie zur Darstellung auf die jeweilige Kontrolle genormt wurden.

2.2.4.1.4 Messtiefenbestimmung

Die Berechnung der Messtiefe erfolgte für alle Proben, die eine fünfminütige Plasmabehandlung erhielten und in die PCA (Principal Component Analysis) eingingen (013 - 017, 023, 027 - 029, 031). Hierfür wurden die Messregionen der Basalschichtmessungen in die angefertigten Hellfeldaufnahmen projiziert (Project FIVE 5.0). Nachfolgend wurde eine Orthogonale von der Basalzellschicht im Messbereich zum Stratum superfiziale ermittelt und anschließend über den angelegten Maßstab die Distanz bzw. Länge bestimmt. Dies geschah für beide Messwiederholungen pro Kondition, wodurch sich insgesamt zehn Tiefenmessungen pro Gerät ergaben. Die gesammelten Werte wurden anschließend gemittelt, die Standardabweichung bestimmt und nach Geräten (kINPen® und APCIII) getrennt. Zusätzlich wurden die gewonnenen Scores aus den PCAs der basalen Komponenten (DNA und Lipide) für beide Zeitpunkte ins Verhältnis zueinander gesetzt.

2.2.4.2 Principal Component Analysis (PCA)

2.2.4.2.1 Veränderung nach fünfminütiger Behandlung

Als Vorbereitung für die PCA wurden Filter (DNA: 785 ± 5 rel. cm^{-1} , Lipide: 2850 ± 5 rel. cm^{-1}) angelegt, um innerhalb der Raman-Bilder die Datenpunkte mit hoher Intensität in diesem Wellennummerbereich zu identifizieren und anschließend zu extrahieren. Hieraus ergaben sich je Kondition 200 - 300 Datenpunkte, von denen mittels MatLab R2018a (The MathWorks) 50 (100 beim Vergleich der Zellschichten) pro Kondition zufällig ausgelesen wurden. Für jede Probe wurde zu unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten mit dem

Programm The Unscrambler X 10.5 (Camo) und dem NIPALS Algorithmus eine eigständige PCA errechnet. Ausreißer wurde mit Hotelling's T² Test ausgeschlossen. Die entstandenen Vektoren repräsentierten absteigend den größten Unterschied zwischen den eingespeisten Daten und wurden als Hauptkomponenten (PC) beschrieben, von denen sieben errechnet wurden. Alle Proben eines Versuches wurden nachfolgend zusammengeführt und gingen in die Auswertung ein. Für die statistische Auswertung wurden für beide Geräte jeweils Loadings und Scores der PCs ausgelesen, die den größten Unterschied in den Behandlungsgruppen darstellten und ebenso in den Loadings vergleichbar waren.

2.2.4.2.2 Unterscheidung von superfizialer und basaler Zellschicht

Für die Unterscheidung der Zellschichten wurden folgende Anpassungen vorgenommen. Die Anzahl der zufällig ausgewählten Spektren pro Kondition betrug statt 50, 100. Zudem wurden nur die Kontrollen der Proben 013 - 017 eingeschlossen, welche dann in die Gruppen, superfiziale und basale Zellschicht, unterteilt waren und lediglich auf DNA-Basis verglichen wurden. Die Einteilung erfolgte in der Hellfeldmikroskopie, in der sich superfiziale Zellen flach und oberflächennah präsentierten. Hingegen stellten sich Zellen der Basalschicht hochprismatische und bindegewebsnah dar (vgl. Abbildung 1 und Anhang 1).

2.2.4.2.3 Vergleich bei unterschiedlicher Behandlungsdauer

Um über die Bedeutung der Behandlungsdauer eine Aussage zu treffen, wurden sowohl zweiminütig als auch fünfminütig APCIII-behandelte Gewebe mit der Kontrolle verglichen. In einem Vorversuch wurde dies mit einer Probe (023) zum Zeitpunkt 0 h getestet und anschließend um zwei weitere Proben und den Zeitpunkt 24 h ergänzt. Insgesamt erfolgte der Versuch für drei Proben (023, 027, 028). Das weitere Vorgehen entsprach dem oben Beschriebenen (2.2.4.2).

2.2.4.2.4 Gegenüberstellung von kINPen® und APCIII

Von besonderem Interesse war ein Vergleich zwischen den Geräten. Hierfür wurden nur die fünfminütig behandelten Gewebeschnitte der PCA zugeführt. Zudem wurden die Daten getrennt nach Kondition (Zeitpunkt und Zellschicht) in einer PCA gesammelt analysiert, da es sich um Zervixgewebe unterschiedlicher Probandinnen handelte und so keine patientenspezifische Gegenüberstellung möglich war. Auch hier entsprach das weitere Vorgehen dem oben Beschriebenen (2.2.4.2).

2.2.4.3 Statistische Auswertung

Statistische Auswertungen wurden mit Prism 6 (GraphPad) vorgenommen. Die Auswertung der Bildanalyse erfolgte über einen Wilcoxon Vorzeichen Rang Test, der für jede Komponente und Kondition durchgeführt wurde. Die Tests wurden mit den erzeugten MGVs durchgeführt.

Zur Vergleichbarkeit wurden für alle weiteren Versuche die PCs in dieselbe Ausrichtung gebracht, sodass die behandelten Gewebeproben im positiven und die Kontrollen im negativen Y-Achsenabschnitt lagen. Hieraus ergab sich, dass die Versuche aufgrund der Vorbereitung als einseitige Tests durchgeführt wurden. Dadurch, dass die PCA ein Verfahren zur Abbildung eines Unterschiedes ist, wurden sämtliche Ansätze folglich auf die Kontrolle genullt, um eine bessere Darstellung zu gewährleisten. Dieses galt nicht für die Unterscheidung der Zellschichten (2.2.4.2.2), Vorversuch zur Behandlungsdauer (2.2.4.2.3) und den Vergleich der Geräte (2.2.4.2.4), welcher mittels Mann-Whitney Test statistisch ausgewertet wurde. Der Wilcoxon Vorzeichen Rang Test wurde für den Vergleich von fünfminütig behandelten Proben (2.2.4.2.1) und für die Unterscheidung der Zellschichten verwendet. Die Auswertung des Versuchs zu unterschiedlichen Behandlungsdauern und Inkubationszeit (3.3.3) erfolgte durch einen Friedman Test. Für alle Statistiken wurden aus den Scores der PCAs jeweils Mittelwerte errechnet, die als Datenpunkte dienten und mit Ausnahme des Gerätevergleichs als gepaarte Werte (vor und nach Behandlung) in die

Auswertung eingingen. Generell wurden p-Werte < 0,05 als statistisch signifikant gewertet.

2.2.5 Histologie

Zur histologischen Beurteilung der TCA wurde eine Russell-Movat-Pentachrom-Färbung durchgeführt. Hierfür wurde von jeder Kondition eine Färbung hergestellt. Zunächst wurden die Kryoschnitte zweimalig für je fünf min in kaltem (4 - 6 °C) DPBS inkubiert, um das Einbettmedium auszuwaschen. Anschließend fünf min in vollentsalztes Wasser (VE-Wasser), bevor sie für 20 min in 4-%-iges PFA (4 - 6 °C) überführt wurden. Nach einer ein- bis zweiminütigen Wäsche mit DPBS begann der Färbeprozess. Kurz zuvor wurde hierfür noch die Verhöff-Elastik-Färbelösung (50 ml 10 % alkoholische Hämatoxylin-Lösung, 50 ml Ethanol absolut, 50 ml 10 % Eisenchlorid-Lösung, 50 ml Jod-/ Jodkalium-Lösung) angesetzt und sogleich verwendet.

Tabelle 7: Ablaufplan der Russell-Movat-Pentachrom-Färbung.
Zusammengehörige Schritte eines Färbeschrittes sind entsprechend hinterlegt.

Zeitablauf	Lösung	Ziel
45 min	Verhoeff's Färbelösung	Färbung
5 min	Fließendes, lauwarmes Leitungswasser	Spülen
Kurz	VE-Wasser	
1-2 min	2 % Eisenchlorid	Differenzieren
Kurz	VE-Wasser	Spülen
1 min	5 % Na-Thiosulfat	Spülen
5 min	Fließendes Leitungswasser	Spülen
3 min	3 % Essigsäure	Ansäuern für nächste Färbelösung
30 min	1 % Alcianblau pH 2.5	Färbung

1 min	Fließendes, lauwarmes Leitungswasser	Spülen
Kurz	VE-Wasser	Spülen
2 min	Brilliant Crocein-Säurefuchsin	Färbung
3x kurz	VE-Wasser	Spülen
5x Eintauchen	1 % Essigsäure	Spülen
2x 2-6 min	5 % Phosphorwolframsäure	Differenzieren
5x Eintauchen	1 % Essigsäure	Spülen
3x 3 min	EtOH abs. (frisch)	Spülen und Entwässern
30 min	Saffron-Lösung	Färbung
3x 3 min	EtOH abs. (frisch)	Spülen
2x 5 min	2-Propanol abs.	Klären
	Isomount	Eindecken

Direkt im Anschluss an die Färbung wurden die Objektträger waagrecht unter Ausschluss von Sonne gelagert. Anschließend erfolgte eine mikroskopische Aufnahme der epithelialen Strukturen mit morphologischem Vergleich zwischen plasmabehandeltem und Kontrollgewebe. Form von Zellkernen, sowie Aufbau und Abgrenzbarkeit einzelner Zellen wurden als Vergleichspunkte insbesondere hinsichtlich DNA- und Lipid-Verhalten herangezogen.

3 Ergebnisse

Einige der Ergebnisse, die in dieser Arbeit erzielt wurden, wurden bereits in zwei Publikationen veröffentlicht (Wenzel *et al.*, 2019, 2020).

3.1 Methodenetablierung

3.1.1 Vergleich der Konservierungsmethoden

Um optimale Bedingungen für die Analyse des Effekts von Niedertemperaturplasma zu schaffen, wurde im Vorfeld das Messverhalten von unterschiedlichen Konservierungsmethoden an zervikalem Primärgewebe in der Raman-Mikrospektroskopie untersucht. Es wurde (i) Frischgewebe mit (ii) paraffineingebettetem und (iii) kryokonserviertem Gewebe hinsichtlich Autofluoreszenz, Intensität von spezifischen Banden und Artefakten untersucht. Raman-Mikrospektroskopie zeigte, dass frisches Gewebe ein hohes Maß an Autofluoreszenz im gewebecharakteristischen Abschnitt (400 rel. cm^{-1} bis $1800 \text{ rel. cm}^{-1}$) des Spektrogramms erzeugt, welche auch nach Korrektur des Hintergrunds vor allem im Bereich der Wellennummern $1400 \text{ rel. cm}^{-1}$ bis $2500 \text{ rel. cm}^{-1}$ zu finden war (Abbildung 8). Insbesondere führte die starke Korrektur zu einer eingeschränkten Beurteilbarkeit der gewebecharakteristischen Abschnitte. Bei Gegenüberstellung von kryokonservierten und paraffineingebetteten Gewebeproben zeigten beide Methoden im Intensitätsvergleich, welchem die Laserbande als Referenz zugrunde gelegt war, zumeist überlappende Kurvenverläufe (Abbildung 9). Resultierend waren die Methoden bezüglich Stärke der Intensität und Präzision von Banden gleichwertig. Paraffingewebe wies charakteristische Paraffinbanden bei 887, 1060, 1126, 1171, 1295, 1417 und $1440 \text{ rel. cm}^{-1}$ auf. Ein möglicher signifikanter Einfluss in der hoch sensitiven Detektion von plasmazuspezifischen Veränderungen konnte nicht ausgeschlossen werden, was zur Vermeidung der Paraffineinbettung für alle weiteren Versuche führte.

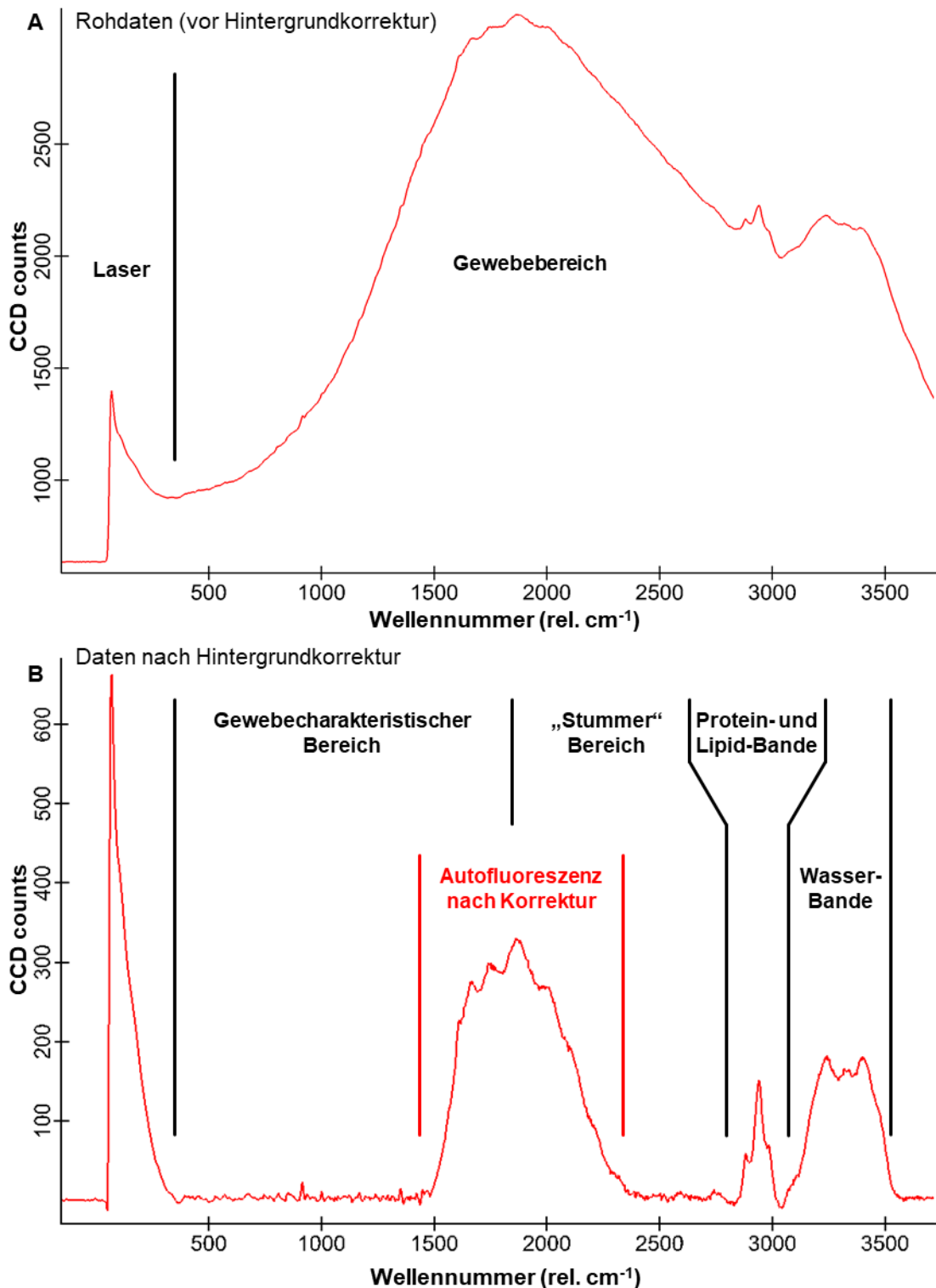


Abbildung 8: Raman-Spektrum der frischen, unbehandelten Probe 002.

A: Rohdaten vor Hintergrundkorrektur. Starke Überlagerung des gesamten Spektrums durch Autofluoreszenz B: Daten nach Hintergrundkorrektur. Die charakteristischen Banden des Gewebes im Bereich von 400-1800 rel. cm^{-1} werden immer noch von Autofluoreszenz überlagert. Protein- und Lipid-Bande ($\sim 2800-3000 \text{ rel. cm}^{-1}$), sowie Wasser-Bande ($\sim 3000-$

3500 rel. cm^{-1}) sind nach Hintergrundkorrektur noch zu erkennen. Messung direkt nach Erhalt der Probe. Keine Behandlung.

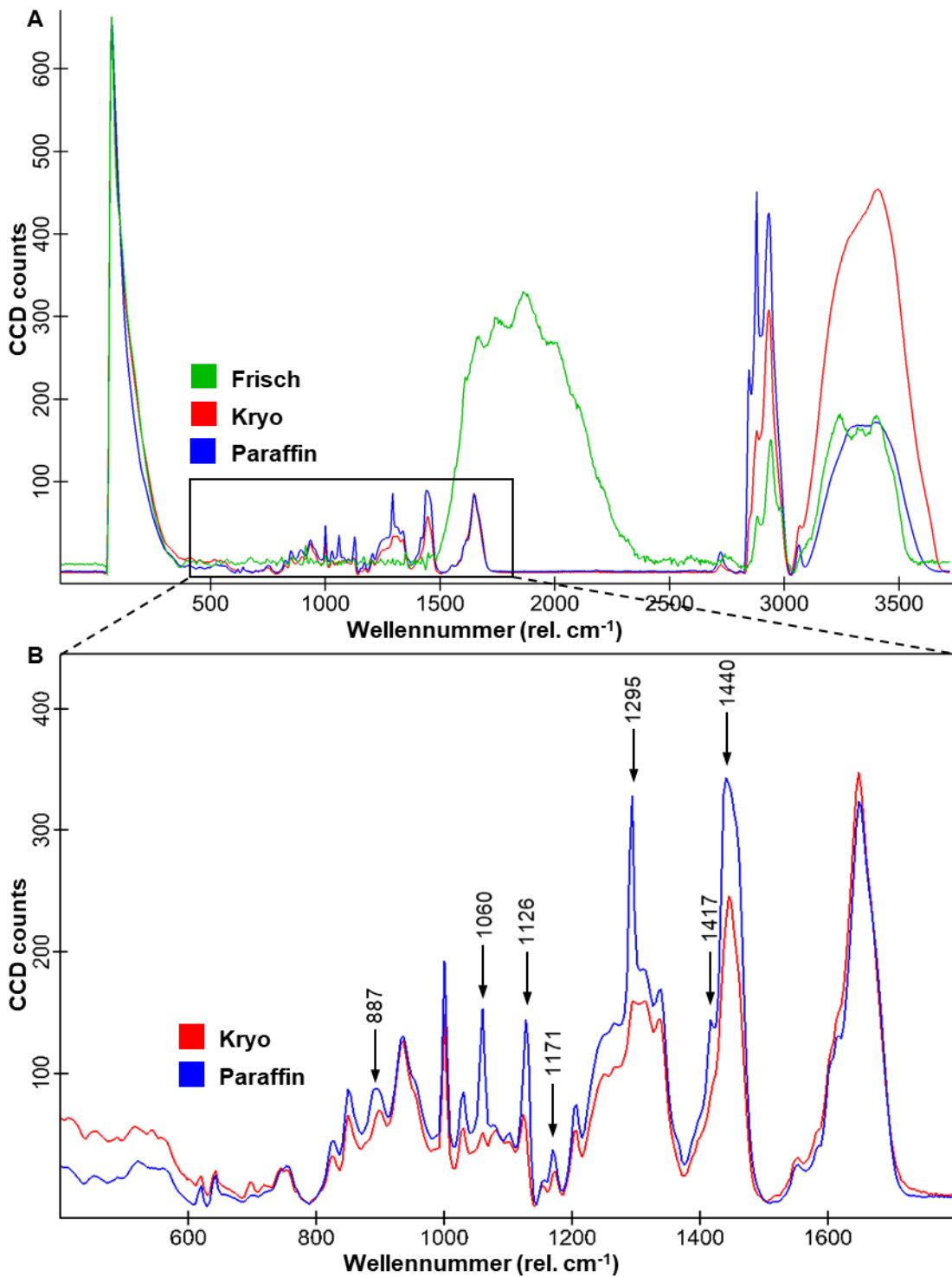


Abbildung 9: Evaluierung einer geeigneten Konservierungsmethode.

Raman-Spektren derselben Probe (unbehandelt, 002) wurden so übereinandergelegt, dass die Laserbanden deckungsgleich waren. Es erfolgte eine Untersuchung auf Intensität der

Spektren, Erkennung spezifischer Banden, sowie Störfaktoren. A: Gegenüberstellung der gemittelten Epithelmessungen von Probe 002. Paraffineinbettung zeigt höhere Banden im gewebecharakteristischen Bereich. Kryokonservierung: rot, Paraffineinbettung: blau. B: Darstellung des Wellennummernbereichs 400-1800 rel. cm^{-1} . Intensität und Erkennung von Banden ist bei beiden Konservierungsmethoden vergleichbar. Vorhandene Paraffin-Banden sind mit Pfeilen versehen und führten zum Ausschluss der Paraffineinbettung (Krishna et al., 2005; Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007).

3.1.2 Identifikation der Komponenten

Für die Identifikation der molekularen Gewebekomponenten wurde das unbehandelte Zervixepithel in Kryoschnitten per Raman-Mikrospektroskopie analysiert und die erhobenen Messdaten mit der TCA (True Component Analysis) ausgewertet. Raman Imaging ermöglichte an unbehandeltem zervikalem Gewebe die ortsspezifische Identifikation verschiedener biochemischer Gewebekomponenten sowie die Darstellung des typischen morphologischen Aufbaus des Epithels mittels der identifizierten Komponenten. Anhand spezifischer Banden konnten folgende biochemischen Gewebekomponenten identifiziert werden: Lipide (Larsson, 1973; Falamas et al., 2013), endoplasmatisches Retikulum (ER) (Prats Mateu et al., 2017), Zellkerne (DNA) (Falamas et al., 2013; Camp Jr et al., 2014) und zytoplasmatische Proteine (Ong, Lim and Liu, 2012; Falamas et al., 2013). Zusätzlich konnten in der superfizialen Schicht Glykogen (Larsson, 1973) und kaudal der Basalzellschicht im Bereich der Basallamina Kollagenfasern (Andrus and Strickland, 1998) identifiziert werden (Abbildung 10). Darüber hinaus konnte der typische histologische Aufbau eines mehrschichtig unverhornten Plattenepithels der Portio uteri anhand der unterschiedlichen gefundenen biochemischen Komponenten morphologisch abgebildet werden. Die superfiziale Schicht war durch flache und daher chromatinarme Zellen charakterisiert, in denen vergleichsweise wenig ER detektiert wurde (Abbildung 11). Des Weiteren konnten unregelmäßig mit Glykogen gefüllte Zellen identifiziert werden. Die Basalzellschicht war durch hochprismatische, Chromatin- und ER-reiche Zellen charakterisiert. Unmittelbar an die Basalzellschicht angrenzend, wurde eine Schicht aus Kollagenfasern detektiert (Abbildung 12).

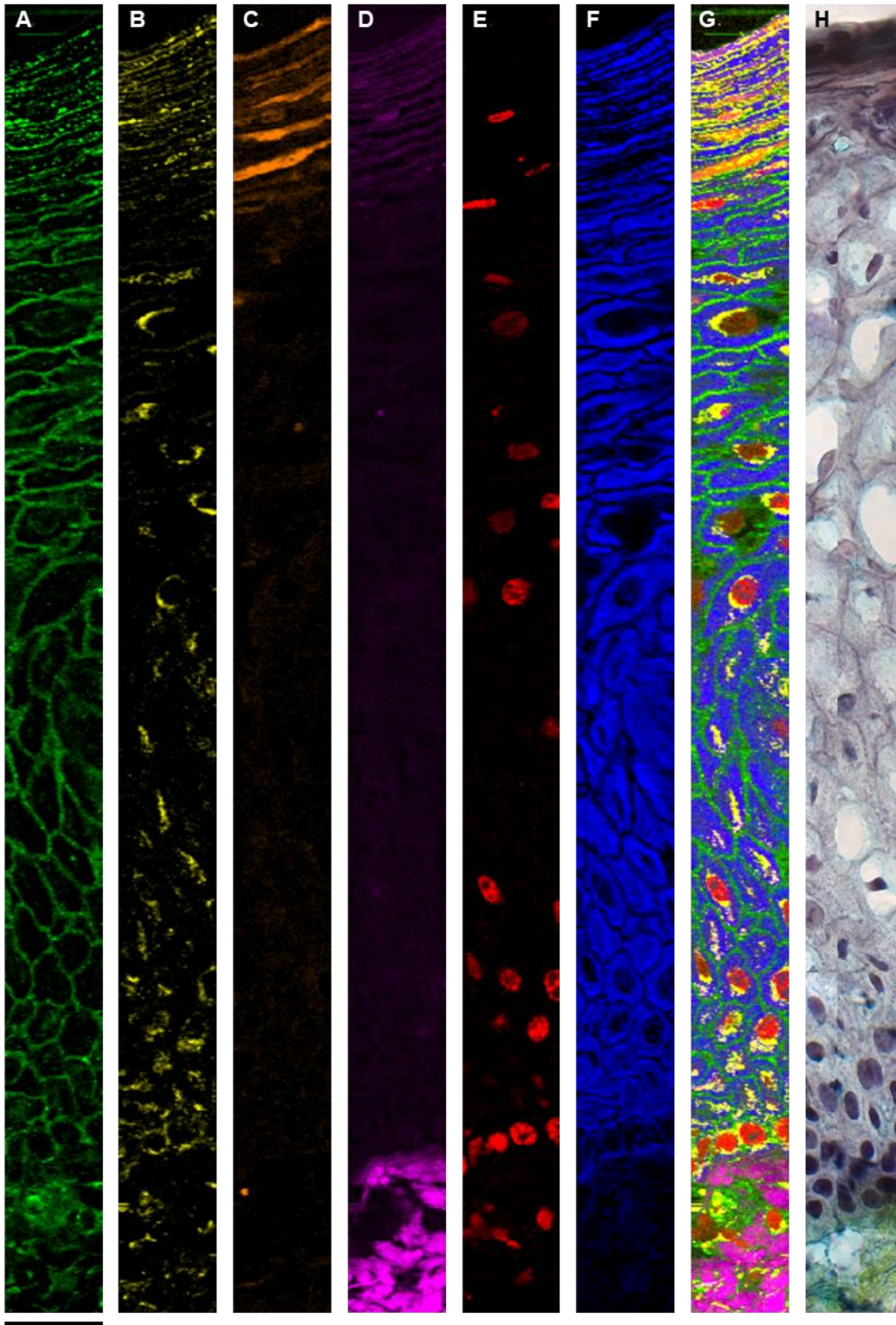


Abbildung 10: Übersichtsdarstellung des zervikalen Epithels.

A-G: Raman-Mikroskopische Darstellung der epithelialen Gewebekomponenten. Ergebnis der TCA. A: Lipide (grün), B: Endoplasmatisches Retikulum (gelb), C: Glykogen (orange), D: Kollagenfasern (pink), E: DNA (rot), F: Proteine (blau), G: Überlagerte Darstellung der Komponenten. H: Russell-Movat-Pentachrom-Färbung eines zervikalen

Epithelschnittes. Bestätigung der in der Raman-Mikrospektroskopie gefundenen Komponenten. Alle Abbildungen in 63-facher Vergrößerung. Maßstab unter A entspricht 30 μm . Unten = basale Zellschicht. (A + H bereits publiziert in (Wenzel et al., 2020)).

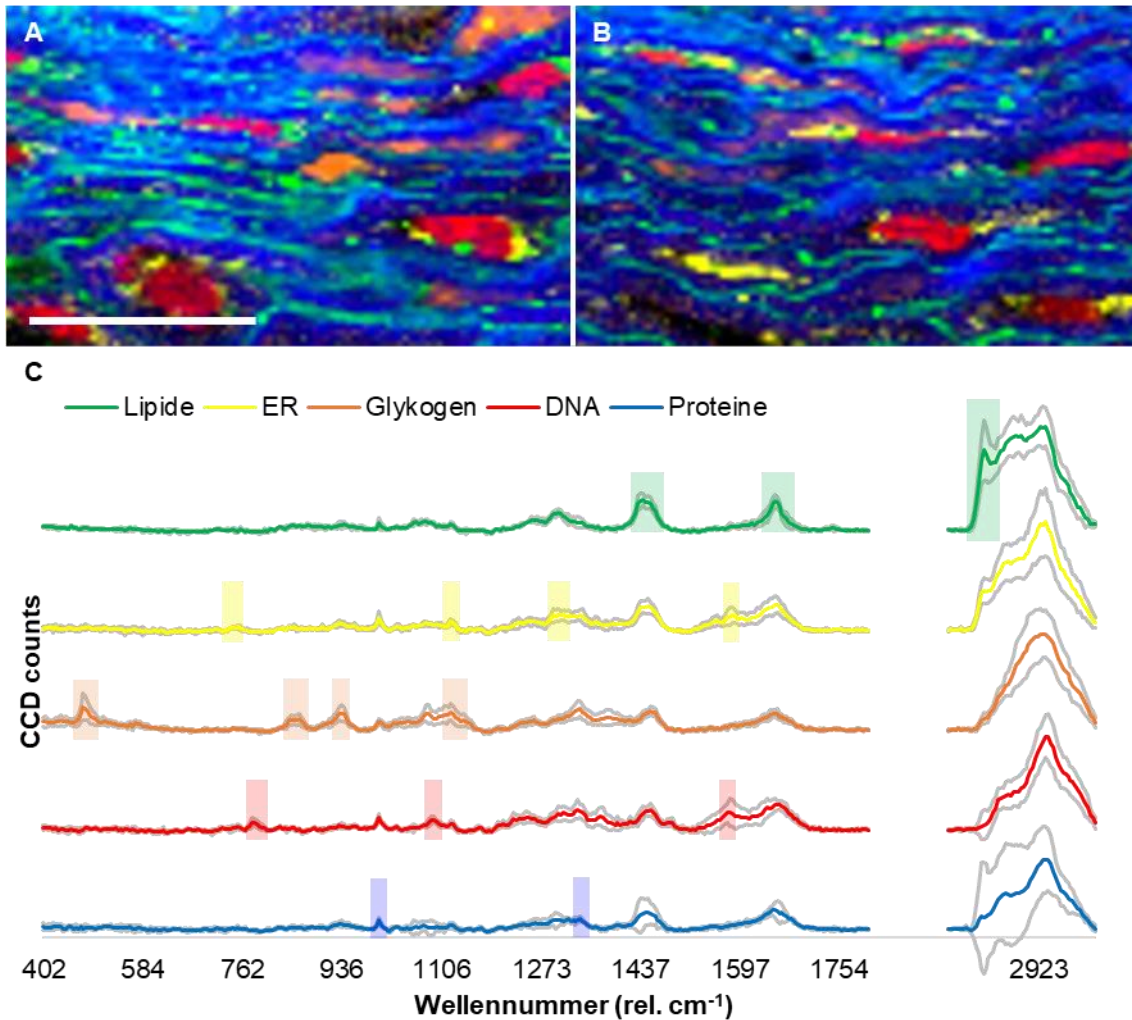


Abbildung 11: Identifizierung von superfizialen Gewebekomponenten.

A + B: Zwei unterschiedliche Raman-Darstellungen eines unbehandelten, superfizialen Gewebeabschnittes der Probe 024. Zeitpunkt 0 h. Analyse mittels True Component Analysis. Die Komponenten stimmten mit der typischen Morphologie von superfizialen Epithelschichten überein. Farbliche Kodierung der Komponenten entspricht den in C abgebildeten Spektren. Maßstabsbalken entspricht 20 μm . C: Spektren der mittels Raman-Mikrospektroskopie identifizierten zellulären Komponenten. Von oben nach unten: Lipide, Endoplasmatisches Retikulum (ER), Glykogen, DNA, Proteine. Ergebnisse der TCA bei $n = 5$. (Modifiziert nach (Wenzel et al., 2019)).

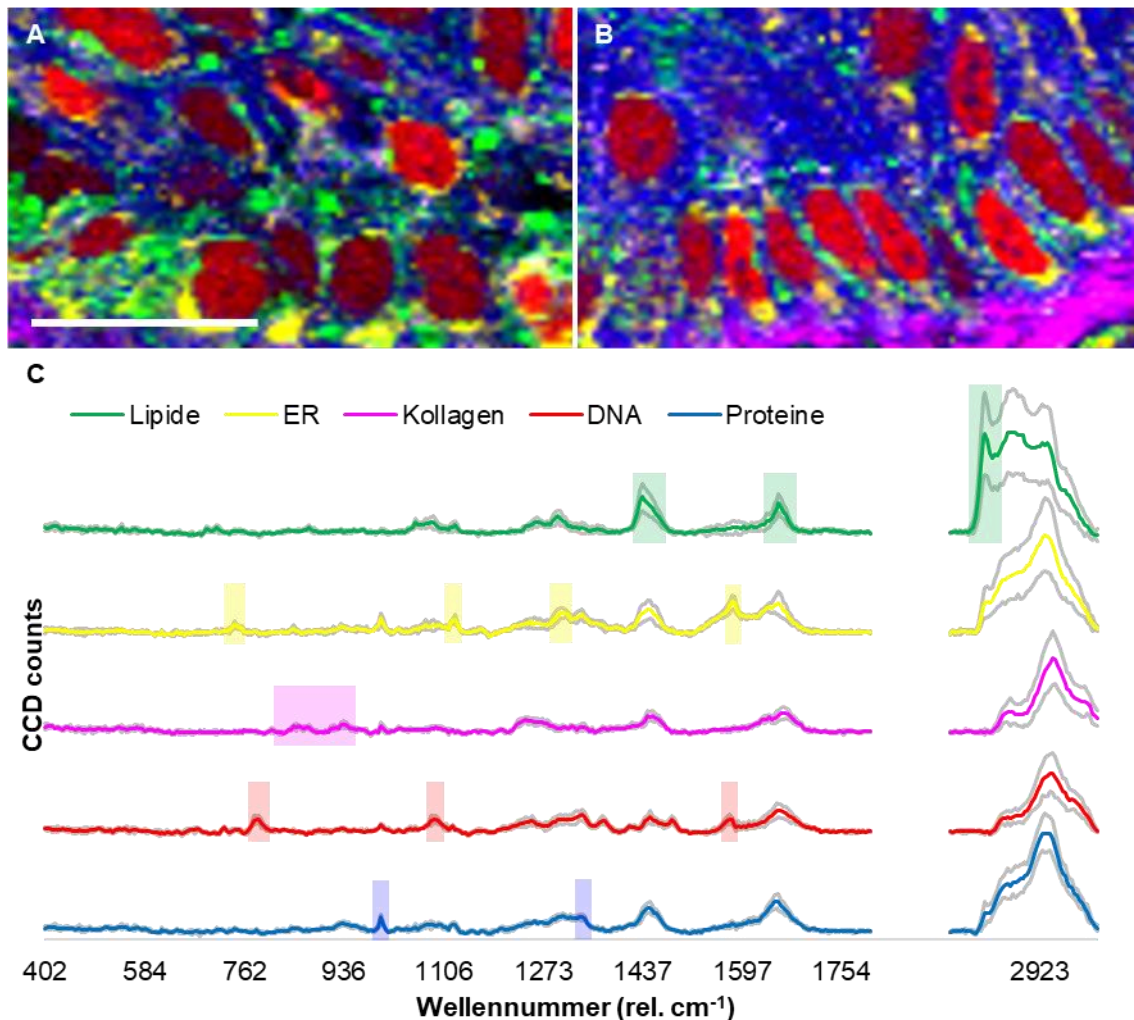


Abbildung 12: Identifizierung von basalen Gewebekomponenten.

A + B: Zwei unterschiedliche Raman-Darstellungen eines unbehandelten, basalen Gewebeabschnittes der Probe 024. Zeitpunkt 0 h. Analyse mittels True Component Analysis. Morphologie und Vorliegen von Kollagenfasern (pink) sprachen für typische Basalzellschichten. Farbliche Kodierung der Komponenten entspricht den in C abgebildeten Spektren. Maßstabsbalken entspricht 20 μm . C: Spektren der mittels Raman-Mikrospektroskopie identifizierten zellulären Komponenten. Von oben nach unten: Lipide, Endoplasmatisches Retikulum (ER), Kollagenfasern, DNA, Proteine. Ergebnisse der TCA bei $n = 5$. (Modifiziert nach (Wenzel et al., 2019)).

3.1.3 Molekulare Unterschiede der Epithelschichten

Zur Untersuchung intraindividuelle epithelschichtspezifischer Unterschiede zwischen Basalzell- (Euchromatin) und Superficialzellschicht (Heterochromatin) wurden die jeweiligen DNA-Spektren von fünf Proben extrahiert und mittels PCA (Principal Component Analysis) analysiert. Die Scores der Hauptkomponente 1 (PC-1) ergaben, dass sich die DNA-Komponenten der

vergleichenen Schichten statistisch signifikant voneinander unterscheiden (Wilcoxon Vorzeichen Rang Test: $p = 0,0313$). Auch im Dot-Plot selbst zeigte sich eine klare Verteilung der analysierten Spektren in zwei Gruppen, die sich von der Y-Achse nach links (superficial) und rechts (basal) ausbreiten (Abbildung 13C) mit nur schmalem Überlappungsbereich. In den Loadings zeigte sich die Superficialzellschicht vor allem durch die Banden 2800 bis 2940 rel. cm^{-1} (Abbildung 13D). Als Konsequenz wurden in allen nachfolgenden Experimenten superfiziale Komponenten nur mit superfizialen verglichen und basale nur mit basalen.

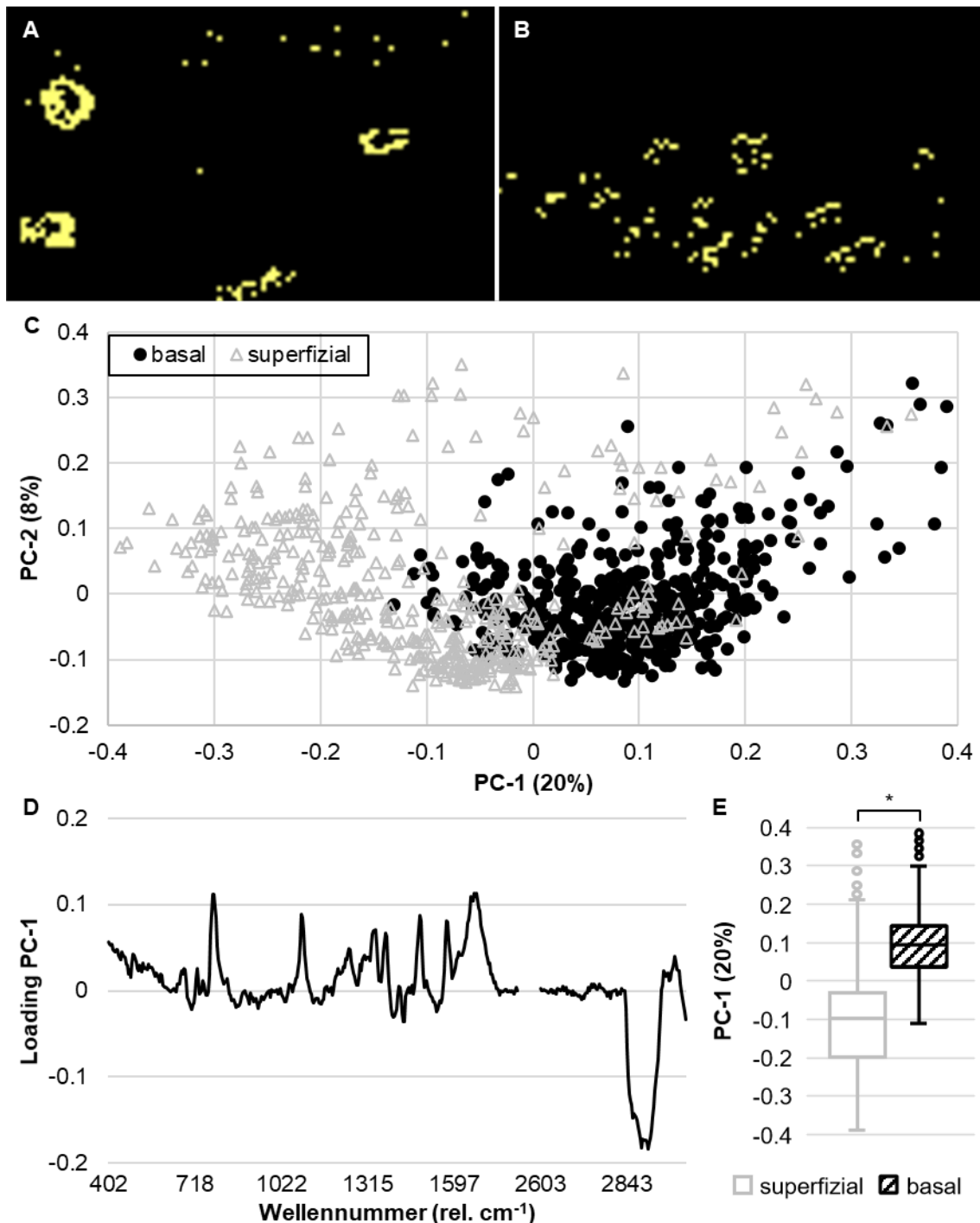


Abbildung 13: Darstellung der Unterschiede zwischen superfizialer und basaler DNA in unbehandeltem Zervixgewebe mittels Raman-Mikrospektroskopie.

A + B: Filter für die Extraktion der DNA-Spektren bei Wellennummer 785 (± 5). Die Datenpunkte wurden per Regler auf die max. 300 Repräsentativsten begrenzt A: Superfizial. B: Basal. C: Score-Plot der PCA. Auf der Hauptkomponente 1 (PC-1) ist eine klare Trennung zwischen basalen und superfizialen DNA-Spektren zu erkennen. Kreise: basale DNA, Dreiecke: superfiziale DNA. D: Loading der PC-1. E: Boxplot-Analyse der PC-1. Es ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen superfizialer und basaler DNA von unbehandelten Proben. Für die PCA wurden von fünf Patientinnen (013 - 017) je 100 Spektren zufällig aus den repräsentativsten Datenpunkten ausgewählt. Ausreißer in der PCA

wurden mittels Hotelling's T^2 -Test ausgeschlossen. Aus den errechneten Mittelwerten jeder Kondition ergab sich im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test ein $p = 0,0313$ (*). (Bereits publiziert in (Wenzel et al., 2019)).

3.1.4 Raman-gestützte Unterscheidung plasmabehandelter und Kontrollgewebe

Um zu bestätigen, dass plasmaspezifische Veränderungen an zervikalem Gewebe durch die Raman-Mikrospektroskopie nachweisbar sind, wurden Schnitte unmittelbar nach fünfminütiger Behandlung mit je einer der untersuchten Plasmaquellen gemessen. In der nachträglichen Analyse per PCAs wurden DNA-spezifische Unterschiede von behandeltem und Kontrollgewebe untersucht. In den Superficialzellschichten für beide Plasmaquellen zeigte sich anhand der Score Δ s ein Unterschied der molekularen DNA-Komponente nach Plasmabehandlung. In der Basalzellschicht zeigte sich hierbei nach Behandlung mit APCIII eine größere Veränderung der Scores im Vergleich mit dem kINPen® (Abbildung 14). Jedoch stellt sich auch im Score-Plot ein Behandlungseffekt für den kINPen® dar (vgl. Anhang 2). Für beide Geräte zeigten die Loadings nach Behandlung insbesondere im Bereich der Lipid- und Proteinbanden (2800-3000 rel. cm^{-1}) Ausschläge. DNA-spezifische Banden (vor allem 785, 1090 und 1578 rel. cm^{-1}) wurden in Kontrollgewebe vor allem superficial stärker nachgewiesen als in plasmabehandeltem Gewebe. Insgesamt konnten plasmaspezifische Veränderungen der DNA-Komponente durch PCA für beide Geräte nachgewiesen und die Raman-Mikrospektroskopie als eine geeignete Methode zur Untersuchung von weiteren molekularen Plasmaeffekten etabliert werden.

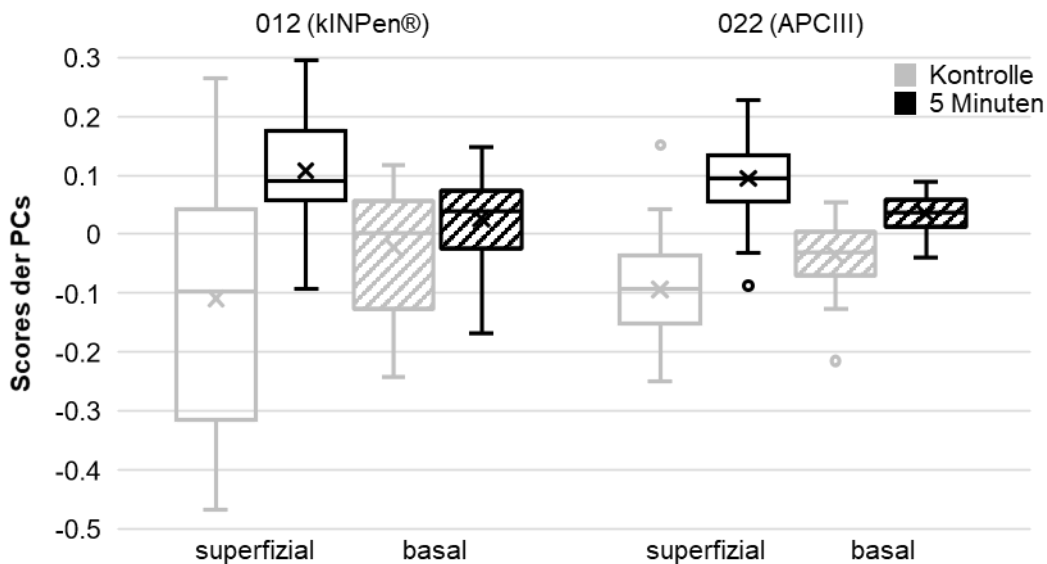


Abbildung 14: Detektion plasmaspezifischer DNA-Veränderung.

Box-Plot-Analyse für die Plasmageräte kINPen® und APCIII nach jeweils fünfminütiger superfizialer Behandlung von zervikalem Epithel. DNA-spezifische Spektren wurden über einen Filter um die Wellennummer 785 (± 5) ermittelt. Spektren der superfizialen und basalen Gewebeschichten wurden separat voneinander mittels PCA zum Zeitpunkt 0 h analysiert. Ausreißer in der PCA ausgeschlossen mittels Hotelling's T^2 -Test. In allen Vergleichen zeigten sich nach fünfminütiger Plasmabehandlung Effekte auf die Score Δ s. Grau = unbehandelt, schwarz = behandelt.

3.1.5 Einflüsse durch Behandlungsdauer und Temperatur

Um den Einfluss der Behandlungsdauer zu untersuchen, wurden die zervikalen Gewebeproben für zwei und fünf min mit dem APCIII behandelt, bevor sie mittels Raman-Mikrospektroskopie und PCA untersucht wurden. Im Vergleich zur Kontrolle ergab sich für die Superfizialschicht des Zervixepithels ein dosisabhängiger Unterschied nach zwei- und fünfminütiger APCIII-Behandlung (Abbildung 15A und Anhang 3). Für die Basalzellschicht hingegen zeigte sich nach zweiminütiger APCIII-Behandlung kein Unterschied zur Kontrolle. Eine fünfminütige APCIII-Behandlung zeigte auch in der Basalzellschicht einen ähnlich starken Gewebeeffekt wie in der Superfizialzellschicht (Score Δ nach fünf min superfizial: 0,0793, basal: 0,0708). Die jeweilige Behandlungsdauer zeigte also einen klaren Einfluss auf die funktionelle Gewebeeindringtiefe des APCIII-vermittelten Niedertemperaturplasmas.

Um einen direkten Einfluss einer möglichen Temperaturentwicklung während der dynamischen Behandlung mit dem APCIII auszuschließen, wurde die

Gewebetemperatur in 30-Sekunden-Intervallen während einer zweiminütigen Behandlung ermittelt. Die Messungen bewegten sich in einem Intervall zwischen 22,6 °C und 23,1 °C bei maximaler Standardabweichung von 0,1 °C. Ein relevanter Temperaturanstieg unter APCIII-Behandlung konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 15B).

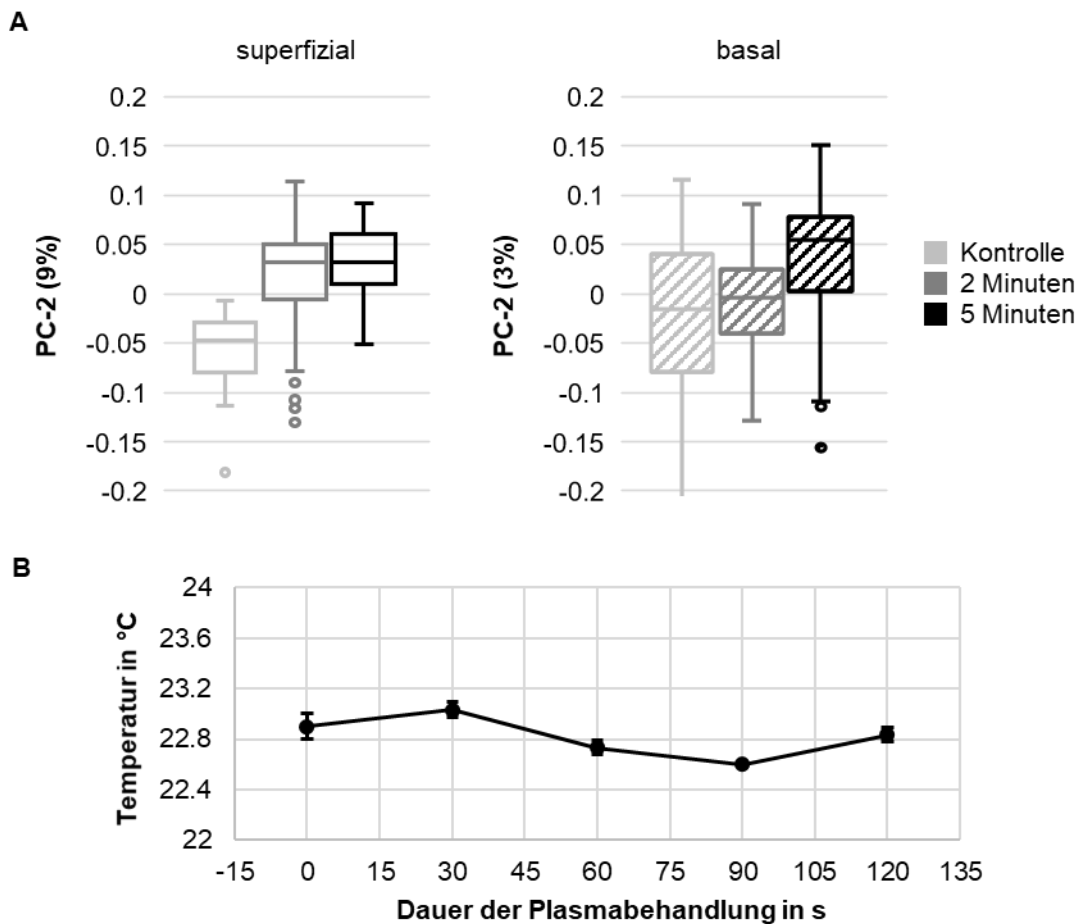


Abbildung 15: Einfluss von Behandlungsdauer und Temperatur während der Gewebebehandlung mit APCIII.

A: Box-Plot-Analyse der DNA-Komponente in der superfizialen (links) und basalen (rechts) Epithelschicht nach unterschiedlicher APCIII-Behandlungsdauer (zwei oder fünf min). Unmittelbar nach APCIII-Behandlung wurden die Gewebeprobe kryokonserviert und geschnitten. Per Raman-Mikrospektroskopie gemessene DNA-Spektren wurden durch einen Filter um die Wellennummer 785 (± 5) rel. cm^{-1} ermittelt. Die Analyse erfolgte mit max. 50 Spektren pro Kondition. Ausreißer in der PCA ausgeschlossen mittels Hotelling's T^2 -Test. Auf der Hauptkomponente 2 (PC-2) ergab sich ein tendenzieller Unterschied beim Vergleich von Kontrolle, zwei- und fünfminütiger Behandlung. Eine zweiminütige Behandlung zeigte nur superfizial einen Effekt. B: Oberflächentemperaturverlauf einer zweiminütigen APCIII-Behandlung. Nach je 30 Sekunden erfolgte eine Temperaturmessung per Laserthermographie. Nach einer Temperaturmessung wurde die Probe mit zimmerwarmem DPBS befeuchtet. Je drei Messwiederholungen pro Zeitpunkt. Es konnte kein Temperaturanstieg auf der Gewebeoberfläche, während der APCIII-Behandlung, gezeigt werden. (Modifiziert publiziert in (Wenzel et al., 2020)).

3.1.6 Funktionelle Gewebepenetrationstiefe einer Plasmabehandlung mit APCIII und kINPen

Für die Identifikation geeigneter Indikationen für die klinische Anwendung der jeweiligen Plasmaquellen ist es entscheidend, die funktionelle Gewebepenetrationstiefe zu bestimmen. In 3.1.4 wurde gezeigt, dass für beide Geräte nach einer Behandlungszeit von fünf min plasmaabhängige und statistisch signifikante Gewebepenetrationseffekte sowohl in der Superficial- als auch in der Basalzellschicht identifiziert werden konnten. Für das Epithel der humanen Zervix uteri stellt die jeweilige Gewebepenetrationstiefe der Basalzellschicht also die minimale funktionelle Gewebepenetrationstiefe der Plasmabehandlung dar. Morphologisch kann die Basalzellschicht in den einzelnen primären Gewebeschnitten sowohl histologisch als auch in der TCA eindeutig definiert und identifiziert werden. Um die funktionelle Gewebepenetrationstiefe einer Plasmabehandlung abhängig von der verwendeten Plasmaquelle zu bestimmen, wurde die jeweilige Epitheldicke der untersuchten Gewebeproben am Messpunkt von basal nach superficial bestimmt. Dadurch konnte für den kINPen® eine minimale durchschnittliche Gewebepenetrationstiefe von $271,1 \pm 102,7 \mu\text{m}$ ermittelt werden (Maximum: $424 \mu\text{m}$; Minimum: $150 \mu\text{m}$; $n = 10$) (Abbildung 16). Für das APCIII ergab sich eine minimale durchschnittliche Gewebepenetrationstiefe von $463,5 \pm 269,0 \mu\text{m}$ (Maximum: $1034 \mu\text{m}$; Minimum $162 \mu\text{m}$; 10 Messungen pro Plasmaquelle).

Tabelle 8: Messtiefe der jeweiligen Basalzellschichten.

kINPen®	Tiefe in μm	APCIII	Tiefe in μm
013.1	327	023.1	390
013.2	424	023.2	461
014.1	150	027.1	843
014.2	170	027.2	1034
015.1	385	028.1	250
015.2	315	028.2	162
016.1	235	029.1	436
016.2	360	029.2	385
017.1	175	031.1	360
017.2	170	031.2	314

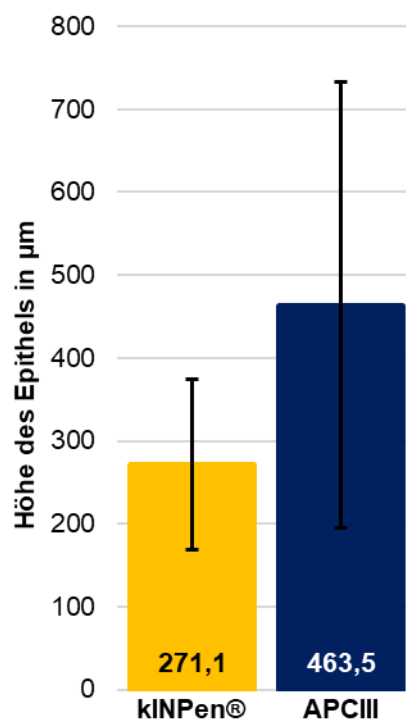


Abbildung 16: Ermittlung der Messtiefe.

Durchschnittliche Messtiefe der Basalzellschicht nach fünfminütiger Plasmabehandlung mit kINPen® bzw. APCIII. Die komplette Epithelschicht wurde in Hellfeldaufnahmen mit 10facher Vergrößerung dargestellt und die jeweilige Tiefe der Basalzellschicht senkrecht zur Oberfläche gemessen (kINPen®: $271,1 \pm 102,7 \mu\text{m}$; APCIII: $463,5 \pm 269,0 \mu\text{m}$). Verwendetes Bildanalyseprogramm: Project FIVE 5.0. 10 Messungen pro Plasmaquelle. (Modifiziert nach (Wenzel et al., 2019)).

3.2 Plasmaspezifische Effekte auf Morphologie und Struktur molekularer Gewebekomponenten

Um morphologische und molekulare Veränderungen spezifischer Gewebekomponenten nach Plasmabehandlung zu identifizieren, wurden humane zervikale Gewebeproben mit beiden Plasmaquellen, kINPen® bzw. APCIII, für fünf min behandelt und entweder unmittelbar oder nach einer weiteren Inkubation von 24 h unter Zellkulturbedingungen kryofixiert und geschnitten. Es erfolgten immunhistochemische Färbungen mittels Russell-Movat-Pentachrom-Reagenz und die Messung per Raman-Mikrospektroskopie mit anschließender TCA und statistischer Auswertung auf Basis der mean grey value Intensität.

Immunhistochemisch zeigte sich in der Russell-Movat-Pentachrom-Färbung keine Veränderung der Morphologie der epithelialen Strukturen nach Plasmabehandlung. Vorhandene Zellkerne waren vor und nach der Behandlung in Form vergleichbar. Ebenso verhielten sich Aufbau und Abgrenzbarkeit einzelner Zellen der verschiedenen Schichten, sowie die generelle Schichtung des Epithels (Anhang 1).

Auch per Raman-Mikrospektroskopie und anschließender TCA zeigten die epithelialen Komponenten (insbesondere DNA und Proteine) makroskopisch keine wesentliche Strukturveränderung nach einer Plasmabehandlung. Eine Auswertung für die Komponenten ER und Glykogen war z. T. nur eingeschränkt möglich (nicht auswertbar: ER: kINPen®, Superfizialschicht, Zeitpunkt 0 h; Glykogen: auswertbar: kINPen®, Superfizialschicht, Zeitpunkt 0 h). In der TCA zeigten Lipidkomponenten nach kINPen® Behandlung eine diskrete morphologische Veränderung, gekennzeichnet durch eine leichte Verklumpung und Kondensierung (Abbildung 17A). Diese Art Veränderung der Lipidstrukturen konnte für das APCIII nicht beobachtet werden. Neben den Lipidkomponenten blieb die Morphologie aller weiteren Komponenten nach der Plasmabehandlung im Vergleich zur Kontrolle erhalten (Abbildung 17B, vollständige Darstellung der einzelnen Komponenten in Anhang 4).

Um mögliche Änderungen der Expression der einzelnen TCA Komponenten zu untersuchen, wurden die mean grey value Intensitäten nach Plasmabehandlung mit den Kontrollen verglichen. Für die untersuchten Proben konnte für beide Plasmaquellen statistisch signifikante Änderung der Intensität der Gewebekomponenten zu keinem der untersuchten Zeitpunkte identifiziert werden. Tendenziell zeigten sich für beide Geräte nach der Behandlung zum Zeitpunkt 0 h leicht verringerte und zum Zeitpunkt 24 h leicht erhöhte mean grey values (Abbildung 18).

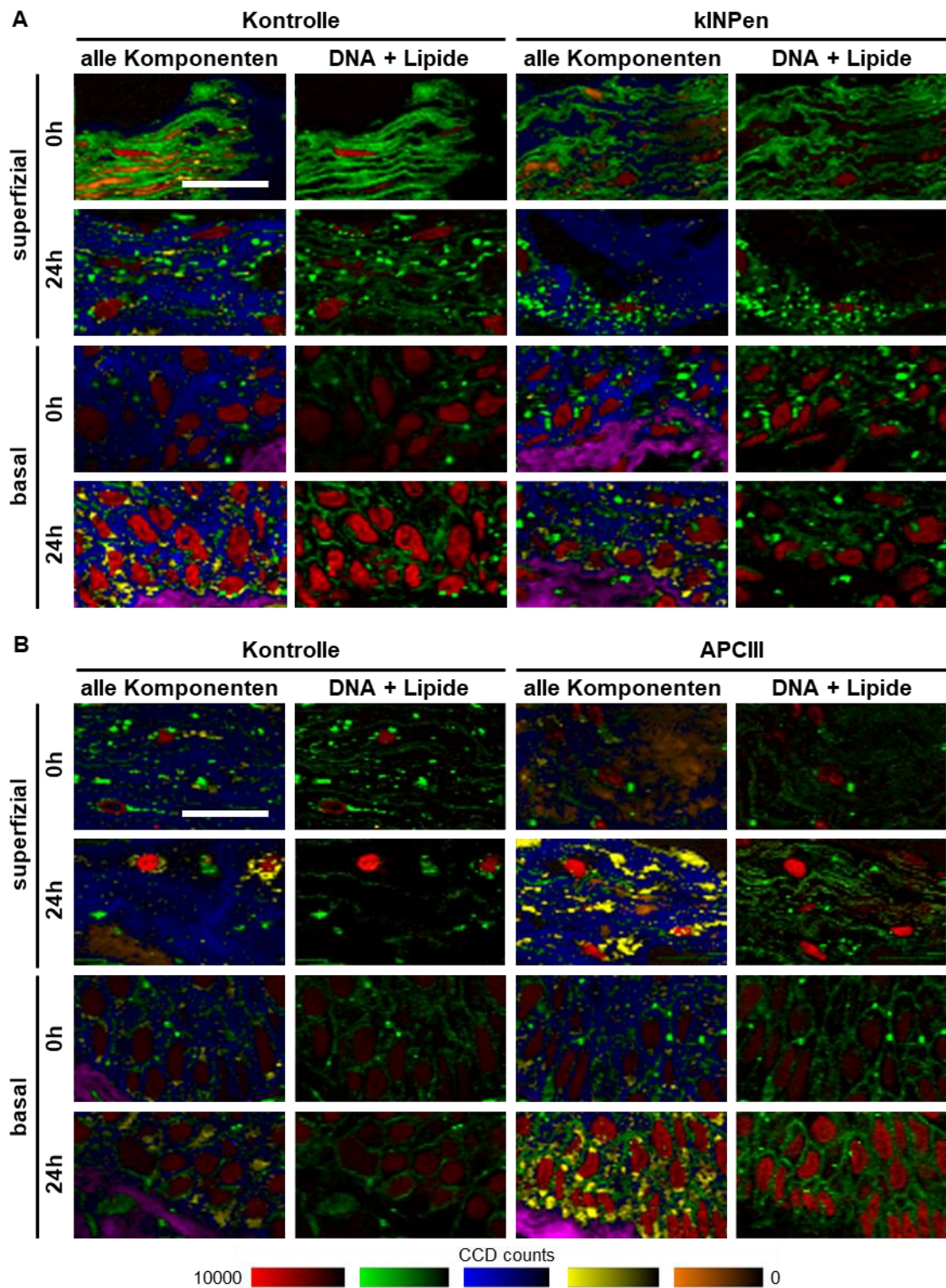


Abbildung 17: Repräsentative TCA humaner Gewebeproben nach Behandlung mittels kINPen® und APCIII.

TCA-basierte Darstellung unterschiedlicher molekulare Gewebekomponenten in humanen Gewebeproben der Zervix uteri zu den angegebenen Inkubationszeiträumen nach fünfminütiger Plasmabehandlung mittels kINPen® (A) und APCIII (B). Die einzelnen TCA-Aufnahmen wurden anhand ihrer CCD count-Intensität normiert und miteinander verglichen.

Morphologie der Zellen, sowie die Struktur der einzelnen Komponenten nach Plasmabehandlung waren für beide Plasmaquellen vergleichbar zur Kontrolle. Für jede Kondition ist eine überlagerte Darstellung (links) und eine Darstellung der DNA- und Lipidkomponenten abgebildet (rechts). Lipide grün, Glykogen orange, endoplasmatisches Retikulum gelb, DNA rot, Proteine blau, Kollagen pink. Maßstabsbalken entspricht 20 μm . (Modifiziert publiziert in (Wenzel et al., 2019)).

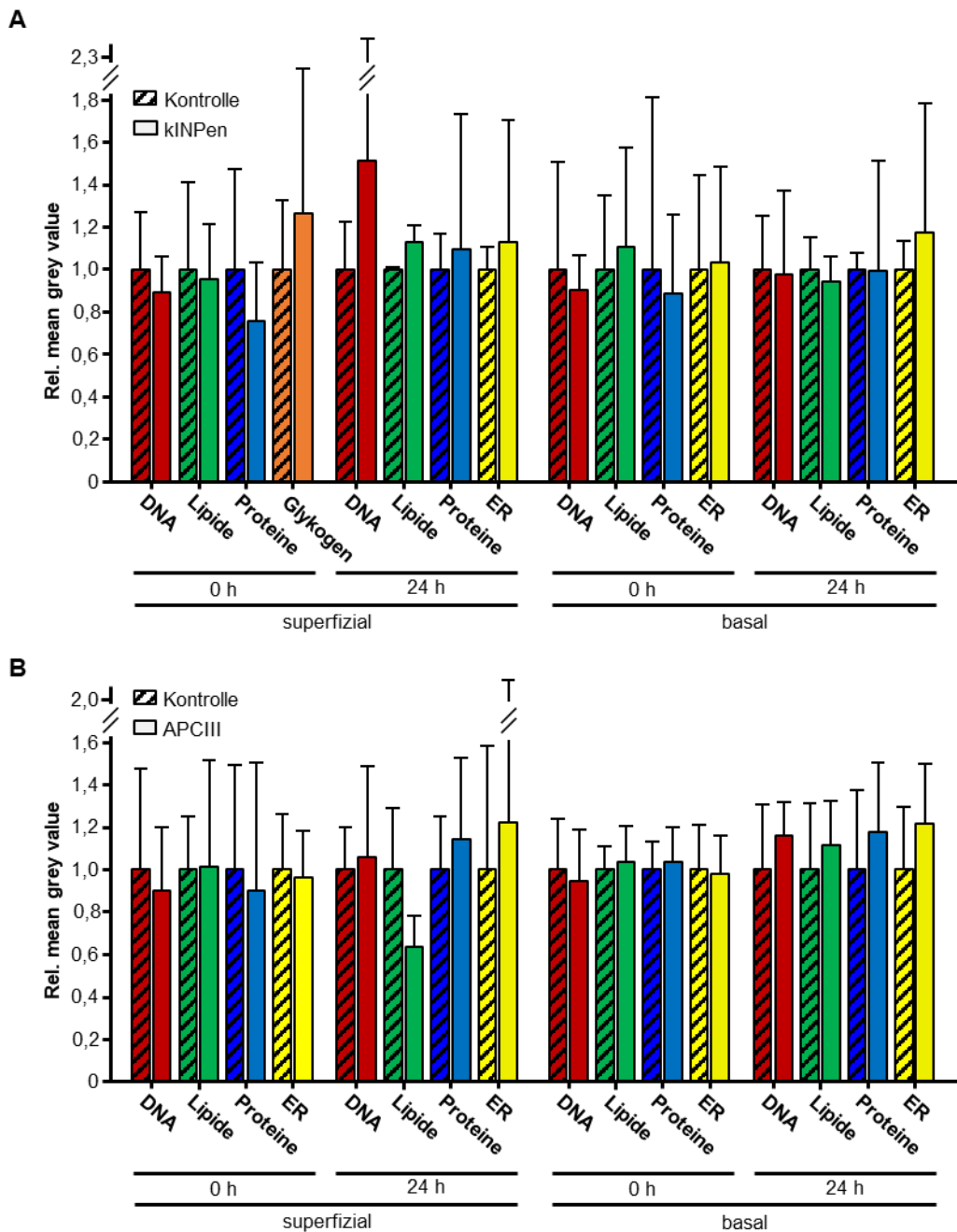


Abbildung 18: Vergleich der mean grey values (MGVs).

MGVs der CCD count-Intensitäten nach fünfminütiger Behandlung wurden für alle auswertbaren Komponenten aus den TCAs gewonnen. A: kINPen® und B: APCIII. Werte wurden auf die Kontrolle normiert. Die Messung bezog sich jeweils auf eine 30 x 50 μm große Fläche. Für beide Plasmageräte nahmen die MGVs zum Zeitpunkt 0 h tendenziell verringerte und nach 24 h tendenziell leicht höhere Werte an. Die statistische Auswertung ergab für beide

Geräte keinen signifikanten Unterschied (gepaarter Wilcoxon Vorzeichen Rang Test: $p > 0,05$). Modifiziert bereits veröffentlicht in (Wenzel et al., 2020)).

3.3 Plasma-spezifische Effekte auf molekulare Eigenschaften der analysierten Gewebekomponenten

3.3.1 Komponentenspezifische Effektivität der Plasmabehandlung (kINPen® und APCIII)

Unter den identifizierten molekularen Gewebekomponenten zeigten besonders DNA- und Lipidkomponenten, die durch Bildung von Radikalen und Einleitung der Apoptose beeinflusst werden, in der PCA signifikante und spezifische Effekte. Diese wurden mit tendenziell hoher Intensität detektiert. Darüber hinaus waren sie neben zytosolischen Proteinen, die aber lediglich eine geringe Intensität aufwiesen und über wenig spezifische Banden verfügten, konstant detektierbar. Durch spezifische Banden für DNA ($785 \pm 5 \text{ rel. cm}^{-1}$) und Lipide ($2850 \pm 5 \text{ rel. cm}^{-1}$) war eine präzise Selektion dieser Spektren möglich und damit einhergehend eine hohe Qualität der PCA. Für beide Komponenten und Geräte konnten biochemische Unterschiede nach fünfminütiger Plasmabehandlung gezeigt werden (Tabelle 9 und Tabelle 10).

Tabelle 9: Raman-Banden (in rel. cm^{-1}) der Loadings nach fünfminütiger kINPen®-Behandlung und deren molekulare Zuordnung.

Roter Teil auf Basis von DNA, grün auf Basis von Lipiden. Vergleiche Loadings und Score-Plots in Anhang 5. Zuordnung, falls nicht anders angegeben, aus (Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007; Talari et al., 2015) zitiert. (Modifiziert bereits veröffentlicht in (Wenzel et al., 2019)).

Banden (rel. cm^{-1})	Gefunden in	Zuordnung	Referenz
785	Allen Konditionen	“U, T, C (ring-breathing modes in the DNA/RNA bases); Phosphodiester; cytosine”	(Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007)
1094	Allen	„DNA“	(Malini et al., 2006)
1340	Vor allem 0 h	“Nucleic acid mode; Nucleic acid modes indicating the nucleic acid content in tissues”	(Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007)

1376	Allen	„CH ₃ symmetric deformation, DNA“	(Chowdary <i>et al.</i> , 2009; Daum <i>et al.</i> , 2019)
1490	Allen	„DNA“	(Malini <i>et al.</i> , 2006)
1578	Allen	„Guanine, adenine“	(Ruiz-Chica <i>et al.</i> , 2004; Liu <i>et al.</i> , 2008)
2850-2910	Allen	“CH ₂ symmetric and asymmetric stretch of lipids”	(Senada Koljenović, † <i>et al.</i> , 2005; Talari <i>et al.</i> , 2015)
1640	Allen	„Amide I band (protein band), cytosine“	(Agarwal, Tandon and Gupta, 2006; Billingham, Oladepo and Loppnow, 2009)
1656/1657	Allen	“C=C (lipids), $\nu(\text{C}=\text{C})$ cis (phospholipids), Fatty acids, Triglycerides (fatty acids)”	(Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007)
1676	Allen	“Amide I (β -sheet), uracil”	(Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007; Billingham, Oladepo and Loppnow, 2009)
2850	Allen	“ ν_s CH ₂ , lipids, fatty acids, CH ₂ symmetric”	(Shetty <i>et al.</i> , 2006)
2879	Allen	“CH ₂ asymmetric stretch of lipids and proteins”	(Huang <i>et al.</i> , 2011)
2943 (2940)	Allen	“C-H vibrations in lipids & proteins ν_{as} CH ₂ , lipids, fatty acids”	(Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007)

Tabelle 10: Raman-Banden (in rel. cm⁻¹) der Loadings nach fünfminütiger APCIII-Behandlung und deren molekulare Zuordnung.

Roter Teil auf Basis von DNA, grün auf Basis von Lipiden. Vergleiche Loadings und Score-Plots in Anhang 5. Zuordnung, falls nicht anders angegeben, aus (Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007; Talari *et al.*, 2015) zitiert. (Modifiziert veröffentlicht in (Wenzel *et al.*, 2020)).

Banden (rel. cm ⁻¹)	Gefunden in	Zuordnung	Referenz
788 - 791	Allen	C5'-O-P-O-C3'phosphodiester bands in DNA; O-P-O stretching DNA; Pyrimidine	(Liu <i>et al.</i> , 2008; Li <i>et al.</i> , 2011; Talari <i>et al.</i> , 2015)

1094	Allen	„DNA“	(Malini <i>et al.</i> , 2006)
1340	Allen, v. a. superfizial	“Nucleic acid mode; Nucleic acid modes indicating the nucleic acid content in tissues”	(Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007)
1376	Allen	„CH ₃ symmetric deformation, DNA“	(Chowdary <i>et al.</i> , 2009; Daum <i>et al.</i> , 2019)
1490	Allen, v. a. superfizial	„DNA“	(Malini <i>et al.</i> , 2006)
1578	Allen	„Guanine, adenine“	(Ruiz-Chica <i>et al.</i> , 2004; Liu <i>et al.</i> , 2008)
2850-2910	Allen	“CH ₂ symmetric and asymmetric stretch of lipids”	(Senada Koljenović, † <i>et al.</i> , 2005; Talari <i>et al.</i> , 2015)
1005	Allen, v. a. superfizial	“Phenylalanine (proteins), Proteins, Symmetric ring breathing of phenylalanine”	(Notingher <i>et al.</i> , 2004; Liu <i>et al.</i> , 2008)
1347 (1330-1347)	Allen	“An unassigned mode”	(Farquharson <i>et al.</i> , 2005)
1437	Allen	“CH ₂ (lipids in normal tissue), CH ₂ deformation (lipid), Acyl chains”	(Stone <i>et al.</i> , 2004; Malini <i>et al.</i> , 2006)
1640	Allen, v. a. nach 24 h	„Amide I band (protein band), cytosine“	(Agarwal, Tandon and Gupta, 2006; Billinghamurst, Oladepo and Loppnow, 2009)
1656/1657	Allen, v. a. nach 24 h	“C=C (lipids), ν (C=C) cis (phospholipids), Fatty acids, Triglycerides (fatty acids)”	(Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007; Talari <i>et al.</i> , 2015)
1676	Allen, v. a. nach 24 h	“Amide I (β -sheet), uracil”	(Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007; Billinghamurst, Oladepo and Loppnow, 2009)

2850	Allen	" ν_s CH ₂ , lipids, fatty acids, CH ₂ symmetric"	(Shetty <i>et al.</i> , 2006)
2879	Allen	"CH ₂ asymmetric stretch of lipids and proteins"	(Huang <i>et al.</i> , 2011)
2943 (2940)	Allen	"C-H vibrations in lipids & proteins ν_{as} CH ₂ , lipids, fatty acids"	(Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007; Talari <i>et al.</i> , 2015)

Bei der statistischen Auswertung der DNA-Scores ergaben sich für alle in der PCA angestellten Vergleiche zwischen Kontrollen und mittels kINPen® und APCIII plasmabehandelten Geweben signifikante biochemische Unterschiede der Komponente (jeweils n = 5, p = 0,0313; Abbildung 19). Hierbei stellte sich für beide Plasmageräte ein stärkerer Effekt auf die DNA-Komponenten der Superfizialschicht (Score Δ 0 h: kINPen® 0,156, APCIII 0,146) als auf die der Basalschicht (Score Δ 0 h: kINPen® 0,099, APCIII 0,121) dar. Dieser Effekt war auch nach 24 h Inkubation nachweisbar, wobei sich nach einer Inkubationszeit von 24 h eine Verringerung des DNA-Plasmaeffekts in der Basalzellschicht zeigte (Score Δ 24 h: kINPen® 0,071, APCIII 0,077). Während die Behandlung mittels kINPen® eher zu einem Effekt auf die Lipide der Basalzellschicht führte (Score Δ kINPen® basal: 0 h: 0,155; 24 h: 0,133; superfizial: 0 h: 0,123; 24 h: 0,092), wurden nach einer Behandlung mittels APCIII vor allem Veränderungen auf Lipide der Superfizialschicht beobachtet (Score Δ APCIII basal 0 h: 0,099; 24 h: 0,109; super. 0 h: 0,121; 24 h: 0,126). Die 24-stündige Inkubation hatte für beide Geräte keine wesentlichen Effektverluste oder -verstärkungen zur Folge (APCIII, Score Δ super.: +0,005, basal: +0,010; kINPen®, Score Δ super.: -0,031, basal: -0,022). Ein Hinweis auf die Effektivität beider Geräte kann durch die Werte der Scores angestellt werden. Hier zeigten sich Scores für basal gelegene Lipide, die zugunsten des kINPen® um den Wert 0,05 höher waren. Für die DNA bestanden für beide Geräte vergleichbare Scores. Durch die PCA konnten die spektralen und biochemischen Unterschiede für DNA und Lipide gefunden werden. Alle Vergleiche erwiesen sich als statistisch signifikant

(jeweils n = 5, p = 0,0313). Zusammenfassend war es möglich durch beide Komponenten einen Behandlungseffekt bis in die Basalzellschicht nachzuweisen.

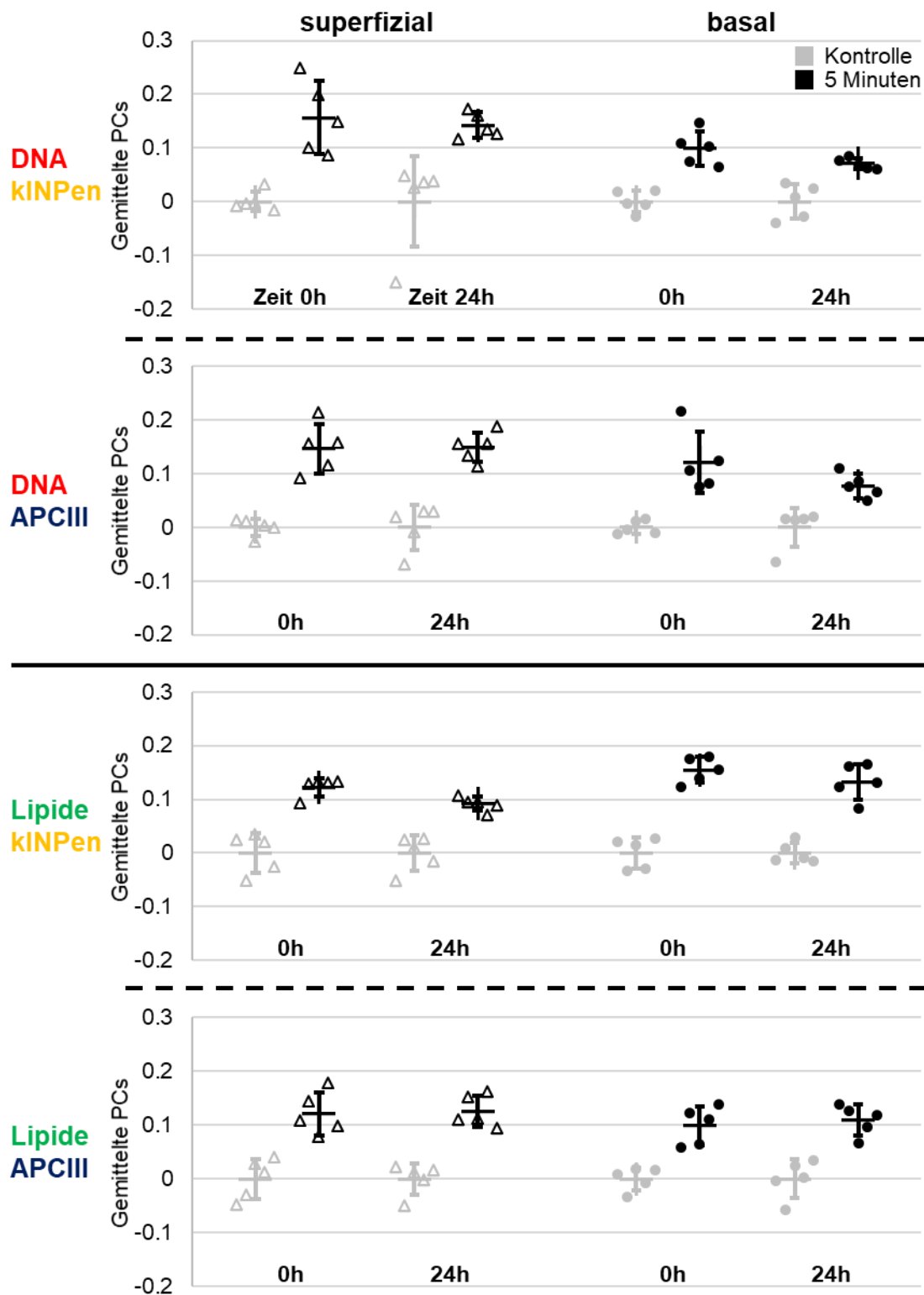


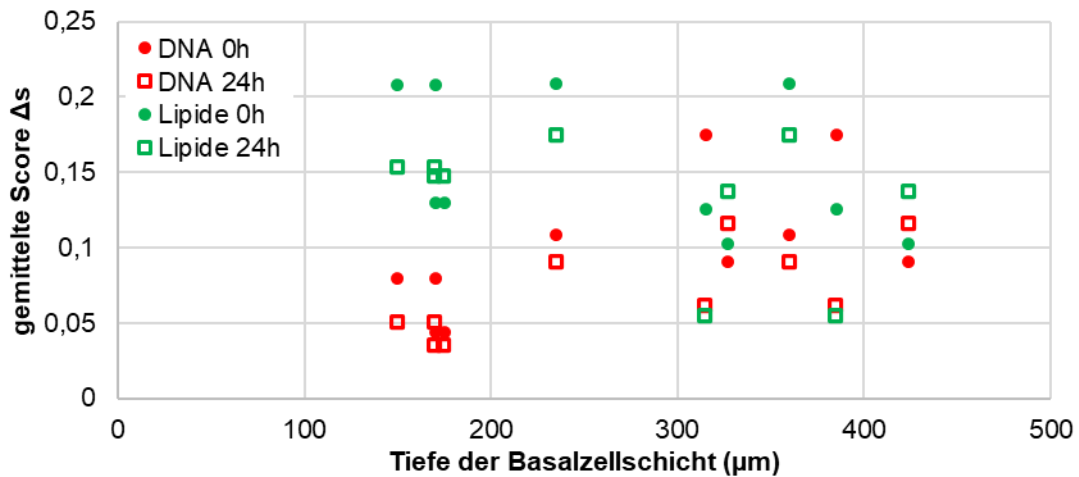
Abbildung 19: Relative Effekte einer fünfminütigen Plasmabehandlung auf DNA und Lipid-Komponenten.

Kombinierte Box-Plot Analyse der PCA. Relativierung der PCA-Unterschiede durch Nullen der Mittelwert der Kontrolle (grau). Für beide verwendeten Plasmageräte ergab sich für alle analysierten Zellschichten ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontrollprobe und Plasmabehandlung in den analysierten Komponenten DNA und Lipide. Für alle Zeitpunkte ergibt sich mittels Wilcoxon Vorzeichen Rang Test ein $p = 0,0313$. Bei $n = 5$ Proben und max. 50 Spektren pro Datenpunkt einer Kondition. (Teile publiziert in (Wenzel et al., 2019, 2020)).

3.3.2 Korrelation von Messtiefen und Scores

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Effekte der Plasmabehandlung die komplette Epitheldicke umfassen und mindestens bis in die Basalzellschicht reichen. Dabei unterscheiden sich die Scores der verwendeten Plasmageräte für DNA und Lipide. Um die Dynamik der Plasmabehandlung im Gewebe zu untersuchen, erfolgte eine Gegenüberstellung von Scores und zugehörigen Messtiefen. Sowohl für KINPen® als auch für APCIII konnte eine Score-Zunahme bezogen auf die DNA-Komponente mit zunehmender Epitheldicke ermittelt werden (Abbildung 20). Ebenfalls für die Lipidkomponente in Gewebeproben, die mit dem APCIII behandelt wurden, zeigten sich höhere Scores mit zunehmender Epitheldicke. KINPen® behandelte Gewebeproben wiesen hingegen geringere Scores der Lipidkomponente bei tiefer gelegenen Basalzellschichten auf. Wo die genannten Effekte des KINPen® nach 24-stündiger Inkubation erhalten blieben, bestand für die DNA unter APCIII eine vermeintliche Stagnation mit lediglich einem Ausreißer. Es wurde festgestellt, dass vor allem für die DNA eine positive Korrelation von Messtiefen und Scores besteht. Bei Betrachtung der Lipide zeigten die Geräte ein unterschiedliches Verhalten, welches auch von der Inkubationszeit abhängig ist.

kINPen®



APCIII

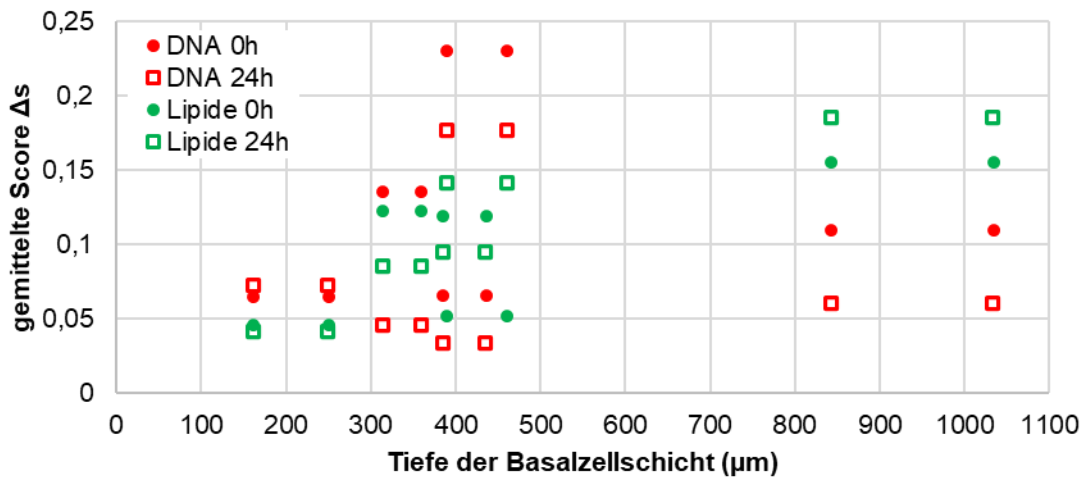


Abbildung 20: Veränderung des Plasmaeffekts mit Zunahme der Epitheldicke.

Darstellung der basalen, gemittelten Score Δs (= Behandlungsdurchschnitt – Kontrolldurchschnitt) für DNA und Lipide zu den Zeitpunkten 0 h und 24 h im Verhältnis zur gefundenen Messtiefe bezogen auf die Ergebnisse nach fünf min Behandlung. Die Zunahme der Dicke des Epithels hat bei beiden Geräten einen unterschiedlichen Effekt. Bei Betrachtung des kINPen® scheint der Effekt auf die Lipidkomponente abzunehmen, auf die DNA-Komponente nimmt er hingegen zu. Eine APCIII-Behandlung wirkt verstärkt auf beide Komponenten bei höherer Tiefe. Punkte = Zeitpunkt 0 h, Quadrate = 24 h. Rot = DNA, grün = Lipide. (Modifiziert nach (Wenzel et al., 2019)).

3.3.3 Einfluss von Behandlungsdauer und Inkubationsdauer

In Etablierungsversuchen (vgl. 3.1.5) fiel auf, dass die Dauer der Plasmabehandlung die Score-Dynamik insbesondere beim APCIII beeinflusst. Hieraus ergab sich die Frage, welchen Einfluss Behandlungsdauer und Inkubationszeit auf plasmavermittelte Gewebefeffekte haben, die durch das APCIII verursacht sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Behandlungszeiten

von zwei und fünf min untersucht, sowie Inkubationszeiträume von 0 und 24 h. Sowohl die Behandlungsdauer als auch die Inkubationszeit nach der Behandlung zeigten einen deutlichen Einfluss auf die gemessenen Gewebefeffekte. Speziell für die Basalzellschicht zeigte sich, dass eine zweiminütige APCIII-Behandlung ungenügend ist, einen signifikanten Effekt auf die Komponenten DNA und Lipide auszuüben (Score Δ DNA: 0,016, Lipide: 0,010; Kontrolle jeweils 0). Erst nach 24-stündiger Inkubation konnten für beide Komponenten tendenziell größere Scores nachgewiesen werden, die dem Niveau einer fünfminütigen Behandlung entsprachen (Score Δ DNA 2 min: 0,062, 5 min: 0,076). In der Superficialzellschicht hingegen führten bereits zweiminütige APCIII-Behandlungszeiten zu einem ähnlichen Effekt (Score Δ DNA: 0,085, Lipide: 0,101), der im Vergleich zur fünfminütigen Behandlung nur leicht schwächer war (Abbildung 21). Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass die Inkubationszeit nach Behandlung ebenso einen positiven Einfluss auf die Stärke des Gewebefeffekts hat. Ausgenommen hiervon waren superfiziale Lipidkomponenten, die erniedrigte Scores im Vergleich zu nicht inkubierten Proben aufwiesen. Scores der Basalzellschicht zeigten insgesamt geringere Werte als die der Superficialschicht (Für Scores und Loadings vgl. bitte Anhang 6). Sowohl Behandlungs- als auch Inkubationsdauer zeigten in diesem Versuch deutlichen Einfluss auf die Eindringtiefe einer Plasmabehandlung durch das APCIII. Die Effekte beider Parameter begünstigen dabei das Erreichen der Basalzellschichten dickerer humaner unverhornter Plattenepithelien.

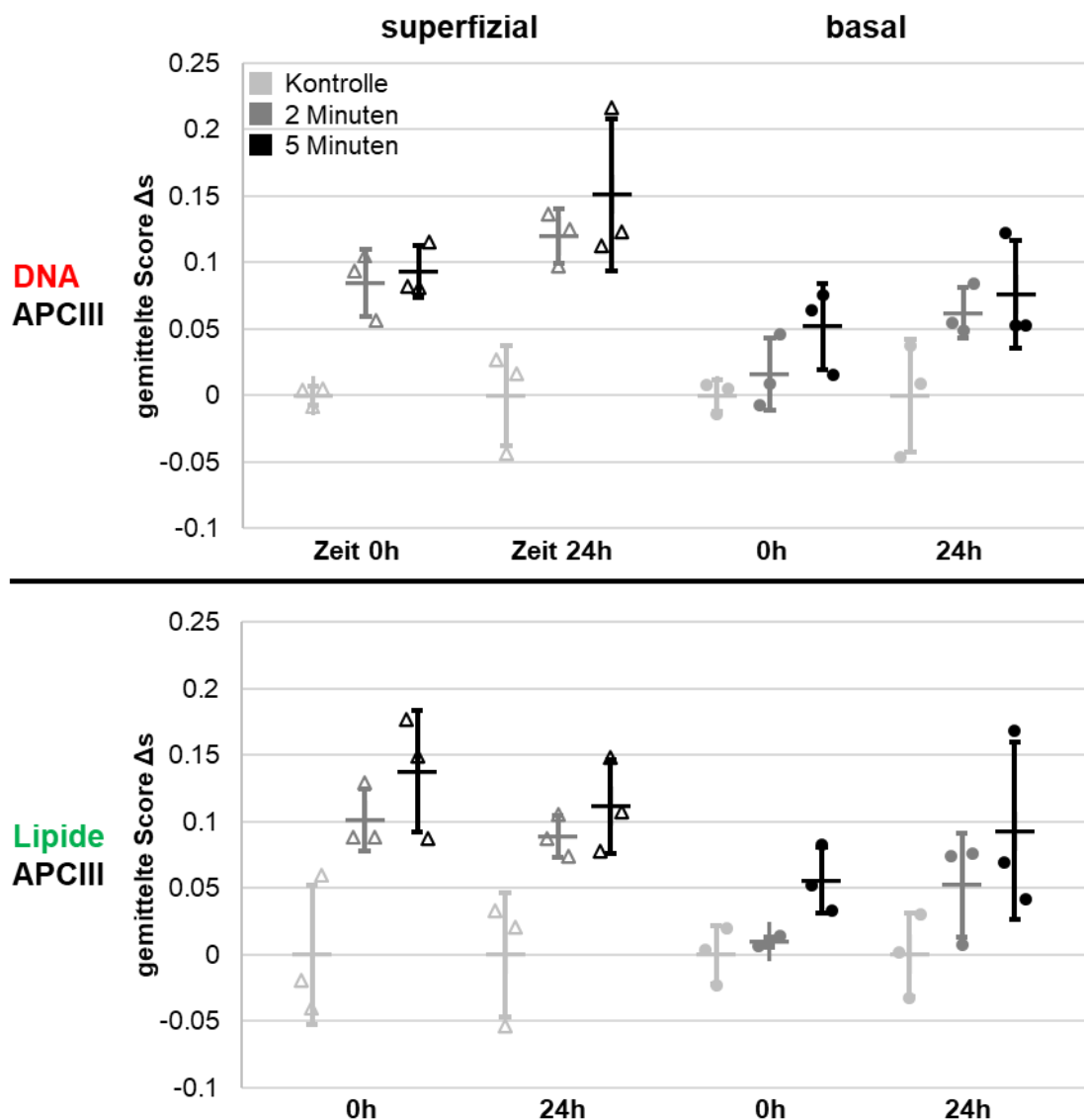


Abbildung 21: Einfluss der Behandlungsdauer auf DNA- und Lipidkomponenten. Kombinierte Box-Plot Analyse der PCA. Drei Proben wurden mit dem APCIII für zwei bzw. fünf min behandelt und auf die Kontrolle normalisiert. Es ergab sich bei einer fünfminütigen Behandlungsdauer stets ein deutlicher Unterschied im Vergleich mit der Kontrolle für beide analysierten Komponenten DNA und Lipide. Eine Behandlungsdauer von zwei min zeigte zum Zeitpunkt 0 h basal keinen wesentlichen Unterschied zur Kontrolle. Nach 24 h steigen die Scores auch im basalen Bereich. Alle superfizialen Messungen nach zweiminütiger Behandlung bewegen sich auf dem Niveau einer fünfminütigen Behandlung. Mittelwert der Kontrolle (grau) zur Vergleichbarkeit genullt. Die Auswertung mittels Friedman Test ergab keinen signifikanten Unterschied bei zu geringer Probenzahl ($n = 3$). Max. 50 Spektren pro Datenpunkt einer Kondition. (Modifiziert publiziert in (Wenzel et al., 2020)).

3.3.4 Vergleich der Plasmaquellen

Die biochemischen und molekularen Effekte durch Niedertemperaturplasmen sind bislang nicht vollständig geklärt. Im Verlauf dieser Studie konnten

Ähnlichkeiten, aber auch Unterschiede zwischen den vermittelten Gewebeeffekten der untersuchten Plasmaquellen, kINPen® und APCIII, nachgewiesen werden. Für diesen Versuch wurden zufällig Spektren aus fünfminütig behandelten Gewebeproben (jeweils DNA- und Lipid-Komponenten) gewonnen, die auch für 3.1.4 genutzt wurden. Durch einen PCA-Vergleich dieser Raman-Spektren konnten in allen Gegenüberstellungen zwei Gruppen identifiziert werden, die den jeweiligen Plasmaquellen zuzuordnen waren. Der geringste Unterschied zwischen beiden Plasmaquellen zeigte sich über PC-2 bezogen auf die basale DNA-Komponente zum Zeitpunkt 0 h und beschrieb 8 % des Gesamtunterschieds (Abbildung 22A und Anhang 7). Über die etablierten DNA und Lipid-Komponenten konnten Banden gerätespezifisch zugeordnet werden, die durch das jeweilige Plasmagerät verändert wurden (Abbildung 22B). Aus den Loadings ergaben sich für den kINPen® Ausschläge der Banden:

779-788, 1000, 1094, 1437, 1573, 1652, 2830-2913, 2850 und 2880 rel. cm^{-1} ;

Für das APCIII:

788 – 791, 802, 940, 1005, 1094, 1131, 1347, 1380, 1493, 1652, 1676, 2913-3000 und 2943 rel. cm^{-1} .

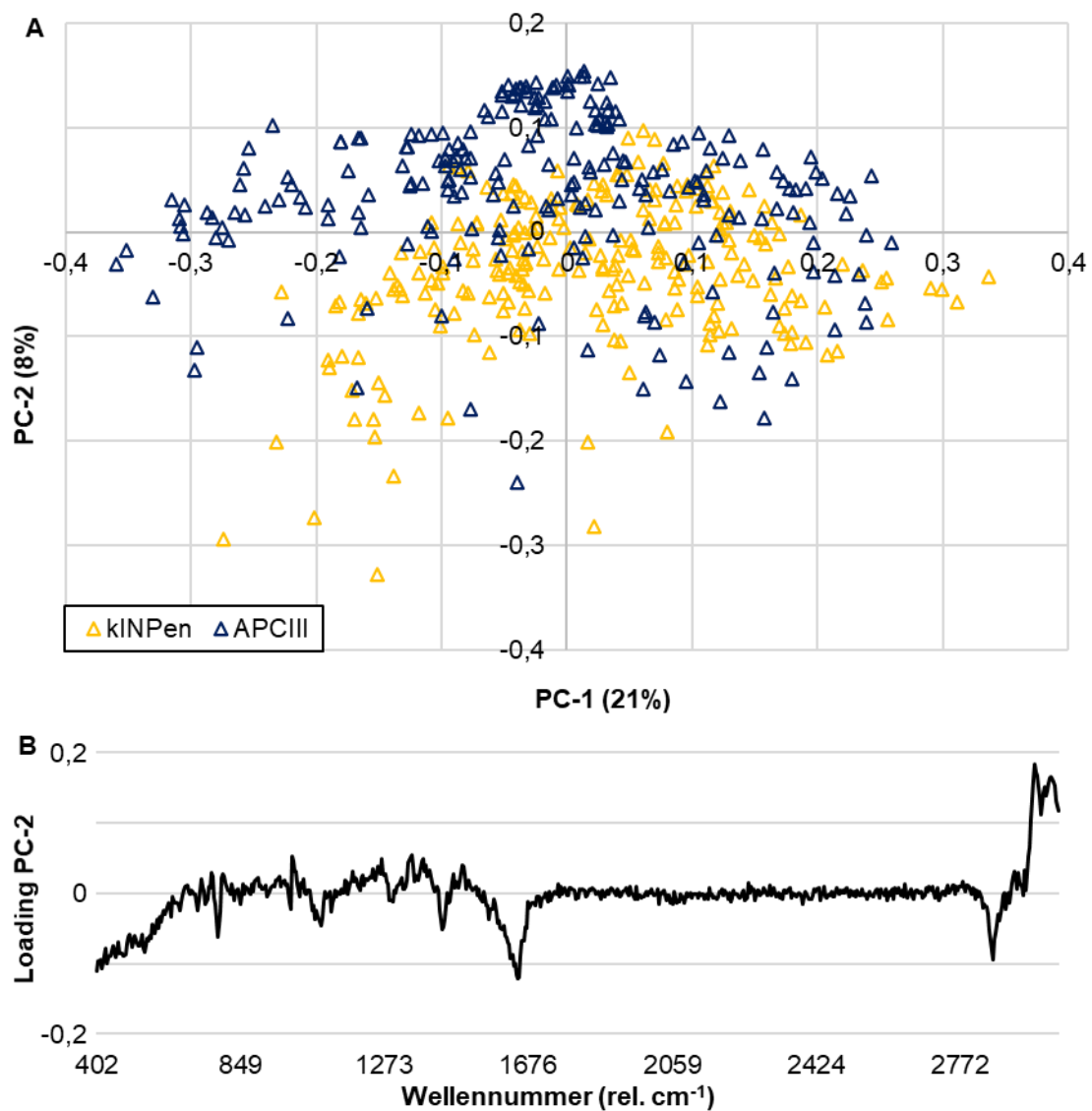


Abbildung 22: Unterscheidung der Plasmageräte in der PCA.

Darstellung der PCA auf Basis der DNA-Daten der beiden Plasmaquellen nach einer fünfminütigen Behandlung zum Zeitpunkt 0 h. Im Vergleich ist superfizial auf der Hauptkomponente 2 (PC-2) eine Unterscheidung der verwendeten Plasmageräte kINPen® und APCIII zu erkennen. A: Score-Plot. kINPen® grau, APCIII schwarz. B: Loading der PC-2.

Die Loadings zeigten für das APCIII mehr Lipid-Banden (z. B. 1131, 2913-3000, 2943 rel. cm^{-1}) und zum Teil auch Protein-Banden (z. B. 940, 1676, 2883 rel. cm^{-1}) als für den kINPen®. Dagegen konnten für den kINPen® zahlenmäßig mehr zellkerntypische Banden (z. B. 785, 1094, 1573 rel. cm^{-1}) gefunden werden (Tabelle 11).

Tabelle 11: Spezifische Raman-Banden (in rel. cm^{-1}) für die Plasma Geräte kINPen® und APCIII und deren Zuordnung.

Banden aus den Loadings der PCAs (vgl. Anhang 7). Rot hinterlegt: DNA. Grün hinterlegt: Lipide. Zuordnung, falls nicht anders angegeben, aus (Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007; Talari *et al.*, 2015) zitiert.

Banden (rel. cm^{-1})	Gefunden bei	Zuordnung	Referenz
779-788	kINPen® superfizial	Verschiedene Konfigurationen von DNA/RNA und Nukleotiden, sowie Phosphodiester des DNA/RNA-Gerüsts	(Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007)
788 - 791	APCIII basal	C5'-O-P-O-C3' phosphodiester bands in DNA; O-P-O stretching DNA; Pyrimidine	(Liu <i>et al.</i> , 2008; Li <i>et al.</i> , 2011; Talari <i>et al.</i> , 2015)
802	APCIII basal	“Uracil-based ring breathing mode”	(Farquharson <i>et al.</i> , 2005)
1000	kINPen®	“Phenylalanine, bound & free NADH”	(Malini <i>et al.</i> , 2006)
1005	APCIII	“Phenylalanine (proteins), Proteins, Symmetric ring breathing of phenylalanine”	(Notingher <i>et al.</i> , 2004)
1094	kINPen® superfizial APCIII basal	„DNA“	(Malini <i>et al.</i> , 2006)
1131	APCIII basal	„Fatty acid“	(Krafft <i>et al.</i> , 2005)
1347	APCIII v. a. basal	“An unassigned mode”	(Farquharson <i>et al.</i> , 2005)
1380	APCIII v. a. basal	“ δ CH ₃ symmetric (lipid assignment)”	(Katainen <i>et al.</i> , 2007)
1437	kINPen®	“CH ₂ (lipids in normal tissue),	(Stone <i>et al.</i> , 2004; Malini <i>et al.</i> , 2006)

CH ₂ deformation (lipid)"			
1493	APCIII basal	„guanine-N7 interaction“	(Ruiz-Chica <i>et al.</i> , 2001)
1573	kINPen®	„Guanine, adenine, TRP (protein)“	(Stone <i>et al.</i> , 2004)
1652	kINPen® superficial	“Lipid (C=C stretch), thymine carbonyls”	(Deng <i>et al.</i> , 1999; Stone <i>et al.</i> , 2004)
1676	APCIII basal	“Amide I (β-sheet), uracil”	(Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007; Billingham, Oladepo and Lopponow, 2009)
940	APCIII	“protein band”	(Gniadecka <i>et al.</i> , 2004)
1005	APCIII	“Phenylalanine (proteins), Proteins, Symmetric ring breathing of phenylalanine”	(Notingher <i>et al.</i> , 2004; Liu <i>et al.</i> , 2008)
1131	APCIII	“Fatty acid”	(Krafft <i>et al.</i> , 2005)
1347 (1330- 1347)	APCIII	“An unassigned mode”	(Farquharson <i>et al.</i> , 2005)
1437	kINPen®	“CH ₂ (lipids in normal tissue), CH ₂ deformation (lipid)”	(Stone <i>et al.</i> , 2004; Malini <i>et al.</i> , 2006)
1652	APCIII basal	“Lipid (C=C stretch), thymine carbonyls”	(Deng <i>et al.</i> , 1999; Stone <i>et al.</i> , 2004)
1676	APCIII superficial	“Amide I (β-sheet), uracil”	(Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007; Billingham, Oladepo and Lopponow, 2009)
2830- 2913	kINPen®	“CH ₂ symmetric and asymmetric stretch of lipids”	(Senada Koljenović, † <i>et al.</i> , 2005)
2850	kINPen®	“ν _s CH ₂ , lipids, fatty acids, CH ₂ symmetric”	(Shetty <i>et al.</i> , 2006)
2880 (2883)	kINPen®	“CH ₂ asymmetric stretch of lipids and proteins”	(Senada Koljenović, † <i>et al.</i> , 2005)

2913-3000	APCIII	CH-, CH ₂ -, CH ₃ -Dehnungen und Vibrationen, sowie Lipide und Proteine	(Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007)
2943 (2940)	APCIII	“C-H vibrations in lipids & proteins ν_{as} CH ₂ , lipids, fatty acids”	(Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007)

Zwischen den Plasmaquellen zeigte sich für beide molekularen Komponenten, DNA und Lipide, zu allen Zeitpunkten außer zum Zeitpunkt 0 h von DNA superfizialer Zellen ($p = 0,0754$) ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$). Dabei bewirkten beide Plasmaquellen gerätespezifische Effekte auf die einzelnen Komponenten: DNA, Lipide und Proteine. Die PCs geben dabei den Anteil am Gesamtunterschied wieder. Prozentual höhere Werte und damit größere gerätespezifische Unterschiede ergaben sich auf Basis der Lipidkomponente. Auch zeigte sich, dass die Score-Mittelwerte beim kINPen® eine größere Streuung aufwiesen als beim APCIII (Abbildung 23). Die Gegenüberstellung von plasmabehandelten Geweben beider Geräte in der PCA ermöglichte eine Diskriminierung der Wirkung auf einzelne Komponenten. Hieraus ergab sich sowohl ein statistisch signifikanter Unterschied der Plasmawirkung als auch Hinweise auf die molekularen Bezugspunkte und die Konstanz einer Behandlung.

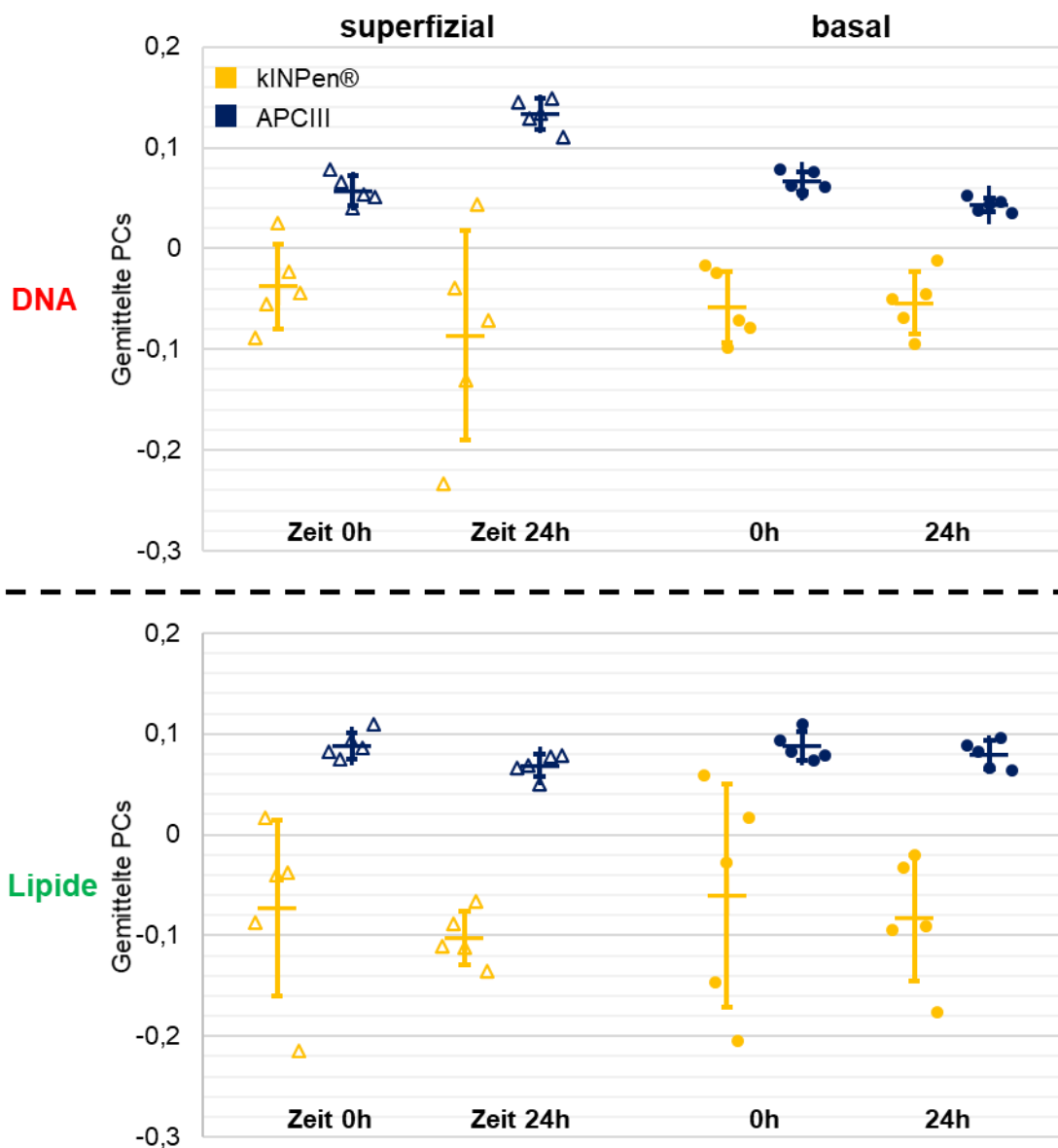


Abbildung 23: Unterschied zwischen kINPen® und APCIII.

Kombinierte Box-Plot-Analyse der PCA für DNA und Lipide anhand fünfminütig behandelte Proben beider Geräte. Der direkte Vergleich von behandeltem Gewebe zeigte signifikante gerätespezifische Unterschiede auf Basis beider Komponenten ($p < 0,05$). Dies galt nicht für den Vergleich der DNA zum Zeitpunkt 0 h von superfizialen Zellen ($p = 0,0754$). Die Standardabweichung war durchschnittlich größer für den kINPen®. Gelb kINPen®, blau APCIII. Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney Test. Bei $n = 5$ Proben pro Gerät und max. 50 Spektren pro Datenpunkt einer Kondition.

4 Diskussion

Ob als Katalysator für die Wundheilung, als bakterizid wirkendes Mittel in der Dermatologie und Zahnmedizin oder als Therapieoption für intraepitheliale sowie eventuell auch für invasive und solide Karzinome, Niedertemperaturplasma stellt eine vielversprechende Neuerung in zahlreichen medizinischen Gebieten dar (G. Isbary *et al.*, 2013; Matthes *et al.*, 2013; Schlegel, Köritzer and Boxhammer, 2013). Dabei spielte in der Literatur bisher die Charakterisierung unterschiedlicher Plasmageräte und die Analyse deren Wirkungen auf biologische Materialien und insbesondere auf Zelllinien eine übergeordnete Rolle. Eine fundamentale Frage jedoch, nämlich wie groß die funktionelle Gewebeeindringtiefe einer Plasmaapplikation ist, wurde bislang nur unzureichend untersucht und stellt eine wesentliche Motivation für die vorliegende Arbeit dar.

In dieser Studie war es möglich mittels Raman-Mikrospektroskopie molekulare Plasmaeffekte und -mechanismen in gesundem humanem Ex-vivo-Epithel der Zervix uteri nach einer zwei- und fünfminütigen Behandlung mit Niedertemperaturplasma zu untersuchen. Dosisabhängig plasma- oder kontrollbehandeltes Gewebe wurde für diesen Zweck kryokonserviert und orthogonal zum Epithel geschnitten. Bereits nativ unterschieden sich superfiziale und basale Zellschichten des Zervixepithels sowohl morphologisch (superfizial: spindelförmige Zellen mit kleinen Nuklei; basal: hochprismatische Zellen mit großen Nuklei) als auch Raman-mikrospektroskopisch, insbesondere in ihrer DNA-Konformation. Die Bildanalyse mittels TCA (True Component Analysis) und PCA (Principal Component Analysis) erlaubten die Identifikation und Auswertung verschiedener molekularer Gewebekomponenten (DNA, Lipide, Proteine, ER, Glykogen), die sowohl vor als auch nach Plasmabehandlung nachweisbar waren. Insbesondere konnten Effekte auf molekulare DNA und Lipidkomponenten beobachtet werden. Begünstigend für eine präzisere Beurteilung dieser Komponenten waren spezifische und etablierte Raman-Banden, die in PCAs eingepflegt wurden und statistisch signifikante Unterschiede nach Plasmabehandlung aufwiesen. Aufgrund der hohen Spezifität der analysierten Banden von DNA und Lipiden, wurden diese

Komponenten für die Bestimmung der Gewebeeindringtiefe einer Plasmabehandlung herangezogen. Es zeigte sich für die Plasmaquelle kINPen® eine Eindringtiefe von mindestens $271.1 \pm 102.7 \mu\text{m}$ und für das APCIII von mindestens $463,5 \pm 269,0 \mu\text{m}$.

4.1 Plasmaquellen

Der Nutzen von nicht-thermischem Plasma wurde bereits für zahlreiche medizinische Anwendungsgebiete, wie die Dermatologie oder Onkologie, untersucht (Isbary *et al.*, 2012; Schlegel, Köritzer and Boxhammer, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurden primäre humane Zervixepithelien *ex vivo* mit zwei unterschiedlichen, für die medizinische Anwendung zugelassenen Argonplasmaquellen behandelt. kINPen® und APCIII weisen unterschiedliche Prinzipien der Plasmagenerierung auf (siehe 1.3).

Das APCIII wird standardmäßig in der Elektrochirurgie als hochfrequente Plasmaquelle bei offenen oder auch endoskopischen Operationen genutzt. Entwickelt wurde das APCIII für die Koagulation von Blutungsquellen, was durch die Konversion von elektrischer Energie in thermische Energie geschieht. Der thermische Effekt ist dabei proportional zur elektrischen Stromstärke im Quadrat und zum elektrischen Widerstand des Körpers. Aufgrund des geringsten Widerstandes fließt der Strom und damit die thermische Energie von der Applikationselektrode direkt zur am Körper angebrachten Neutralelektrode (Absatz nach (Weiss, Utz, *et al.*, 2019; Wenzel *et al.*, 2020)). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass eine nicht-thermische Anwendung von elektrochirurgischen Argonplasmaquellen an biologischen Geweben beispielsweise durch konstante Bewegung der Plasmasonde möglich ist (Kölle *et al.*, 2019; Weiss, Utz, *et al.*, 2019; Feil *et al.*, 2020). Kölle *et al.* konnten durch OES (optic emission spectroscopy) und ESR-Spektroskopie (electron spin resonance) zwischen dem APCIII und dem kINPen® vergleichbare physikochemische Parameter (Infrarot-/UV-Strahlung, molekulare Komposition von Quelle und Gewebe) feststellen. Außerdem zeigte Weiss *et al.*, dass das APCIII eine höhere Radikaldichte generiert als herkömmliche Kaltplasma-

Quellen, wie beispielsweise der kINPen (Weiss, Utz, *et al.*, 2019). In einer Studie von Feil *et al.* konnte zudem gezeigt werden, dass die Proliferation verschiedener Zervixkarzinom-Zelllinien unter nicht-thermischer Anwendung elektrochirurgischer Plasmaquellen inhibiert wurde (Feil *et al.*, 2020). Demnach konnte unter Berücksichtigung der alternativen Anwendung für das APCIII eine ähnliche antikanzerogene Wirkung angenommen werden, wie sie bereits für den kINPen® nachgewiesen wurde. Aufgrund der guten Verfügbarkeit und langjährigen Erfahrung in Kliniken besteht für das APCIII und andere elektrochirurgische Plasmaquellen ein großes Potenzial für die Anwendung als Niedertemperaturplasmaquelle.

Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten für beide Plasmaquellen Effekte zum Teil in denselben Raman-Banden, wie auch in unterschiedlichen identifiziert und den jeweiligen molekularen Komponenten zugeordnet werden. Außerdem wurde durch diese Studie erneut bestätigt, dass eine nicht-thermische Behandlung unter den von Weiss *et al.* genannten Voraussetzungen möglich ist (Abbildung 15B) (Weiss, Utz, *et al.*, 2019).

4.2 Raman-Mikrospektroskopie

Die Raman-Mikrospektroskopie stellt ein etabliertes Verfahren zur kontaktlosen und markerunabhängigen Detektion von molekularen Strukturen sowohl von chemischen Agenzien als auch biologischen Geweben dar. Seit der erstmaligen Beschreibung des Raman-Effekts, 1928, wurde er in zahlreichen Studien genutzt, die sich mit der Beschaffenheit molekularer Strukturen verschiedenster Art befassten (Ryder, O'Connor and Glynn, 1999; Kister *et al.*, 2000).

Die Raman-Spektroskopie eignete sich in der Vergangenheit vor allem dazu Feststoffe oder ausgehärtete Flüssigkeiten zu untersuchen. Hierbei kann sie neben der Struktur von Stoffen, den molekularen Aufbau darstellen und sogar die chemischen Komponenten identifizieren bzw. unterscheiden. Eine Herausforderung dieser Methode liegt in der Untersuchung von Flüssigkeiten oder Gasen. Da sich die Moleküle ständig in Bewegung befinden, kommt es auch bei einer sehr kurzen Akquirierungszeit von weniger als 0,1 Sekunden zu

unpräzisen Spektren oder Bewegungsartefakten. Einzelne Studien befassten sich damit dieses Problem zu umgehen, indem sehr dünne Flüssigkeitsfilme und noch kürzere Akquirierungszeiten oder andere Laserwellenlängen genutzt wurden (Asher and Johnson, 1984; Tauber *et al.*, 2003). Darüber hinaus schafft die Heterogenität von Molekülen in biologischen Proben im Vergleich zu chemisch definierten Substanzen Raum für Ungenauigkeiten im Rahmen von Analysen und Interpretation. Shen *et al.* gehen in ihrem Review unter anderem auch auf diese Problematik ein (Shen, Hu and Min, 2019). Hierbei verweisen sie beispielsweise auf die Arbeit von Rinia *et al.*, die mittels MCARS (Multiplex Coherent Anti Stokes Raman Scattering; eine technisch abgewandelte Form der Raman-Spektroskopie) eine Unterscheidung von Raman-Banden für das Vorliegen von Lipidtröpfchen in Zellen erreichen konnten (Rinia *et al.*, 2008). Für ein vollständiges Verständnis für das Raman-spezifische Verhalten von biologischem Gewebe sind trotz dieser Erfolge weitere derartige Ergebnisse erforderlich. Eine zusätzliche Herausforderung (wie auch in der vorliegenden Arbeit beschrieben) ist der Verlust spektraler Informationen durch (Auto-)Fluoreszenz. Xie *et al.* gelang es mittels Graphen als Substrat eine Absorption der Fluoreszenz zu erreichen. Allerdings konnte diese Methode nur für die Resonanz-Raman-Spektroskopie, eine Unterform, bestätigt werden (Xie *et al.*, 2009). In der vorliegenden Studie ermöglichte die Herstellung von dünneren Kryoschnitten, die Fluoreszenz, die von frischem Zervixgewebe ausging, zu minimieren.

Biologisches Gewebe wurde seit Beginn der 2000er vermehrt mit der Raman-Mikrospektroskopie untersucht. Movasaghi *et al.* trugen als Erste die Ergebnisse der gefundenen Spektren in einem Review zusammen, welches später von Talari *et al.* aktualisiert wurde (Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007; Talari *et al.*, 2015). Als ein Verfahren, das darauf spezialisiert ist, molekulare Strukturen durch Wellenlängenänderungen von Photonen zu erfassen, bietet es auch großes Potenzial die strukturellen und molekularen Prozesse in Zellen zu identifizieren. Für die molekulare Analyse von Zellen stellt die Raman-Mikrospektroskopie ein kontaktloses und markerunabhängiges Verfahren dar, das bereits erfolgreich zum Monitoring von Apoptose,

Nekrosevorgängen und zur Analyse des Zellzyklus eingesetzt wurde (Swain, Jell and Stevens, 2008; Brauchle *et al.*, 2015). Auch für die Unterscheidung verschiedener Zellarten, wie beispielsweise Kardiomyozyten, glatten Muskelzellen, oder extrazellulären Strukturen und für die Untersuchung deren Aufbaus konnte die Raman-Mikrospektroskopie etabliert werden (Brauchle and Schenke-Layland, 2013; Brauchle *et al.*, 2016; Marzi *et al.*, 2019). Darüber hinaus fand das Raman-Verfahren in Vorversuchen zu dieser Studie an plasmabehandelten Zervixkarzinomzellen Anwendung (Wenzel *et al.*, 2019).

Eine Verwendung der Raman-Mikrospektroskopie für unsere Studie schien unter den genannten Punkten geeignet. Nicht nur konnten durch weitere Gruppen zelluläre Komponenten erfolgreich identifiziert werden, es war auch möglich über deren Gehalt Zellzyklus und Apoptose- bzw. Nekrosevorgänge zu detektieren, was vor allem für die Verfolgung von plasmaspezifischen Veränderungen bedeutend ist (Brauchle *et al.*, 2015). Diese Veränderungen werden zudem durch die Markerunabhängigkeit und Kontaktlosigkeit der Methode nicht verfälscht. Mit der erfolgreichen Etablierung der Raman-Mikrospektroskopie zur Evaluierung plasmaspezifischer Veränderungen und der Bestimmung der funktionellen Gewebepenetration ist auch ein Monitoring der klinischen Wirkung denkbar.

4.3 Analyse der Raman-Spektren

Über Analyse der gewonnenen Raman-Spektren mittels TCA und PCA wurden in dieser Studie spezifische molekulare Gewebekomponenten, deren relative Verteilung und Intensität, sowie plasmaspezifische Veränderungen und gerätespezifische Unterschiede untersucht.

Die Bildanalyse durch TCA ermöglichte neben der Extraktion von einzelnen Raman-Spektren auch eine intensitätsgewichtete Darstellung der zugehörigen Komponenten. Hierfür werden extrahierte Spektren vom Programm mit allen weiteren Spektren (bzw. Pixeln) abgeglichen und ähnliche Daten farblich entsprechend codiert. Auf diese Weise wird aus den spektralen Daten eine grafisch-morphologische Darstellung des untersuchten Gewebeschnitts

generiert. Diese Analysemethode wurde zuvor bereits von Marzi et al. für die Identifikation von extrazellulären und zellulären Komponenten im Rahmen der Typisierung von glatten Muskelzellen beschrieben (Marzi *et al.*, 2019). Weiter wurde dieselbe Analyse der spektralen Daten von Zbinden et al. durchgeführt, um intensitätsabhängige Abbildungen von Pseudo-Beta-Zell-Inseln zu generieren und die darin enthaltenen Komponenten über die Stärke des MGVs (mean grey values) nach Behandlung mit verschiedenen konzentrierten Pufferlösungen zu quantifizieren (Zbinden *et al.*, 2019).

Zusätzlich wurden die gewonnenen Raman-Spektren per PCA analysiert, die als Analysemethode insbesondere die Verarbeitung multifaktorieller Datensätze und Differenzierung großer Datenmengen ermöglicht. Die PCA wurde zuvor bereits in zahlreichen Arbeiten verwendet und in einer Arbeit von Zbinden et al. analog zur vorliegenden Studie für die Analyse von Lipidspektren etabliert und angewendet (Pudlas *et al.*, 2011; Zbinden *et al.*, 2019). Für diese Studie wurden die verschiedenen Konditionen in separaten PCAs untersucht, um eine Interferenz zwischen feinsten plasmaspezifischen Unterschieden und biologischer Varianz interindividueller Gewebe auszuschließen. Insbesondere die PCA ermöglichte die Differenzierung von gerätespezifischen Banden (Tabelle 11) und machte molekulare Veränderungen nach einer Plasmabehandlung statistisch validierbar.

4.4 Analyse molekularer Effekte von Niedertemperaturplasmen

Mittels Raman-Mikrospektroskopie gelang es im direkten Vergleich von behandeltem und unbehandeltem Gewebe spektrale Banden zu identifizieren, die einen Hinweis auf die molekulare Wirkweise von nicht-thermischem Plasma geben. TCA und PCA ermöglichten die Entschlüsselung der molekularen Zusammensetzung in allen epithelialen Schichten vor und nach Plasmabehandlung.

Mittels TCA konnten molekulare Komponenten zellulärer Strukturen in nativen zervikalen Epithelien identifiziert werden. Zu den zellulär stets exprimierten und identifizierbaren Komponenten zählen: Lipide, endoplasmatisches Retikulum

(ER), Glykogen, Kollagenfasern, DNA und Proteine. Während Lipide vor allem für die Struktur und Form von Zellen zuständig sind, gilt das ER als Ort der Proteinbiosynthese und der posttranslationalen Modifikation. Glykogen wurde besonders in oberflächlichen Schichten nachgewiesen. Dies entspricht der physiologischen Speicherung in zervikalem Epithel, wo es nach Abschilferung von Zellen als Nahrung für das physiologische vaginale Mikrobiom und Aufbau des sauren pH-Milieus dient. Kollagenfasern sind der Grundbaustoff des subkutanen Gewebes und finden sich auf Grund ihrer Funktion als Fundament für die Epithelien besonders stark ausgebildet im Bereich der Basallamina. DNA, die sich im Nukleus der Zellen befindet, dient der Speicherung der Erbinformation und mündet letztlich in Proteinen, die in Zellkern und Zytosol vorliegen. Darüber hinaus wurden neben den von uns gefundenen Komponenten auch Mitochondrien und der Golgi-Apparat anhand von Gliomzellen beschrieben (Klein *et al.*, 2012). Andere Gruppen untersuchten zur präziseren und störungsfreieren Beschreibung der DNA verschiedene Techniken der Raman-Spektroskopie (Zhang *et al.*, 2012). Auch wurde Zervixgewebe bereits im Vorfeld mittels Raman-Spektroskopie im Rahmen von Studien zur Detektion von zervikalen Neoplasien untersucht (Jess *et al.*, 2007; Lyng *et al.*, 2015; Aljakouch *et al.*, 2019).

Über die TCA war es nicht möglich eine signifikant veränderte Signalintensität und damit eine ggf. verminderte Expression einzelner Komponenten nach Plasmabehandlung nachzuweisen (Abbildung 18). Die Verteilung und Morphologie einzelner Komponenten zeigte sich in gesundem Zervixgewebe, bis auf eine tropfenförmige Aggregation von Lipiden nach 24-stündiger Inkubation, unauffällig (Abbildung 17). Auch in zahlreichen Studien zuvor zeigte physiologisches Gewebe ein deutlich geringeres Ansprechen auf eine nicht-thermische Plasmabehandlung als Karzinomzellen (Kim and Chung, 2016). Darüber hinaus stünde eine signifikante Veränderung der epithelialen Zellmorphologie im Gegensatz zu den meisten bisherigen Ergebnissen mit gesundem Zellmaterial (Keidar *et al.*, 2013; Schlegel, Köritzer and Boxhammer, 2013; Siu *et al.*, 2015). Eine Ausnahme bildet die Arbeit von Dezest *et al.*, die *in vitro* eine höhere Apoptoseresistenz von malignen Zellen gegenüber

verschiedenen Heliumplasmaarten feststellen konnten, als dies bei gesunden Keratinozyten der Fall war (Dezest *et al.*, 2017).

Mittels PCA wiederum wurden signifikante spektrale Veränderungen nach einer Plasmabehandlung sowohl durch kINPen® (Wenzel *et al.*, 2019) als auch für das APCIII nachgewiesen (Wenzel *et al.*, 2020). Insbesondere wurden in den Komponenten Lipide, DNA und zum Teil in Proteinen plasmaspezifische Veränderungen gefunden. Für Glykogen konnten v.a. aufgrund der Inkonzanz des Vorkommens keine eindeutigen Aussagen getroffen werden. Im Falle des ERs konnten nicht immer eindeutige und hochspezifische Raman-Banden identifiziert werden, um eine präzise Untersuchung mittels PCA anzuschließen. Über die TCA war es jedoch möglich signifikante morphologische und intensitätsabhängige Veränderungen auszuschließen. Kollagen, als ein wesentlicher Teil der Basalmembran wurde in dieser Studie wegen der subbasalen Lokalisation nicht weiter untersucht. Auch andere Studien wiesen molekulare Veränderungen an zellulären Strukturen nach Plasmabehandlung auf. In einem Review von Reiazi *et al.* konnte zusammenfassend dargestellt werden, dass Lipide, DNA und Protein unter oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) stehen. Hierdurch kommt es vor allem in Krebszellen zu DNA-Strangbrüchen, Oxidation von Lipiden, einem Funktionsverlust der Proteine und durch die Induktion von Apoptose zu einem Verlust der Integrität der Zelle (Reiazi *et al.*, 2017). Auch Arjunan *et al.* konnten in einem Review die vielseitigen Effekte von Plasma auf DNA herausarbeiten und fassten Versuche verschiedener Gruppen zusammen, die vor allem RONS und UV-Strahlung einzeln in Bezug auf Einzel- und Doppelstrangbrüche untersuchten (Arjunan, Sharma and Ptasinska, 2015). Auch wurde hier ein verstärkter Effekt auf stark kondensierte DNA beschrieben, der von Ptasinska *et al.* und Kim *et al.* erstmals herausgearbeitet wurde (SM and JI, 2006; Ptasinska *et al.*, 2010). Für das ER konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass es durch oxidativen Stress einer Plasmabehandlung zur Induktion von Apoptose kommt (Zhao *et al.*, 2013). Eine Aussage zu plasmaspezifischen Effekten auf Glykogen konnte in der aktuellen Literatur nicht gefunden werden.

In Vorarbeiten wurden Alterationen von Lipiden und DNA im Zusammenhang mit einer Apoptoseinduktion (Partecke *et al.*, 2012) und der Formierung unterschiedlicher Radikale (Dobrynin *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2013; Szili *et al.*, 2015, 2018) untersucht. Auch wurde in der vorliegenden Arbeit ein besonderer Fokus auf die plasmaspezifische Analyse von DNA- und Lipidkomponenten gelegt. Aus der Analyse der Raman-Spektren konnten für beide Plasmaquellen spezifische spektrale Banden gewonnen werden, die DNA, RNA und DNA-Rückgrat (785, 788 – 791, 1094, 1340, 1490 und 1578 rel. cm^{-1}) bzw. Fettsäuren, C-C-Dehnungen sowie Phospholipide (1437, 1656/1657, 2850, 2880 und 2950 rel. cm^{-1}) typisch zuzuordnen sind (vgl. Tabelle 9 und Tabelle 10). Hinzu kamen Banden, die für mehrere Komponenten Anhaltspunkte liefern (1376, 1640, 1676 rel. cm^{-1}). Speziell die Banden 1640 und 1676 rel. cm^{-1} deuten neben ihrer Bedeutung für Nukleotide (Billinghurst, Oladepo and Loppnow, 2009) auch auf eine Plasmawirkung an Proteinen hin (Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007), was das Gesamtbild der Apoptoseinduktion verstärkt. Im Review von Arjunan *et al.* zur Wirkung von Niedertemperaturplasma auf die DNA werden mehrfach dosisabhängige DNA-Schäden durch eine Plasmaapplikation beschrieben (Arjunan, Sharma and Ptasinska, 2015). Auch Wang *et al.* fanden bei ihren Versuchen zur Charakterisierung von nicht-thermischer Plasmabehandlung mit dem kINPen® Veränderungen an Lipid-, Protein- und DNA-Komponenten in *Bacillus subtilis* Sporen (Wang *et al.*, 2016). Dabei lagen die wesentlichen Unterschiede in den Banden 621 und 782 rel. cm^{-1} für DNA, 1004 rel. cm^{-1} für Lipide und 1245, 1605 und 1655 rel. cm^{-1} für Proteine. Furuta *et al.* untersuchten knospende Hefezellen als Modell für Eukaryoten und behandelten diese mit nicht-thermischem Plasma. Hierbei konnten neben 1440 rel. cm^{-1} ebenfalls die Bande 1655 rel. cm^{-1} als Marker für Veränderungen von Lipiden, Phospholipiden und Proteinen identifiziert werden (Furuta, Kurake, Ishikawa, *et al.*, 2017). In weiteren Untersuchungen wurden HeLa-Zellen mit plasmaaktiviertem Medium (PAM) behandelt und die Aktivierung von Caspasen gemessen. Im Vergleich zu Apoptosevorgängen in unbehandelten Karzinomzellen fanden sie eine

Erschöpfung der Lipidtropfen, die vor allem über die Raman-Bande 1655 rel. cm^{-1} abgebildet wurde (Furuta, Kurake, Takeda, *et al.*, 2017).

In der vorliegenden Arbeit konnten durch den direkten Vergleich von nicht-thermisch angewendetem APCIII mit der konventionellen Kaltplasmaquelle kINPen® zusätzlich zu den Ergebnissen aus 3.3.1 Erkenntnisse über gerätetypische Unterschiede gewonnen werden (vgl. 3.3.4). Hierbei zeigten sich gerätespezifische Banden sowohl an DNA- als auch an Lipid-Komponenten (vgl. Tabelle 11). Vor allem die Banden 788 – 791 und 1094 rel. cm^{-1} verdeutlichten, dass das APCIII einen stärkeren Effekt auf die basale DNA zu haben scheint als der kINPen®, welcher wirkungsvoller superfiziale DNA-Komponenten beeinflusste. In den Loadings zeichnete sich dieser Unterschied durch negative Banden im zellkerntypischen Bereich von 779 – 788 rel. cm^{-1} ab, die dem kINPen® zuzurechnen sind (Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007). Dagegen weisen die positiven APCIII-Banden 788 – 791 rel. cm^{-1} auf eine verstärkte DNA-Wirksamkeit im Sinne einer Helix-Dehnung vor allem basal hin, was sich mit den Ergebnissen aus 3.3.1 deckt (Liu *et al.*, 2008; Talari *et al.*, 2015). Zusätzlich fanden sich für das APCIII mit den Banden 802 und 1676 rel. cm^{-1} Hinweise auf eine verstärkte RNA-Wirksamkeit (Farquharson *et al.*, 2005; Billinghamurst, Oladepo and Loppnow, 2009). Das APCIII zeigte vor allem in der Basalzellschicht und nach fünfminütiger Behandlung einen stärkeren Einfluss als der kINPen® auf die untersuchten Komponenten. In allen gemessenen Schichten und Komponenten war die Bande bei 1005 rel. cm^{-1} für das APCIII als Ausschlag zu erkennen und deutet auf eine Veränderung von Phenylalanin hin (Notingher *et al.*, 2004). Daneben konnten weitere Banden bei 940 und 1676 rel. cm^{-1} als proteintypisch identifiziert werden, die beim APCIII stärker superfizial als basal ausgeprägt waren und nach 24 h abnahmen (Gniadecka *et al.*, 2004; Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007). Dies stärkt die Annahme, dass auch Proteine durch Applikation von Niedertemperaturplasma molekular verändert werden. Bislang konnten derartige Effekte vor allem für Plasmajets, wie den kINPen®, beobachtet werden. Diese beschreiben aber veränderte Kinase-Signalwege (Schmidt *et al.*, 2019), eine gesteigerte Expression von beispielsweise Angiogenin oder VEGF (Arndt *et al.*, 2018) und die Induktion

unterschiedlichster Proteine zur Bewältigung von oxidativem Stress (Scharf *et al.*, 2019). Somit scheint es, dass beide Geräte Proteine beeinflussen. Jedoch deuten die gefundenen Banden unterschiedliche Wirkmechanismen für den kINPen® (Proteinbanden: 1000, 1573 und 2880 rel. cm^{-1}) und das APCIII (Proteinbanden: 940, 1005, 1676 und 2943 rel. cm^{-1}) an.

Ebenso wenig Rückschlüsse gibt die Bande bei 1347 rel. cm^{-1} , die nach Behandlung mit APCIII gefunden wurde. Interessanterweise galt diese im Zusammenhang mit biologischem/zellulärem Gewebe bis zum Jahr 2007 als nicht vergeben (Farquharson *et al.*, 2005; reviewed in Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007). Auch in Talari *et al.*, die das Review von Movasaghi *et al.* aktualisierten, wird diese Bande noch als nicht zugewiesen beschrieben (Talari *et al.*, 2015). Nur im weiter gefassten Bereich von 1340 – 1347 rel. cm^{-1} wird eine Assoziation mit Nukleotiden und CH-Verformungen vermutet (Krafft *et al.*, 2003; Neugebauer *et al.*, 2010; Talari *et al.*, 2015). Bis heute wurde das Vorkommen der Bande 1347 rel. cm^{-1} nur in Zusammenhang mit Tomatenhaut und DNA von Apfelblättermzellen gezeigt (Muntean *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2019). Die Bande korreliert mit keiner der als plasmaspezifisch identifizierten Komponenten in der vorliegenden Studie. Dennoch war sie in den meisten Loadings nach APC Behandlung zu finden (vgl. Anhang 5.2.1-8 und 6). Die Bande könnte also mit der Wirkung der APCIII-Plasmabehandlung in Verbindung stehen. Ob die Bande als potenzieller (Bio-)Marker für die APC-Behandlung dienen könnte, gilt es in weiteren Studien zu untersuchen.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Geräten kINPen® und APCIII zeigte sich bei allen Vergleichen im Bereich der Protein- und Lipidbanden (vgl. Abbildung 22). Banden von 2830 – 2913 rel. cm^{-1} wurden durch den kINPen® repräsentiert und verfügten über Intensitätsspitzen bei 2850 und 2880 rel. cm^{-1} . Im Bereich von 2913 – 3000 rel. cm^{-1} fanden sich diejenigen Banden, die dem APCIII zuzuordnen waren mit einer eindeutigen Intensitätsspitze bei 2943 rel. cm^{-1} . Zum Teil finden sich hier die bereits diskutierten Proteine (Kapitel 3.3.4), jedoch gibt dieser Bereich ebenso Aufschlüsse über Lipide, im Speziellen über Dehnungen und Vibrationen von Fettsäuren, C-C- und C=C-Verbindungen (Senada Koljenović, † *et al.*, 2005;

Shetty *et al.*, 2006; Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007). Leider sind die zu findenden Deutungen dieser Banden in der Literatur sehr allgemein und lassen daher wenig Rückschlüsse auf mechanistische und molekulare Unterschiede zu. Potenziell könnte es durch den Einfluss von Radikalen zum Aufbrechen und zur Neubildung von molekularen Bindungen kommen, die die Organisation der Lipide und lipidähnlichen Strukturen beeinflusst. Einen Hinweis auf die Wirkweise der unterschiedlichen Niedertemperaturplasmen gab der Vergleich der Geräte, wobei weitere kINPen®- bzw. APCIII-spezifische Raman-Banden identifiziert werden konnten (vgl. Abbildung 22 und Anhang 7). Darüber hinaus deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass sich die Geräte durch die unterschiedliche Art der Plasmagenerierung auch wesentlich in der Art ihrer molekularen Wirkmechanismen unterscheiden. So könnten die Eigenschaften des jeweiligen Plasmas sowohl in der Menge als auch in der Komposition der generierten Radikalsorten und anderer Plasmabestandteile (UV-, elektromagnetische-Strahlung und Ionen/Elektronen) variieren, was die Diskrepanz der Intensitätsspitzen erklären würde.

Zusammenfassend war es möglich, die gerätespezifischen molekularen Effekte einer Plasmabehandlung mittels kINPen® und APCIII näher zu verfolgen. Zudem stimmten unsere Ergebnisse mit den Resultaten anderer Studien überein. Von den gefundenen, zellulären Komponenten lieferten vor allem Lipide, DNA und zum Teil Proteine Aufschluss über mögliche plasmaspezifische Wirkmechanismen. Darüber hinaus konnte die Bande bei $1347 \text{ rel. cm}^{-1}$ als potenziell spezifischer Marker für eine APCIII-Plasmabehandlung identifiziert werden.

4.5 Bestimmung der Gewebepenetrationstiefe

Die vorliegende Studie stellt die erste Studie dar, die die funktionelle Gewebepenetrationstiefe einer Plasmabehandlung kontaktlos und markerunabhängig anhand veränderter molekularer Signaturen von molekularen Zellkomponenten bestimmt.

Wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, wurde bereits in nativem Gewebe mittels Raman-Mikrospektroskopie und PCA-Auswertung ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,0313$) von superfizialer gegenüber basaler DNA festgestellt, der möglicherweise durch die DNA-Konformation in Hetero- bzw. Euchromatin gegeben ist (Abbildung 13). Euchromatische DNA findet sich vor allem in stark transkriptions- und teilungsaktiven Zellen, wie sie in der Basalzellschicht von humanem zervikalem Plattenepithel zu finden sind. Im Gegenteil dazu beschreibt Heterochromatin den kondensierten DNA-Zustand. Hieraus folgte der Entschluss die Vergleiche aller weiteren Komponenten in superfizial und basal zu unterteilen.

In den nachfolgenden Versuchen zur Bestimmung der funktionellen Gewebepenetration konnten die oben beschriebenen Veränderungen der molekularen Komponenten durch Plasmabehandlung regelhaft noch bis in die Basalzellschicht mit einer Epitheltiefe von bis zu 424 μm (kINPen®; Durchschnitt: 271,1 μm) bzw. bis zu 1034 μm (APCIII; Durchschnitt: 463,5 μm) nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 16). Damit reihen sich die Ergebnisse zwischen Werten ein, die auf Basis von Apoptoseinduktion, pH-Werten sowie Sauer-/Stickstoffradikal-Konzentrationen erhoben wurden (Dobrynin *et al.*, 2012; Partecke *et al.*, 2012; Duan, Lu and He, 2017). Da sich die durchschnittliche Epitheldicke der mit kINPen® und APCIII behandelten Gewebe jedoch erheblich voneinander unterschied und methodisch nicht vor der Behandlung ermittelt werden konnte, um das frische Gewebe direkt verarbeiten zu können, ist ein direkter Vergleich der Plasmaquellen diesbezüglich nicht möglich.

Insbesondere die Scores des APCIII in hoher Gewebetiefe waren noch statistisch signifikant ($p < 0,0313$; vgl. 3.3.1 und 3.3.2). Ein Grund hierfür könnte die Elektrodenlokalisation sein, die sich zwischen den Geräten wesentlich unterscheidet. So ist ein gerichteter Strom von geladenen Molekülen, inklusive Radikalen, entlang eines elektromagnetischen Felds durch das Gewebe denkbar. Ebenso möglich erscheint das Phänomen der Elektroporation. Hierbei wird mittels Stroms die Penetration von Zellmembranen für Moleküle erleichtert, was im Falle des APCIII möglicherweise zu einem verstärkten Ein- und

Durchdringen von Radikalen führte (Shi *et al.*, 2018). Außerdem waren höhere DNA-Scores für beide Geräte bei höher epithelialisiertem Gewebe auffallend (Abbildung 20). Eine Möglichkeit hierfür ist, dass plasmazuspezifische Prozesse einen stärkeren Effekt auf proliferative Zellen ausüben. Diese sind am zervikalen Gewebe vor allem basal vorzufinden. Da aus unseren Ergebnissen ebenso hervorging, dass die Eindringtiefe abhängig von der Behandlungsdauer und der Einwirkzeit ist, liegt als Erklärung nahe, dass sich Zellen in tieferen Schichten noch in einer Frühphase der Plasmareaktion befinden, während die Reaktion in superfizialen Schichten bereits abgelaufen ist. Das vermehrte Vorliegen von Euchromatin und damit einsträngiger DNA, die von einer Plasmabehandlung stärker betroffen ist, könnte Ansatz einer weiteren Erklärung sein (Lackmann *et al.*, 2013).

Versuche zur Bestimmung der Plasmagewebeeindringtiefe wurden bislang nur mit markerabhängigen Verfahren durchgeführt. So bestimmten Partecke *et al.* eine Gewebeeindringtiefe über die gewebetiefenabhängige Expression von Ki-67 in pankreatischen Adenokarzinomzellen im TUM-CAM (Tumour-Chorio-Allantoic Membrane) Modell. Ki-67 sollte dabei als Proliferationsmarker Aufschluss über die Viabilität der behandelten Zellen liefern. Als Endpunkt gibt die Expression von Ki-67 allerdings nur Hinweise darüber, dass eine gewisse Wirkschwelle überschritten wurde, während unterschwellige und beginnende molekulare Prozesse plasmabehandelter Zellen ggf. nicht identifiziert werden. Dieselbe Problematik stellt sich auch beim ergänzend durchgeführten TUNEL (terminal deoxynucleotide transferase) assay dar, womit die Apoptoseeignung der Zellen abgebildet wurde. Über genannte Methoden ermittelten Partecke *et al.* eine Tiefe von 50 µm nach 20 s Behandlungszeit mit dem kINPen09 (Partecke *et al.*, 2012). Auch Apoptose stellt einen späten zellulären Endpunkt dar, der vorangehende funktionelle Effekte wie Stoffwechselaktivität oder Zellzyklus nur unzureichend abbildet. Die Eindringtiefen von Partecke *et al.* wurden überdies an Karzinomzellen ermittelt und unterscheiden sich dadurch vom Ansatz unserer Versuche an gesunden Epithelien. Duan *et al.* hingegen ermittelten die Eindringtiefe über die Menge an vorhandenen Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS; O₃, H₂O₂, OH, NO₂⁻, NO₂⁻ + NO₃⁻) in DPBS. Dieses

diente als Auffangbehältnis unterhalb verschieden dick geschnittener Muskelgewebeproben (Schwein), welche bis zu 15 min plasmabehandelt wurden. Noch bei einer Gewebedicke von 1250 μm konnten in DPBS RNS ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) nachgewiesen werden (Duan, Lu and He, 2017). Allerdings war dies nur nach 15 min der Fall. Bei fünfminütiger Behandlung konnte maximal eine Gewebedicke von 750 μm durchwandert werden. Diese Grenze von 750 μm wurde bei einer unserer Proben mit einem deutlichen Score $\Delta > 0,1$ überschritten (Tabelle 8, Probe 027 und Abbildung 19). Über den indirekten Nachweis von RONS, in Kombination mit einer pH-Bestimmung, konnten Dobrynin et al. eine Eindringtiefe von 10 - 30 mm nach höchstens zwei min Behandlungszeit im Mausmodell nachweisen (Dobrynin *et al.*, 2012) und liegen mit ihren Ergebnissen deutlich über den Werten, die in der vorliegenden Studie bestimmt wurden. Hierfür wurde die Epidermis von Mäusen mit einer DBD (dielectric barrier discharge) Plasmaquelle behandelt und anschließend versucht die Ergebnisse in Agarose-Gel zu replizieren, um eine Alternative zum Tiermodell zu etablieren. Die fragliche Übertragbarkeit von Mäuseepithelien und insbesondere von Agarose-Gelen hin zu menschlichen Geweben, lässt somit eine nur eingeschränkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu. Je nach Sensitivität der Methode wurden in diesem Fall gegebenenfalls kleinste Veränderungen des pH-Wertes erfasst und damit auf die Penetrationstiefe von RONS rückgeschlossen. Ob diese Konzentrationen in vitalem Gewebe ausreichen würden, um molekulare Effekte anzustoßen, bleibt Spekulation. Über die markerunabhängige Bestimmung der plasmaspezifischen molekularen Zelleffekte mittels Raman-Mikrospektroskopie konnte in der vorliegenden Studie eine minimale funktionelle Gewebepenetrationstiefe von Niedertemperaturplasma bestimmt werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Plasmaapplikation die Basalzellschicht nicht nur erreicht, sondern auch einen statistisch signifikanten molekularen Effekt auslöst und somit zervikale Neoplasien erfassen und ggf. therapieren könnte. Dies ist neben der CIN für viele weitere Krankheitsbilder von besonderem medizinischem Interesse.

4.6 Einfluss von Behandlungsdauer und Inkubationsdauer

Die Effekte der Superficial- und Basalzellschicht zeigten eine deutliche Abhängigkeit zur Plasmabehandlungsdauer. Während in der superfizialen Zellschicht geräteunabhängig bereits nach einer zweiminütigen Plasmabehandlung ein Score-Unterschied in den DNA- und Lipidkomponenten zu beobachten war, konnte bei gleicher Behandlungsdauer keine Veränderung in der basalen Zellschicht festgestellt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Duan et al. überein, die ihrerseits unterschiedliche RONS Konzentrationen nach Plasmabehandlung in unterschiedlichen Gewebedicken messen konnten (Duan, Lu and He, 2017). Volotskova et al. zeigten, dass eine zweiminütige Behandlung gegenüber einer einminütigen Behandlung die Lebensfähigkeit verschiedener Zelltypen drastisch reduziert (Volotskova et al., 2012). Kawasaki et al. konnten außerdem im Agarosemodell eine angenäherte Eindringgeschwindigkeit für Plasmajets bestimmen, die zwischen 0,14 mm/min und 0,2 mm/min liegt (Kawasaki et al., 2016). Diese Werte suggerieren durch die ermittelte Eindringtiefe pro Zeiteinheit einen Einfluss von Plasmabehandlungsdauer, -dosierung und -einwirkzeit und sind auch mit den Ergebnissen dieser Studie vereinbar.

Interessanterweise näherten sich die plasmaabhängigen Score-Veränderungen in der Basalzellschicht nach zweiminütigen Behandlungen und nach einer Einwirkzeit von 24 h ebenfalls den Scores einer fünfminütigen Plasmabehandlung an. Dies lässt vermuten, dass eine molekulare Veränderung der Zellen erst angestoßen werden muss, bevor sie ihre volle Wirkung zeigt. Alternativ bzw. ergänzend ist eine Durchwanderung von Radikalen durch das Gewebe entlang der Behandlungsrichtung denkbar, die tiefer liegende Schichten erst später erreicht.

Die Wirkkomponenten des Niedertemperaturplasma legten zum Teil eine Strecke von über 1000 µm (Durchschnitt: kINPen®: 271,1 µm APCIII: 463,5 µm) im superfizial behandelten Epithel zurück und beeinflusste auch in dieser Tiefe noch signifikant die molekulare Zusammensetzung der Zellen. Bei der Gegenüberstellung von Scores der PCA und den dazugehörigen Messtiefen im Gewebe zeigte sich für einige zelluläre Komponenten überraschenderweise

eine positive Korrelation zwischen diesen beiden Parametern. Die erreichbare Tiefe einer Applikation scheint dabei von den Faktoren, Behandlungsdauer und Einwirkzeit, abzuhängen.

Zusammenfassend kann durch die Ergebnisse zur gerätespezifischen Gewebeeindringtiefe nun eine genauere Einschätzung darüber getroffen werden, wann und wofür eine Plasmabehandlung indiziert ist. Zudem konnte prinzipiell ein vergleichbarer Effekt der beiden Geräte, kINPen® und APCIII, gezeigt werden. Auch wenn sich die beiden Geräte in den vermittelten Gewebeeffekten leicht unterscheiden, scheinen beide Geräte geeignet für weitere Studien im Bereich der Plasmamedizin, insbesondere der Behandlung von Karzinomen und Präkanzerosen, der Förderung von Wundheilung oder der Desinfektion von Oberflächen. Das APCIII als Vertreter von elektrochirurgischen Argonplasmaquellen ist zudem vielerorts etabliert und kann durch die spezifische Anwendung eine kostengünstige Alternative für die Generierung von nicht-thermischem Plasma sein.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, mittels Raman-Mikrospektroskopie die funktionelle Gewebepenetrationstiefe von physikalischem Niedertemperaturplasma anhand der Effekte auf molekulare Zellkomponenten kontaktlos und markerfrei zu bestimmen. Darüber hinaus sollte die Raman-Mikrospektroskopie als Methode zum zukünftigen Monitoring einer Plasmabehandlung evaluiert werden.

Zu diesem Zweck wurden gesunde humane Gewebeproben der Zervix uteri ex vivo mit zwei unterschiedlichen Plasmaquellen, kINPen® und APCIII, unter konstanten Bedingungen nicht-thermisch behandelt. Als geeignete Konservierungsart zur Untersuchung von molekularen Effekten abhängig von Plasmabehandlungsdauer und -einwirkzeit wurde die Kryokonservierung identifiziert. Die Raman-Mikrospektroskopie konzentrierte sich bei der Messung der kryokonservierten Querschnitte auf das Stratum superfiziale und Stratum basale, da diese aufgrund des histomorphologischen Aufbaus eindeutig und reproduzierbar identifiziert werden konnten. Die erhobenen Datensätze wurden mittels TCA (True Component Analysis) und PCA (Principal Component Analysis) ausgewertet. Eine Analyse der Expression der untersuchten molekularen Komponenten erfolgte intensitätsabhängig über die MGVs (mean grey values) der Spektren.

Raman-Mikrospektroskopie ermöglichte es, die häufigsten molekularen Komponenten insbesondere DNA und Lipide sowohl in nativem als auch in plasmabehandeltem Gewebe zu identifizieren. Darüber hinaus konnten die komponentenassoziierten morphologischen Unterschiede zwischen superfizialen und basalen Zellschichten dargestellt werden. Per PCA konnte in einzelnen Komponenten ein statistisch signifikanter Behandlungseffekt bis in die Basalzellschicht nachgewiesen werden, der sich nach fünfminütiger Plasmaapplikation für beide verwendeten Geräte einstellte und sich nach 24-stündiger Inkubation zum Teil verstärkte. Bezogen auf die durchschnittliche Dicke der behandelten Epithelien wurde eine Gewebepenetrationstiefe von mindestens 270 µm für den kINPen® und 460 µm für das APCIII ermittelt. Unmittelbar nach zweiminütiger Behandlungsdauer konnte speziell für das

APCIII kein Score-Unterschied zur Kontrolle in der Basalschicht nachgewiesen werden. Dieser stellte sich jedoch nach 24-stündiger Inkubation der behandelten Proben ein. Im direkten Vergleich einer fünfminütigen Probenbehandlung zeigte sich, dass sich gerätespezifische Zellreaktionen im Gewebe ergeben (Abbildung 24).

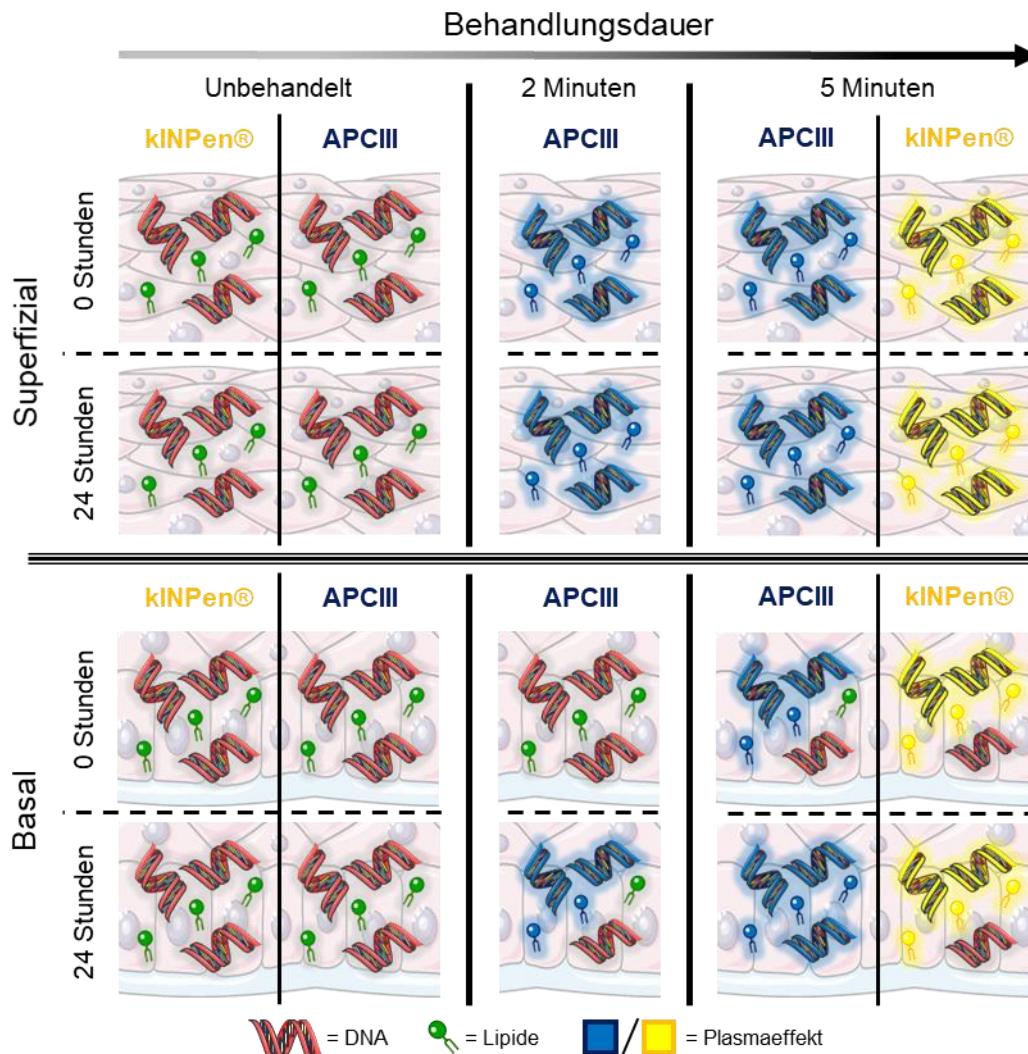


Abbildung 24: Zusammenfassung der gerätespezifischen Reichweite und Effektivität. Superficial bewirkt eine Plasmabehandlung beider Geräte einen eindeutigen Effekt, sowohl auf DNA als auch auf Lipide. Basal wird nach zweiminütiger Behandlung mit APCIII erst nach 24-stündiger Inkubation ein molekularer Effekt sichtbar. Beim kINPen® wurde basal ein größerer Effekt bezüglich Lipide festgestellt. Nach fünfminütiger Gewebebehandlung stellt sich sowohl für den kINPen®, als auch für das APCIII ein signifikanter molekularer Effekt in der Basalschicht ein. Schematische und relativierte Darstellung der gefundenen Plasmaeffekte (modifiziert nach Stratified squamous epithelium (CC BY 3.0, 2019) und (Wenzel et al., 2019)).

In dieser Studie konnte erstmals die Mindesteindringtiefe epithelialen Zervixgewebes für zwei unterschiedliche Plasmaquellen kontaktlos und markerunabhängig bestimmt werden. Ähnliche Versuche zur Bestimmung der Penetration fußten bisher auf vorselektierten Endpunkten wie Immunfluoreszenzfärbung, pH- oder RONS-Bestimmung. Erstmals wurde das Potential einer nicht-thermisch angewendeten elektrochirurgischen Plasmaquelle (APCIII) für die Behandlung von soliden Geweben gezeigt. Im Besonderen konnten die Parameter Behandlungsdauer, Einwirkzeit und alternierende molekulare Wirkmechanismen charakterisiert werden. Diese sind für APPJs (KINPen) in mehreren Studien untersucht worden und decken sich in weiten Teilen mit dieser Untersuchung.

Raman-Mikrospektroskopie wurde als eine geeignete Methode etabliert, die ein kontaktloses und markerunabhängiges Monitoring von plasmabehandeltem Gewebe erlaubt. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass auch Basalzellen, die den Ursprung für die Entstehung von zervikalen Neoplasien und Zervixkarzinomen darstellen, durch Plasmabehandlung molekular beeinflusst werden. Diese Erkenntnis ist wegweisend für weiterführende klinische Studien.

Literaturverzeichnis

- Adachi, T. *et al.* (2015) 'Plasma-activated medium induces A549 cell injury via a spiral apoptotic cascade involving the mitochondrial–nuclear network', *Free Radical Biology and Medicine*. Pergamon, 79, pp. 28–44. doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2014.11.014.
- Agarwal, R., Tandon, P. and Gupta, V. D. (2006) 'Phonon dispersion in poly(dimethylsilane)', *Journal of Organometallic Chemistry*. Elsevier, 691(13), pp. 2902–2908. doi: 10.1016/j.jorganchem.2006.02.032.
- Ahn, H. J. *et al.* (2011) 'Atmospheric-Pressure Plasma Jet Induces Apoptosis Involving Mitochondria via Generation of Free Radicals', *PLoS ONE*. Edited by B. Zhivotovsky. Public Library of Science, 6(11), p. e28154. doi: 10.1371/journal.pone.0028154.
- Aljakouch, K. *et al.* (2019) 'Fast and Noninvasive Diagnosis of Cervical Cancer by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering', *Analytical Chemistry*. American Chemical Society, 91(21), pp. 13900–13906. doi: 10.1021/acs.analchem.9b03395.
- Andrus, P. G. L. and Strickland, R. D. (1998) 'Cancer grading by Fourier transform infrared spectroscopy', *Biospectroscopy*. John Wiley & Sons, Ltd, 4(1), pp. 37–46. doi: 10.1002/(SICI)1520-6343(1998)4:1<37::AID-BSPY4>3.0.CO;2-P.
- Arends, M. J., Buckley, C. H. and Wells, M. (1998) 'Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia.', *Journal of clinical pathology*. BMJ Publishing Group, 51(2), pp. 96–103. doi: 10.1136/jcp.51.2.96.
- Arjunan, K., Sharma, V. and Ptasinska, S. (2015) 'Effects of Atmospheric Pressure Plasmas on Isolated and Cellular DNA—A Review', *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 16(2), pp. 2971–3016. doi: 10.3390/ijms16022971.
- Arndt, S. *et al.* (2013) 'Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells', *Experimental Dermatology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 22(4), pp. 284–289. doi: 10.1111/exd.12127.
- Arndt, S. *et al.* (2018) 'Cold atmospheric plasma (CAP) activates angiogenesis-related molecules in skin keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells and improves wound angiogenesis in an autocrine and paracrine mode', *Journal of Dermatological Science*. Elsevier, 89(2), pp. 181–190. doi: 10.1016/J.JDERMSCI.2017.11.008.
- Asher, S. A. and Johnson, C. R. (1984) 'Raman spectroscopy of a coal liquid shows that fluorescence interference is minimized with ultraviolet excitation', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 225(4659), pp. 311–313. doi: 10.1126/science.6740313.
- Baldauf, J. J. *et al.* (1996) 'Risk of cervical stenosis after large loop excision or laser conization', *Obstetrics and Gynecology*. No longer published by Elsevier,

88(6), pp. 933–938. doi: 10.1016/S0029-7844(96)00331-6.

Billinghurst, B. E., Oladepo, S. A. and Loppnow, G. R. (2009) 'pH-Dependent UV Resonance Raman Spectra of Cytosine and Uracil', *The Journal of Physical Chemistry B*. American Chemical Society, 113(20), pp. 7392–7397. doi: 10.1021/jp811327w.

Bourdens, M. *et al.* (2019) 'Short exposure to cold atmospheric plasma induces senescence in human skin fibroblasts and adipose mesenchymal stromal cells', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 9(1), p. 8671. doi: 10.1038/s41598-019-45191-2.

Brauchle, E. *et al.* (2015) 'Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 4(1), p. 4698. doi: 10.1038/srep04698.

Brauchle, E. *et al.* (2016) 'Non-invasive Chamber-Specific Identification of Cardiomyocytes in Differentiating Pluripotent Stem Cells', *Stem Cell Reports*. Cell Press, 6(2), pp. 188–199. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.12.007.

Brauchle, E. and Schenke-Layland, K. (2013) 'Raman spectroscopy in biomedicine - non-invasive in vitro analysis of cells and extracellular matrix components in tissues', *Biotechnology Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 8(3), pp. 288–297. doi: 10.1002/biot.201200163.

Bray, F. *et al.* (2018) 'Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. American Cancer Society, 68(6), pp. 394–424. doi: 10.3322/caac.21492.

Brucker, S. Y. *et al.* (2014) 'Patient-reported quality-of-life and sexual-function outcomes after laparoscopic supracervical hysterectomy (LSH) versus total laparoscopic hysterectomy (TLH): a prospective, questionnaire-based follow-up study in 915 patients', *Archives of Gynecology and Obstetrics*. Springer Berlin Heidelberg, 290(6), pp. 1141–1149. doi: 10.1007/s00404-014-3318-1.

Bzhalava, D. *et al.* (2013) 'A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types', *Virology*. Academic Press, 445(1–2), pp. 224–231. doi: 10.1016/j.virol.2013.07.015.

Camp Jr, C. H. *et al.* (2014) 'High-speed coherent Raman fingerprint imaging of biological tissues', *Nature Photonics*. Nature Publishing Group, 8(8), pp. 627–634. doi: 10.1038/nphoton.2014.145.

CC BY 3.0 (2019) *Creative Common licence Attribution 3.0 Unported*. Available at: <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.de> (Accessed: 13 December 2019).

Chowdary, M. V. P. *et al.* (2009) 'Biochemical correlation of Raman spectra of normal, benign and malignant breast tissues: A spectral deconvolution study', *Biopolymers*. John Wiley & Sons, Ltd, 91(7), pp. 539–546. doi: 10.1002/bip.21171.

- Daum, R. *et al.* (2019) 'Non-invasive detection of DNA methylation states in carcinoma and pluripotent stem cells using Raman microspectroscopy and imaging', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 9(1), p. 7014. doi: 10.1038/s41598-019-43520-z.
- Deng, H. *et al.* (1999) 'Dependence of the Raman signature of genomic DNA on nucleotide base sequence', *Biopolymers*. John Wiley & Sons, Ltd, 50(6), pp. 656–666. doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(199911)50:6<656::AID-BIP10>3.0.CO;2-9.
- Dezest, M. *et al.* (2017) 'Mechanistic insights into the impact of Cold Atmospheric Pressure Plasma on human epithelial cell lines', *Scientific Reports*, 7. doi: 10.1038/srep41163.
- Dobrynin, D. *et al.* (2012) 'Deep Penetration into Tissues of Reactive Oxygen Species Generated in Floating-Electrode Dielectric Barrier Discharge (FE-DBD): An In Vitro Agarose Gel Model Mimicking an Open Wound', *Plasma Medicine*. Begel House Inc., 2(1–3), pp. 71–83. doi: 10.1615/PlasmaMed.2013006218.
- Duan, J., Lu, X. and He, G. (2017) 'On the penetration depth of reactive oxygen and nitrogen species generated by a plasma jet through real biological tissue', *Physics of Plasmas*. AIP Publishing LLC, 24(7), p. 073506. doi: 10.1063/1.4990554.
- Falamas, A. *et al.* (2013) 'Monitoring the RNA distribution in human embryonic stem cells using Raman micro-spectroscopy and fluorescence imaging', in *AIP Conference Proceedings*. American Institute of Physics, pp. 43–47. doi: 10.1063/1.4833693.
- Farin, G. and Grund, K. E. (1994) 'Technology of argon plasma coagulation with particular regard to endoscopic applications.', *Endoscopic surgery and allied technologies*, 2(1), pp. 71–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8081921> (Accessed: 23 November 2019).
- Farquharson, S. *et al.* (2005) 'Analysis of 5-fluorouracil in saliva using surface-enhanced Raman spectroscopy', *Journal of Raman Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Ltd, 36(3), pp. 208–212. doi: 10.1002/jrs.1277.
- Feil, L. *et al.* (2019) 'Inhibition of cervical cancer cell growth by non-thermal atmospheric plasma application utilizing a thermal argon plasma source', *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. Elsevier, 234, p. e131. doi: 10.1016/j.ejogrb.2018.08.446.
- Feil, L. *et al.* (2020) 'Cancer-Selective Treatment of Cancerous and Non-Cancerous Human Cervical Cell Models by a Non-Thermally Operated Electrosurgical Argon Plasma Device', *Cancers*. MDPI AG, 12(4), p. 1037. doi: 10.3390/cancers12041037.
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, B. F. (2018) *Global Cancer Observatory: Cancer Today*., Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available at: <https://gco.iarc.fr/today> (Accessed: 22 November 2019).

- Frank-Kamenetskii, D. A. (1964) *Plasma: The Fourth State of Matter*. Moskau: Progress. Available at: https://books.google.de/books?hl=de&lr=&id=vFRdDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA13&dq=fourth+physical+plasma&ots=UcQAI69LI6&sig=rjegvQcTMme0HweoXG_wi_yqHm8#v=onepage&q=fourth+physical+plasma&f=false (Accessed: 29 November 2019).
- Frederiksen, M. E. *et al.* (2015) 'Psychological effects of diagnosis and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: A systematic review', *Sexually Transmitted Infections*. BMJ Publishing Group, pp. 248–256. doi: 10.1136/sextrans-2014-051754.
- Furuta, R., Kurake, N., Ishikawa, K., *et al.* (2017) 'Intracellular-molecular changes in plasma-irradiated budding yeast cells studied using multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy', *Physical Chemistry Chemical Physics*. The Royal Society of Chemistry, 19(21), pp. 13438–13442. doi: 10.1039/C7CP00489C.
- Furuta, R., Kurake, N., Takeda, K., *et al.* (2017) 'Lipid droplets exhaustion with caspases activation in HeLa cells cultured in plasma-activated medium observed by multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy', *Biointerphases*. American Vacuum Society , 12(3), p. 031006. doi: 10.1116/1.4997170.
- Gardiner, D. J. (1989) 'Introduction to Raman Scattering', in *Practical Raman Spectroscopy*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–12. doi: 10.1007/978-3-642-74040-4_1.
- Gniadecka, M. *et al.* (2004) 'Melanoma Diagnosis by Raman Spectroscopy and Neural Networks: Structure Alterations in Proteins and Lipids in Intact Cancer Tissue', *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier, 122(2), pp. 443–449. doi: 10.1046/J.0022-202X.2004.22208.X.
- Gross, J. H. (2013) *Massenspektrometrie : ein Lehrbuch*. Springer Spektrum.
- Hellerer, T. (2004) *CARS-Mikroskopie: Entwicklung und Anwendung*. Ludwig-Maximilians-Universität München. Available at: https://edoc.ub.uni-muenchen.de/1957/1/Hellerer_Thomas.pdf (Accessed: 5 December 2019).
- Henes, M. *et al.* (2020) 'Non-invasive-physical-plasma treatment of low- and high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a non-invasive and anaesthesia-independent treatment procedure evaluated in a prospective, monocentric clinical trial', in *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. © 2020. Thieme. All rights reserved., p. P370. doi: 10.1055/s-0040-1718198.
- Henk, H. J. *et al.* (2010) 'Incidence and Costs of Cervical Intraepithelial Neoplasia in a US Commercially Insured Population', *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 14(1), pp. 29–36. doi: 10.1097/LGT.0b013e3181ac05e9.
- Hillemanns, P. *et al.* (2019) 'Prevention of Cervical Cancer', *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. Georg Thieme Verlag KG, 79(02), pp. 148–159. doi: 10.1055/a-0818-5440.

Huang, N. *et al.* (2011) 'Full range characterization of the Raman spectra of organs in a murine model', *Optics Express*. The Optical Society, 19(23), p. 22892. doi: 10.1364/oe.19.022892.

Insinga, R. P., Glass, A. G. and Rush, B. B. (2004) 'Diagnoses and outcomes in cervical cancer screening: A population-based study', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Mosby, 191(1), pp. 105–113. doi: 10.1016/j.ajog.2004.01.043.

International Agency for Research on Cancer (2012) 'A review of human carcinogens: Biological agents', *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 100, pp. 255–313.

Isbary, G. *et al.* (2012) 'Successful and safe use of 2 min cold atmospheric argon plasma in chronic wounds: results of a randomized controlled trial', *British Journal of Dermatology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 167(2), pp. 404–410. doi: 10.1111/j.1365-2133.2012.10923.x.

Isbary, G. *et al.* (2013) 'Cold atmospheric argon plasma treatment may accelerate wound healing in chronic wounds: Results of an open retrospective randomized controlled study in vivo', *Clinical Plasma Medicine*. Urban & Fischer, 1(2), pp. 25–30. doi: 10.1016/J.CPME.2013.06.001.

Isbary, Georg *et al.* (2013) 'Cold atmospheric plasma devices for medical issues', *Expert Review of Medical Devices*. Taylor & Francis, 10(3), pp. 367–377. doi: 10.1586/erd.13.4.

Jess, P. R. T. *et al.* (2007) 'Early detection of cervical neoplasia by Raman spectroscopy', *International Journal of Cancer*. John Wiley & Sons, Ltd, 121(12), pp. 2723–2728. doi: 10.1002/ijc.23046.

Kähler, G. F. *et al.* (2009) 'Investigation of the thermal tissue effects of the argon plasma coagulation modes "pulsed" and "precise" on the porcine esophagus, ex vivo and in vivo', *Gastrointestinal Endoscopy*, 70(2), pp. 362–368. doi: 10.1016/j.gie.2008.11.050.

Kalghatgi, S. *et al.* (2011) 'Effects of Non-Thermal Plasma on Mammalian Cells', *PLoS ONE*. Edited by S. Koutsopoulos. Public Library of Science, 6(1), p. e16270. doi: 10.1371/journal.pone.0016270.

Kangas, M., Henry, J. L. and Bryant, R. A. (2002) 'Posttraumatic stress disorder following cancer: A conceptual and empirical review', *Clinical Psychology Review*. Pergamon, 22(4), pp. 499–524. doi: 10.1016/S0272-7358(01)00118-0.

Kartaschew, K. *et al.* (2015) 'Unraveling the interactions between cold atmospheric plasma and skin-components with vibrational microspectroscopy', *Biointerphases*. American Vacuum Society, 10(2), p. 029516. doi: 10.1116/1.4919610.

Katainen, E. *et al.* (2007) 'Quantification of the Amphetamine Content in Seized Street Samples by Raman Spectroscopy', *Journal of Forensic Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 52(1), pp. 88–92. doi: 10.1111/j.1556-4029.2006.00306.x.

- Kawasaki, T. *et al.* (2016) 'Two-dimensional concentration distribution of reactive oxygen species transported through a tissue phantom by atmospheric-pressure plasma-jet irradiation', *Applied Physics Express*, 9(7), p. 076202. doi: 10.7567/APEX.9.076202.
- Keidar, M. *et al.* (2013) 'Cold atmospheric plasma in cancer therapy', *Physics of Plasmas*. American Institute of Physics, 20(5), p. 057101. doi: 10.1063/1.4801516.
- Kim, S. J. and Chung, T. H. (2016) 'Cold atmospheric plasma jet-generated RONS and their selective effects on normal and carcinoma cells', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 20332. doi: 10.1038/srep20332.
- Kister, G. *et al.* (2000) 'Structural characterization and hydrolytic degradation of solid copolymers of D, L-lactide-co- ϵ -caprolactone by Raman spectroscopy', *Polymer*. Elsevier, 41(3), pp. 925–932. doi: 10.1016/S0032-3861(99)00223-2.
- Klein, K. *et al.* (2012) 'Label-free live-cell imaging with confocal Raman microscopy', *Biophysical Journal*. Cell Press, 102(2), pp. 360–368. doi: 10.1016/j.bpj.2011.12.027.
- Kölle, A. *et al.* (2019) 'Ex vivo characterization of thermal argon plasma sources for potential cold atmospheric plasma application in medicine', *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. Elsevier, 234, pp. e83–e84. doi: 10.1016/j.ejogrb.2018.08.339.
- Körtinger, J. *et al.* (2013) 'Restoration of Sensitivity in Chemo — Resistant Glioma Cells by Cold Atmospheric Plasma', *PLoS ONE*. Edited by M. Lim. Public Library of Science, 8(5), p. e64498. doi: 10.1371/journal.pone.0064498.
- Krafft, C. *et al.* (2003) 'Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy', in *Vibrational Spectroscopy*. doi: 10.1016/S0924-2031(03)00049-3.
- Krafft, C. *et al.* (2005) 'Near infrared Raman spectra of human brain lipids', *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Elsevier, 61(7), pp. 1529–1535. doi: 10.1016/J.SAA.2004.11.017.
- Krishna, C. M. *et al.* (2005) 'Evaluation of the suitability of ex vivo handled ovarian tissues for optical diagnosis by Raman microspectroscopy', *Biopolymers*. John Wiley & Sons, Ltd, 79(5), pp. 269–276. doi: 10.1002/bip.20346.
- Lackmann, J.-W. *et al.* (2013) 'Photons and particles emitted from cold atmospheric-pressure plasma inactivate bacteria and biomolecules independently and synergistically', *Journal of The Royal Society Interface*. The Royal Society, 10(89), p. 20130591. doi: 10.1098/rsif.2013.0591.
- Lackmann, J.-W. *et al.* (2019) 'Nitrosylation vs. oxidation – How to modulate cold physical plasmas for biological applications', *PLOS ONE*. Edited by M. Yousfi. Public Library of Science, 14(5), p. e0216606. doi: 10.1371/journal.pone.0216606.

Langmuir, I. (1928) *Oscillations in Ionized Gases*. Band 14. Proceedings of the National Academy of Science.

Larsson, K. (1973) 'Conformation-dependent features in the raman spectra of simple lipids', *Chemistry and Physics of Lipids*. Elsevier, 10(2), pp. 165–176. doi: 10.1016/0009-3084(73)90013-3.

Li, X. *et al.* (2011) 'Surface-enhanced Raman spectroscopy differences of saliva between lung cancer patients and normal people', in *Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging II*. Washington, D.C.: OSA, p. 808722. doi: 10.1364/ECBO.2011.808722.

Liu, Z. *et al.* (2008) 'Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 105(5), pp. 1410–1415. doi: 10.1073/pnas.0707654105.

Lyng, F. M. *et al.* (2015) 'Raman spectroscopy for screening and diagnosis of cervical cancer', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(27). doi: 10.1007/s00216-015-8946-1.

Maissi, E. *et al.* (2004) 'Psychological impact of human papillomavirus testing in women with borderline or mildly dyskaryotic cervical smear test results: Cross sectional questionnaire study', *British Medical Journal*. British Medical Journal Publishing Group, 328(7451), pp. 1293–1296. doi: 10.1136/bmj.328.7451.1293.

Malini, R. *et al.* (2006) 'Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: A Raman spectroscopy study', *Biopolymers*. John Wiley & Sons, Ltd, 81(3), pp. 179–193. doi: 10.1002/bip.20398.

Marzi, J. *et al.* (2019) 'Non-invasive functional molecular phenotyping of human smooth muscle cells utilized in cardiovascular tissue engineering', *Acta Biomaterialia*. Elsevier, 89, pp. 193–205. doi: 10.1016/J.ACTBIO.2019.03.026.

Matthes, R. *et al.* (2013) 'Antimicrobial Efficacy of an Atmospheric Pressure Plasma Jet Against Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*', *Plasma Processes and Polymers*. John Wiley & Sons, Ltd, 10(2), pp. 161–166. doi: 10.1002/ppap.201100133.

McCaffery, K. *et al.* (2004) 'Testing positive for human papillomavirus in routine cervical screening: examination of psychosocial impact', *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. John Wiley & Sons, Ltd, 111(12), pp. 1437–1443. doi: 10.1111/j.1471-0528.2004.00279.x.

Metelmann, H.-R., von Woedtke, T. and Weltmann, K.-D. (2016) *Plasmamedizin: Kaltplasma in der medizinischen Anwendung*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Movasaghi, Z., Rehman, S. and Rehman, I. U. (2007) 'Raman Spectroscopy of Biological Tissues', *Applied Spectroscopy Reviews*. Taylor & Francis Group, 42(5), pp. 493–541. doi: 10.1080/05704920701551530.

- Muñoz, N. *et al.* (2003) 'Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer', *New England Journal of Medicine*, 348(6), pp. 518–527. doi: 10.1056/NEJMoa021641.
- Muntean, C. M. *et al.* (2011) 'Surface-enhanced Raman spectroscopy of DNA from leaves of in vitro grown apple plants', *Journal of Raman Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Ltd, 42(4), pp. 844–850. doi: 10.1002/jrs.2780.
- Nationales Zentrum für Plasmamedizin (2014) *Risikopotenzial und zu Anwendungsperspektiven von kaltem Atmosphärendruckplasma in der Medizin*, *Plasmakurier*. Available at: <http://www.zwp-online.info/archiv/pub/sim/pk/2014/pk0114/epaper/ausgabe.pdf> (Accessed: 30 November 2019).
- Neugebauer, U. *et al.* (2010) 'Identification and differentiation of single cells from peripheral blood by Raman spectroscopic imaging', *Journal of Biophotonics*. John Wiley & Sons, Ltd, 3(8–9), pp. 579–587. doi: 10.1002/jbio.201000020.
- Notingher, I. *et al.* (2004) 'Discrimination between ricin and sulphur mustard toxicity *in vitro* using Raman spectroscopy', *Journal of The Royal Society Interface*, 1(1), pp. 79–90. doi: 10.1098/rsif.2004.0008.
- Ong, Y. H., Lim, M. and Liu, Q. (2012) 'Comparison of principal component analysis and biochemical component analysis in Raman spectroscopy for the discrimination of apoptosis and necrosis in K562 leukemia cells', *Optics Express*. Optical Society of America, 20(20), p. 22158. doi: 10.1364/OE.20.022158.
- Ostör, A. G. (1993) 'Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review.', *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, 12(2), pp. 186–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8463044> (Accessed: 30 April 2019).
- Park, D. *et al.* (2013) 'Plasma Bullets Propagation Inside of Agarose Tissue Model', *IEEE Transactions on Plasma Science*, 41(7), pp. 1725–1730. doi: 10.1109/TPS.2013.2265373.
- Partecke, L. I. *et al.* (2012) 'Tissue Tolerable Plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo*', *BMC Cancer*. BioMed Central, 12(1), p. 473. doi: 10.1186/1471-2407-12-473.
- Peto, J. *et al.* (2004) 'Cervical HPV infection and neoplasia in a large population-based prospective study: the Manchester cohort', *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group, 91(5), pp. 942–953. doi: 10.1038/sj.bjc.6602049.
- Prats Mateu, B. *et al.* (2017) 'Label-free live cell imaging by Confocal Raman Microscopy identifies CHO host and producer cell lines', *Biotechnology Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 12(1), p. 1600037. doi: 10.1002/biot.201600037.
- Ptasińska, S. *et al.* (2010) 'DNA strand scission induced by a non-thermal atmospheric pressure plasma jet', *Physical Chemistry Chemical Physics*. Royal

- Society of Chemistry, 12(28), pp. 7779–7781. doi: 10.1039/c001188f.
- Pudlas, M. *et al.* (2011) 'Non-contact discrimination of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and fibroblasts using Raman spectroscopy', *Medical Laser Application*. Urban & Fischer, 26(3), pp. 119–125. doi: 10.1016/J.MLA.2011.05.004.
- Rao, W. W. *et al.* (2019) 'Psychological distress in cancer patients in a large Chinese cross-sectional study', *Journal of Affective Disorders*. Elsevier B.V., 245, pp. 950–956. doi: 10.1016/j.jad.2018.11.089.
- Reiazi, R. *et al.* (2017) 'Application of Cold Atmospheric Plasma (CAP) in Cancer Therapy: A Review', *International Journal of Cancer Management*. Kowsar, 10(3). doi: 10.5812/ijcp.8728.
- Ribeiro Cubal, A. F. *et al.* (2012) 'Fertility-Sparing Surgery for Early-Stage Cervical Cancer', *International Journal of Surgical Oncology*. Hindawi, 2012, pp. 1–11. doi: 10.1155/2012/936534.
- Rinia, H. A. *et al.* (2008) 'Quantitative label-free imaging of lipid composition and packing of individual cellular lipid droplets using multiplex CARS microscopy', *Biophysical Journal*. Biophysical Society, 95(10), pp. 4908–4914. doi: 10.1529/biophysj.108.137737.
- Robert Koch Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2013) *Krebs in Deutschland 2009/2010*. Berlin. Available at: <https://edoc.rki.de/handle/176904/3244> (Accessed: 24 March 2020).
- De Rosa, N. *et al.* (2017) 'Impact of Ospemifene on Quality of Life and Sexual Function in Young Survivors of Cervical Cancer: A Prospective Study.', *BioMed research international*. Hindawi Limited, 2017, p. 7513610. doi: 10.1155/2017/7513610.
- Ruiz-Chica, A. J. *et al.* (2004) 'Characterization by Raman spectroscopy of conformational changes on guanine–cytosine and adenine–thymine oligonucleotides induced by aminoxy analogues of spermidine', *Journal of Raman Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Ltd, 35(2), pp. 93–100. doi: 10.1002/jrs.1107.
- Ruiz-Chica, J. *et al.* (2001) 'Fourier Transform Raman Study of the Structural Specificities on the Interaction between DNA and Biogenic Polyamines', *Biophysical Journal*. Cell Press, 80(1), pp. 443–454. doi: 10.1016/S0006-3495(01)76027-4.
- Ryder, A. G., O'Connor, G. M. and Glynn, T. J. (1999) 'Identifications and Quantitative Measurements of Narcotics in Solid Mixtures Using Near-IR Raman Spectroscopy and Multivariate Analysis', *Journal of Forensic Sciences*. ASTM International, 44(5), p. 12031J. doi: 10.1520/jfs12031j.
- S3-Leitlinie Prävention des Zervixkarzinoms (2017) *Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Prävention des Zervixkarzinoms Langversion 1.0*.
- S3-Leitlinie Zervixkarzinom (2014) *S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und*

Nachsorge der Patientin mit Zervixkarzinom. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e. V. (DKG) und Deutschen Krebshilfe e. V. (DKH).

Sadler, L. *et al.* (2004) 'Treatment for Cervical Intraepithelial Neoplasia and Risk of Preterm Delivery', *JAMA*. American Medical Association, 291(17), p. 2100. doi: 10.1001/jama.291.17.2100.

Scharf, C. *et al.* (2019) 'Improved Wound Healing of Airway Epithelial Cells Is Mediated by Cold Atmospheric Plasma: A Time Course-Related Proteome Analysis', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi, 2019, pp. 1–21. doi: 10.1155/2019/7071536.

Schlegel, J., Köritzer, J. and Boxhammer, V. (2013) 'Plasma in cancer treatment', *Clinical Plasma Medicine*. Urban & Fischer, 1(2), pp. 2–7. doi: 10.1016/J.CPME.2013.08.001.

Schmidt, A. *et al.* (2019) 'Cold physical plasma modulates p53 and mitogen-activated protein kinase signaling in keratinocytes', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited, 2019. doi: 10.1155/2019/7017363.

Senada Koljenović, †, ‡ *et al.* (2005) 'Detection of Meningioma in Dura Mater by Raman Spectroscopy'. American Chemical Society. doi: 10.1021/AC0512599.

Sharma, S. *et al.* (2019) 'Label-Free Mapping of the Biochemicals in Tomato Fruit by Confocal Raman Microspectroscopy', *National Academy Science Letters*. Springer India, 42(4), pp. 365–368. doi: 10.1007/s40009-018-0747-6.

Shen, Y., Hu, F. and Min, W. (2019) 'Raman Imaging of Small Biomolecules', *Annual Review of Biophysics*. Annual Reviews Inc., pp. 347–369. doi: 10.1146/annurev-biophys-052118-115500.

Shetty, G. *et al.* (2006) 'Raman spectroscopy: elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus', *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group, 94(10), pp. 1460–1464. doi: 10.1038/sj.bjc.6603102.

Shi, J. *et al.* (2018) 'A review on electroporation-based intracellular delivery', *Molecules*. MDPI AG. doi: 10.3390/molecules23113044.

Siu, A. *et al.* (2015) 'Differential Effects of Cold Atmospheric Plasma in the Treatment of Malignant Glioma', *PLOS ONE*. Edited by M. Yousfi. Public Library of Science, 10(6), p. e0126313. doi: 10.1371/journal.pone.0126313.

SM, K. and JI, K. (2006) 'Decomposition of biological macromolecules by plasma generated with helium and oxygen.', *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 44(4), pp. 466–471.

Stone, N. *et al.* (2004) 'Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers', *Faraday Discussions*. Royal Society of Chemistry, 126(0), p. 141. doi: 10.1039/b304992b.

Swain, R. J., Jell, G. and Stevens, M. M. (2008) 'Non-invasive analysis of cell cycle dynamics in single living cells with Raman micro-spectroscopy', *Journal of*

Cellular Biochemistry. John Wiley & Sons, Ltd, 104(4), pp. 1427–1438. doi: 10.1002/jcb.21720.

Szili, E. J. *et al.* (2015) 'Probing the transport of plasma-generated RONS in an agarose target as surrogate for real tissue: dependency on time, distance and material composition', *Journal of Physics D: Applied Physics*, 48(20), p. 202001. doi: 10.1088/0022-3727/48/20/202001.

Szili, E. J. *et al.* (2018) 'Tracking the Penetration of Plasma Reactive Species in Tissue Models', *Trends in Biotechnology*. Elsevier Current Trends, 36(6), pp. 594–602. doi: 10.1016/J.TIBTECH.2017.07.012.

Talari, A. C. S. *et al.* (2015) 'Raman spectroscopy of biological tissues', *Applied Spectroscopy Reviews*. Taylor and Francis Inc., pp. 46–111. doi: 10.1080/05704928.2014.923902.

Tauber, M. J. *et al.* (2003) 'Flowing liquid sample jet for resonance Raman and ultrafast optical spectroscopy', *Review of Scientific Instruments*. American Institute of Physics AIP, 74(11), pp. 4958–4960. doi: 10.1063/1.1614874.

Utsumi, F. *et al.* (2013) 'Effect of Indirect Nonequilibrium Atmospheric Pressure Plasma on Anti-Proliferative Activity against Chronic Chemo-Resistant Ovarian Cancer Cells In Vitro and In Vivo', *PLoS ONE*. Edited by M. Yousfi. Public Library of Science, 8(12), p. e81576. doi: 10.1371/journal.pone.0081576.

Volotskova, O. *et al.* (2012) 'Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 2(1), p. 636. doi: 10.1038/srep00636.

Wang, M. *et al.* (2013) 'Cold Atmospheric Plasma for Selectively Ablating Metastatic Breast Cancer Cells', *PLoS ONE*. Edited by D. Heymann. Public Library of Science, 8(9), p. e73741. doi: 10.1371/journal.pone.0073741.

Wang, S. *et al.* (2016) 'Use of Raman Spectroscopy and Phase-Contrast Microscopy To Characterize Cold Atmospheric Plasma Inactivation of Individual Bacterial Spores.', *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology, 82(19), pp. 5775–84. doi: 10.1128/AEM.01669-16.

Weiss, M. *et al.* (2015) 'Cold Atmospheric Plasma Treatment Induces Anti-Proliferative Effects in Prostate Cancer Cells by Redox and Apoptotic Signaling Pathways', *PLOS ONE*. Edited by A. Ahmad. Public Library of Science, 10(7), p. e0130350. doi: 10.1371/journal.pone.0130350.

Weiss, M., Utz, R., *et al.* (2019) 'Characterization of a non-thermally operated electrosurgical argon plasma source by electron spin resonance spectroscopy', *Plasma Processes and Polymers*. John Wiley & Sons, Ltd, 16(2), p. 1800150. doi: 10.1002/ppap.201800150.

Weiss, M., Barz, J., *et al.* (2019) 'Dose-Dependent Tissue-Level Characterization of a Medical Atmospheric Pressure Argon Plasma Jet', *ACS Applied Materials & Interfaces*. American Chemical Society, 11(22), pp. 19841–19853. doi: 10.1021/acsami.9b04803.

Wenzel *et al.* (2020) 'Trans-Mucosal Efficacy of Non-Thermal Plasma Treatment on Cervical Cancer Tissue and Human Cervix Uteri by a Next Generation Electrosurgical Argon Plasma Device', *Cancers*. MDPI AG, 12(2), p. 267. doi: 10.3390/cancers12020267.

Wenzel, T. *et al.* (2019) 'Molecular Effects and Tissue Penetration Depth of Physical Plasma in Human Mucosa Analyzed by Contact- and Marker-Independent Raman Microspectroscopy', *ACS Applied Materials & Interfaces*. American Chemical Society, p. acsami.9b13221. doi: 10.1021/acsami.9b13221.

von Woedtke, T., Metelmann, H.-R. and Weltmann, K.-D. (2014) 'Clinical Plasma Medicine: State and Perspectives of in Vivo Application of Cold Atmospheric Plasma', *Contributions to Plasma Physics*. John Wiley & Sons, Ltd, 54(2), pp. 104–117. doi: 10.1002/ctpp.201310068.

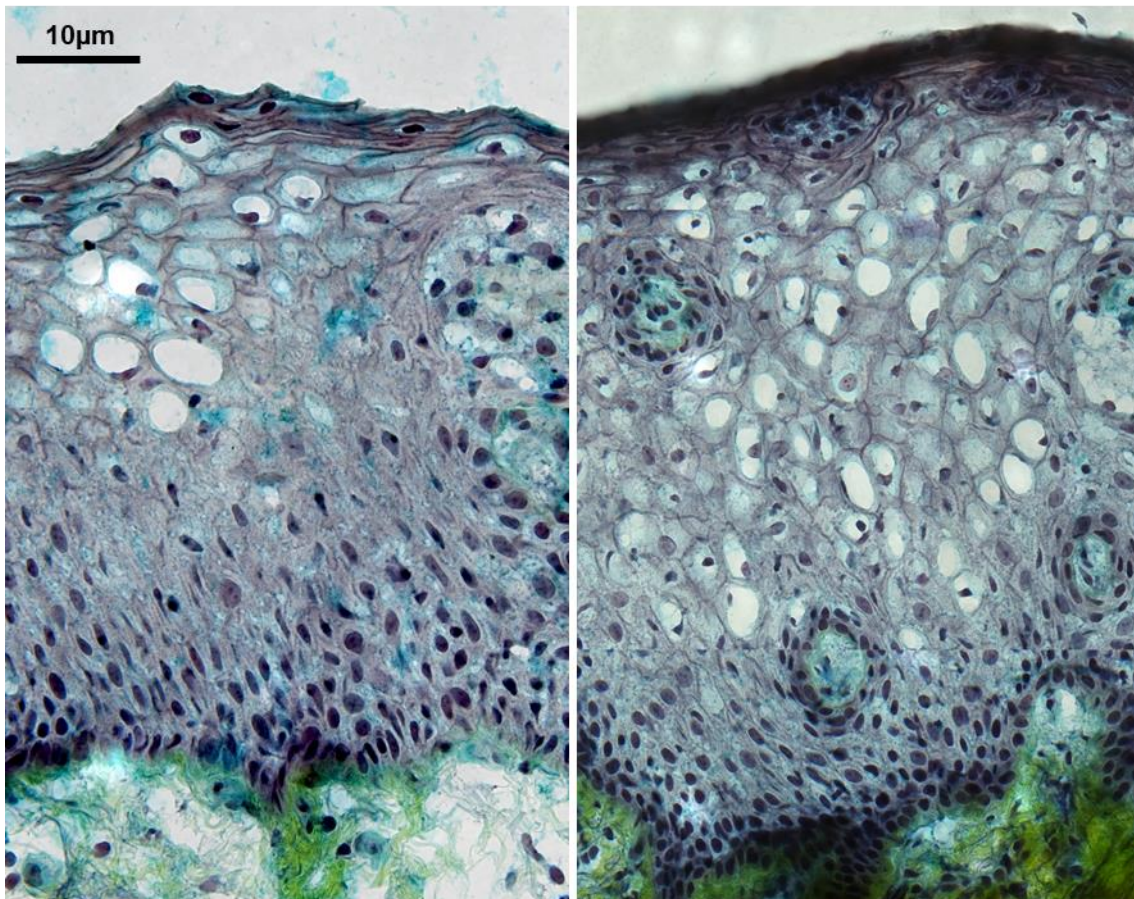
Xie, L. *et al.* (2009) 'Graphene as a substrate to suppress fluorescence in resonance raman spectroscopy', *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society, 131(29), pp. 9890–9891. doi: 10.1021/ja9037593.

Zbinden, A. *et al.* (2019) 'Non-invasive marker-independent high content analysis of a microphysiological human pancreas-on-a-chip model', *Matrix Biology*. Elsevier. doi: 10.1016/J.MATBIO.2019.06.008.

Zhang, X. *et al.* (2012) 'Label-free live-cell imaging of nucleic acids using stimulated raman scattering microscopy', *ChemPhysChem*. Wiley-VCH Verlag, 13(4), pp. 1054–1059. doi: 10.1002/cphc.201100890.

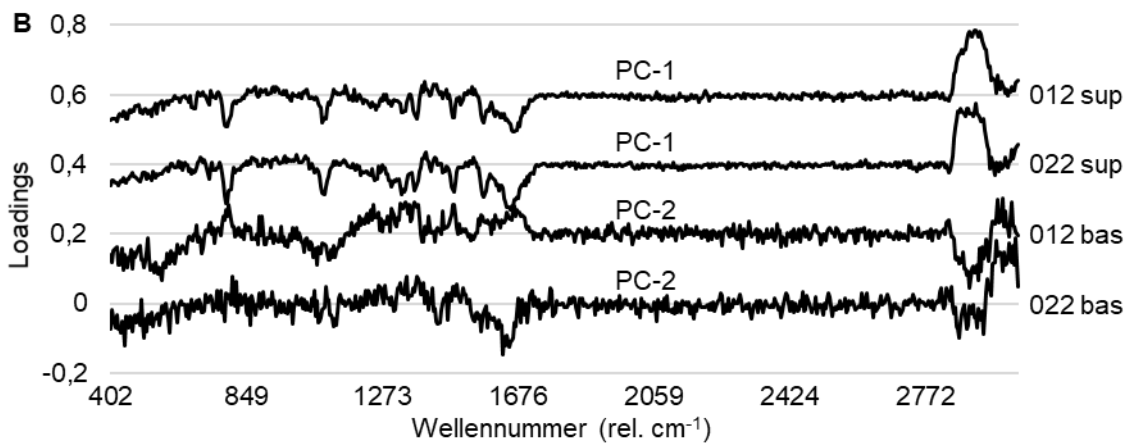
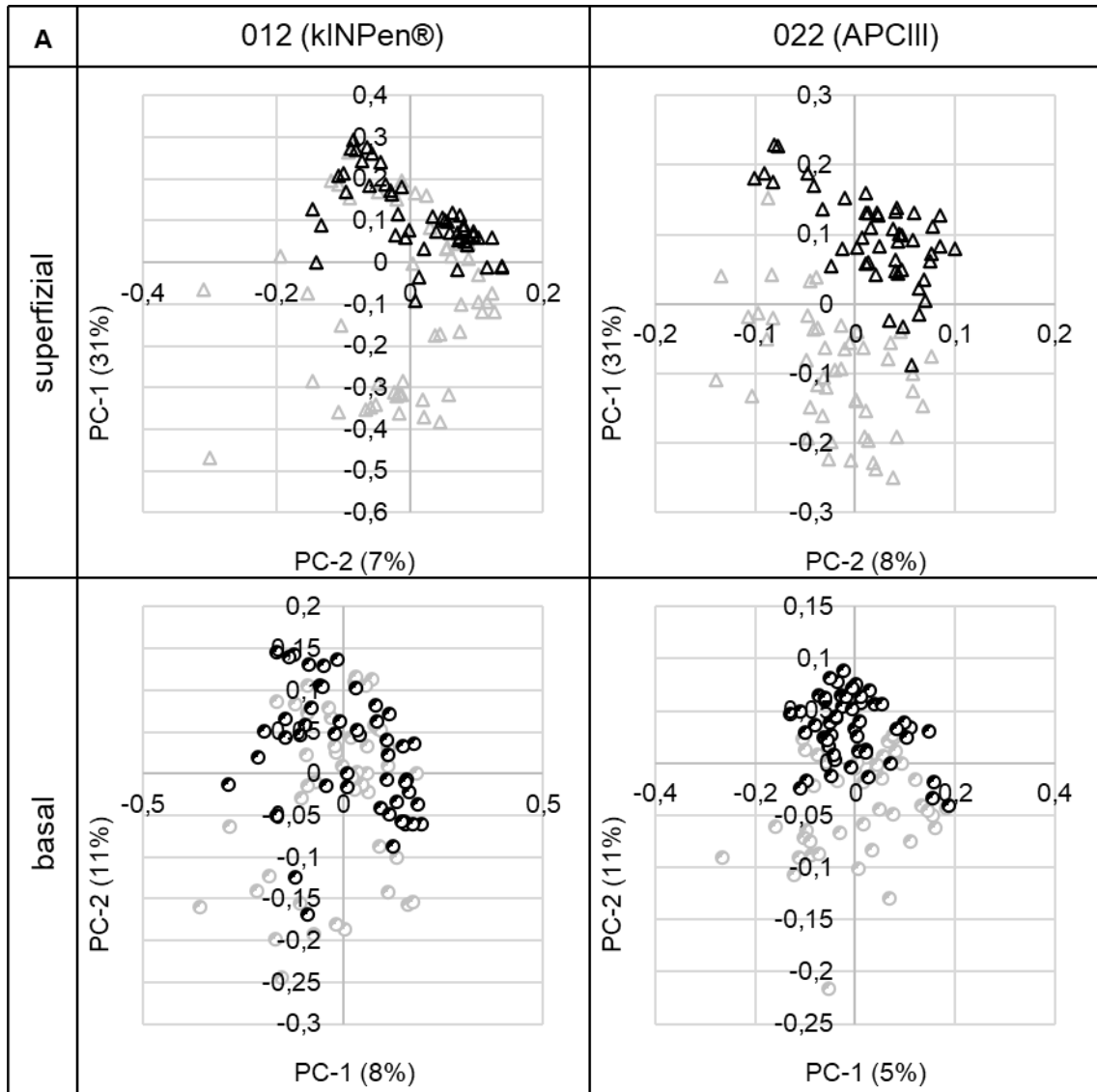
Zhao, S. *et al.* (2013) 'Atmospheric Pressure Room Temperature Plasma Jets Facilitate Oxidative and Nitrate Stress and Lead to Endoplasmic Reticulum Stress Dependent Apoptosis in HepG2 Cells', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 8(8). doi: 10.1371/journal.pone.0073665.

6 Anhang



Anhang 1: Gegenüberstellung histologischer Schnitte.

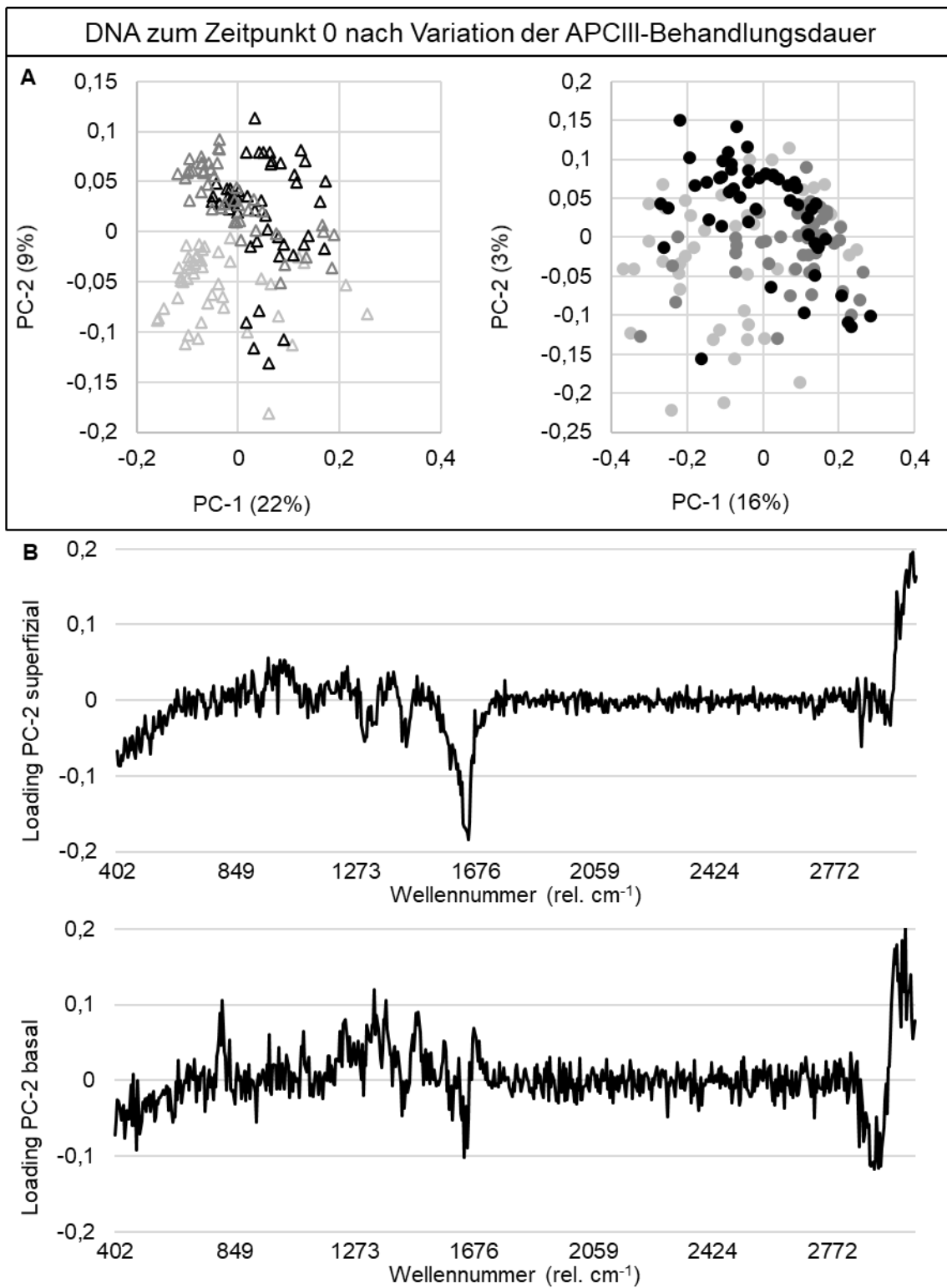
Hellfeldaufnahme der Russell-Movat-Pentachrom-gefärbten Probe 031 nach fünfminütiger APCIII-Behandlung. Die Morphologie der epithelialen Struktur ist auch nach der Behandlung durch Plasma vollständig identifizierbar. Unbehandelt (links) und behandelt (rechts). Maßstabsbalken entspricht 10 µm.



Anhang 2: PCA für die Etablierungsmessung.

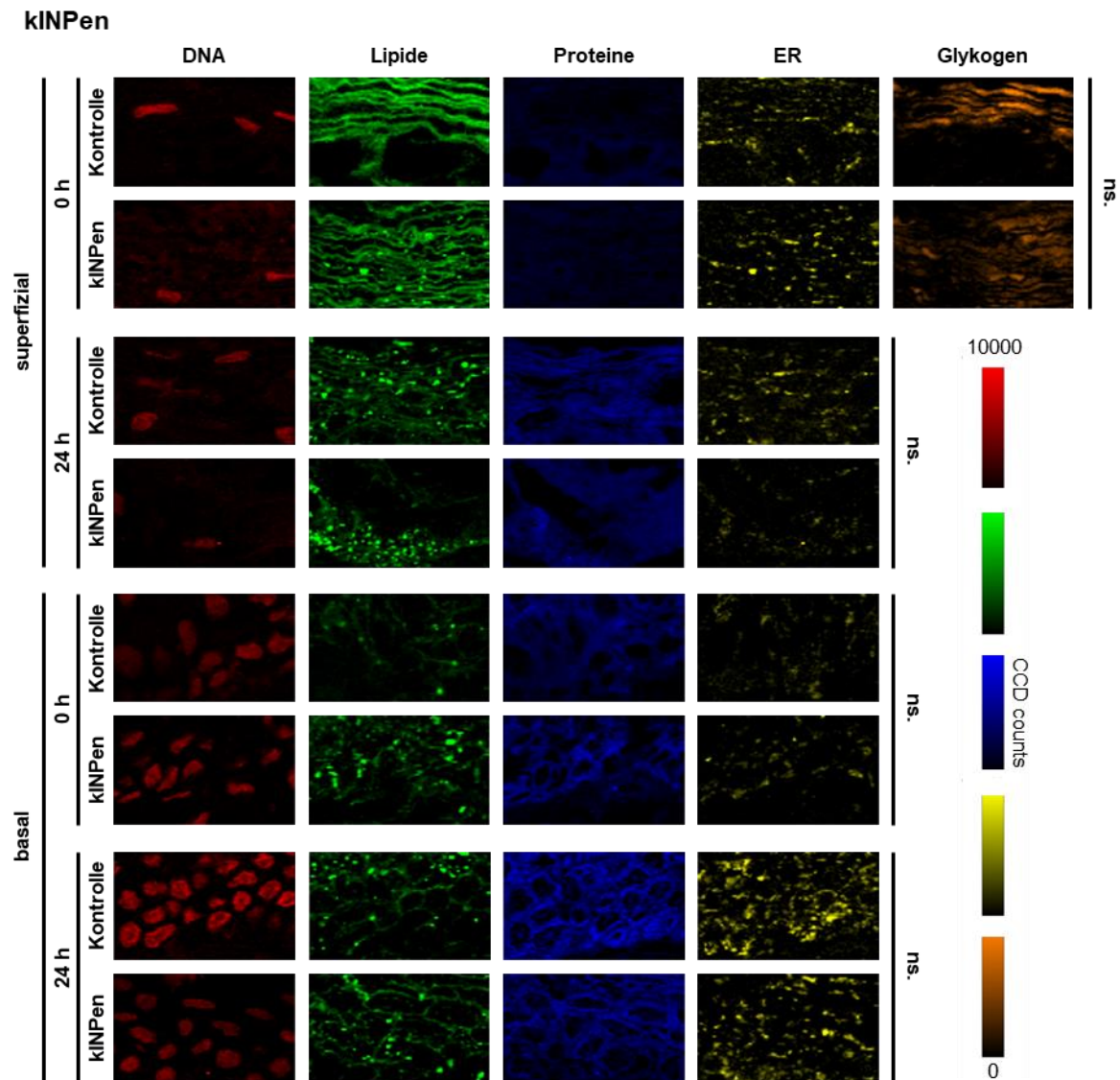
Für die Plasmageräte kINPen® und APCIII wurde die DNA je einer Probe nach fünfminütiger Plasmabehandlung zum Zeitpunkt 0 h analysiert. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte für alle Vergleiche außer 012 basal ermittelt werden. Es erfolgte der Dunn's multiple

comparisons test für max. 50 Scores pro Behandlungskondition. A: Vier Score-Plots; grau = Kontrolle, schwarz = Plasmabehandlung. B: Loadings für die angegebenen Hauptkomponenten.



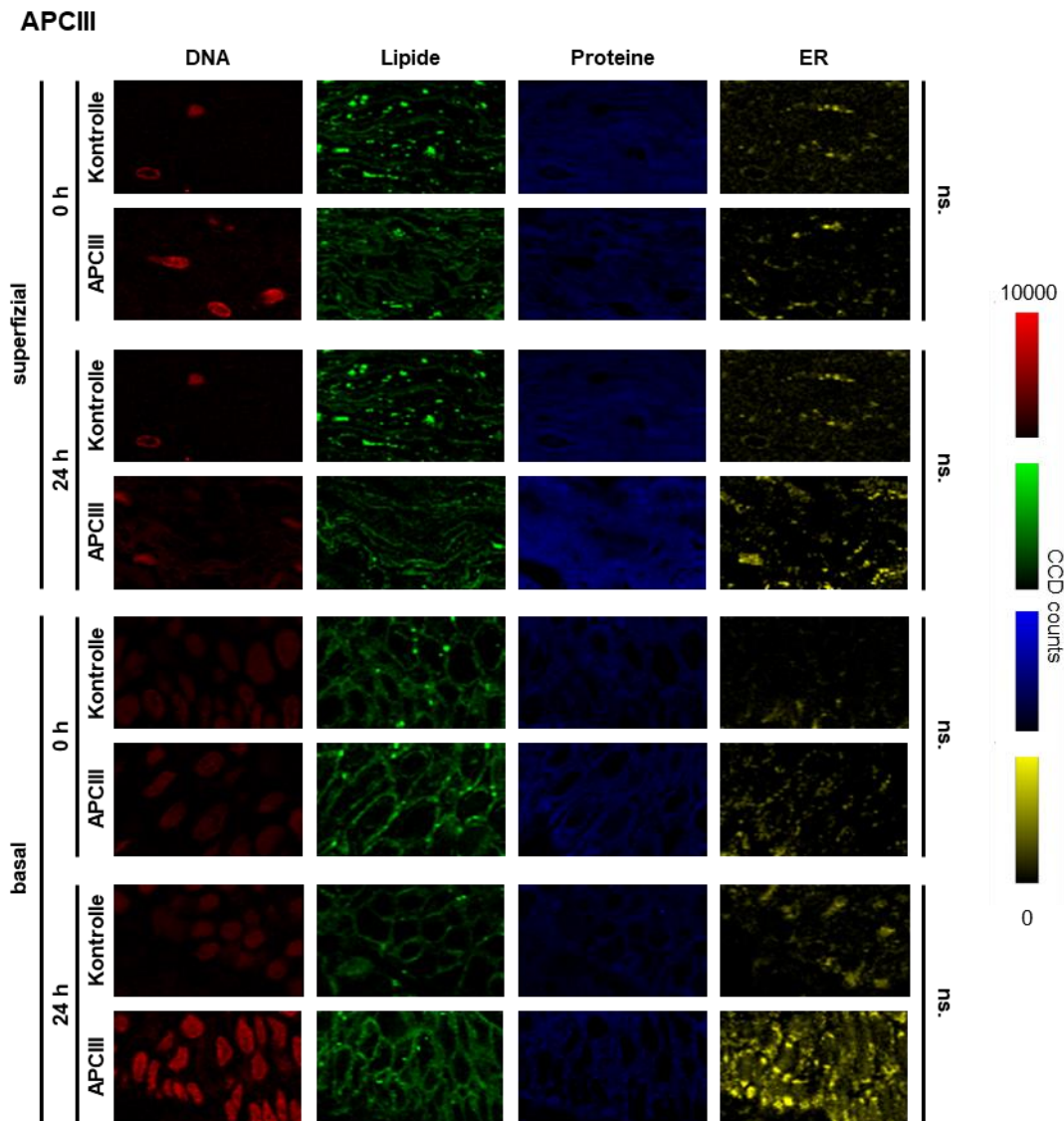
Anhang 3: Darstellung der PCA zur Auswirkung unterschiedlicher Behandlungsdauer.

A: Score-Plots der PCA von Probe 023 zum Zeitpunkt 0 h. Es ist eine Unterscheidung der Behandlungsgruppen im Score-Plot nachvollziehbar. Hellgrau: unbehandelt. Dunkelgrau: zweiminütige Behandlung. Schwarz: fünfminütige Behandlung. Links superfizial. Rechts basal. B: Loadings der zweiten PCs. Oben superfizial. Unten basal.



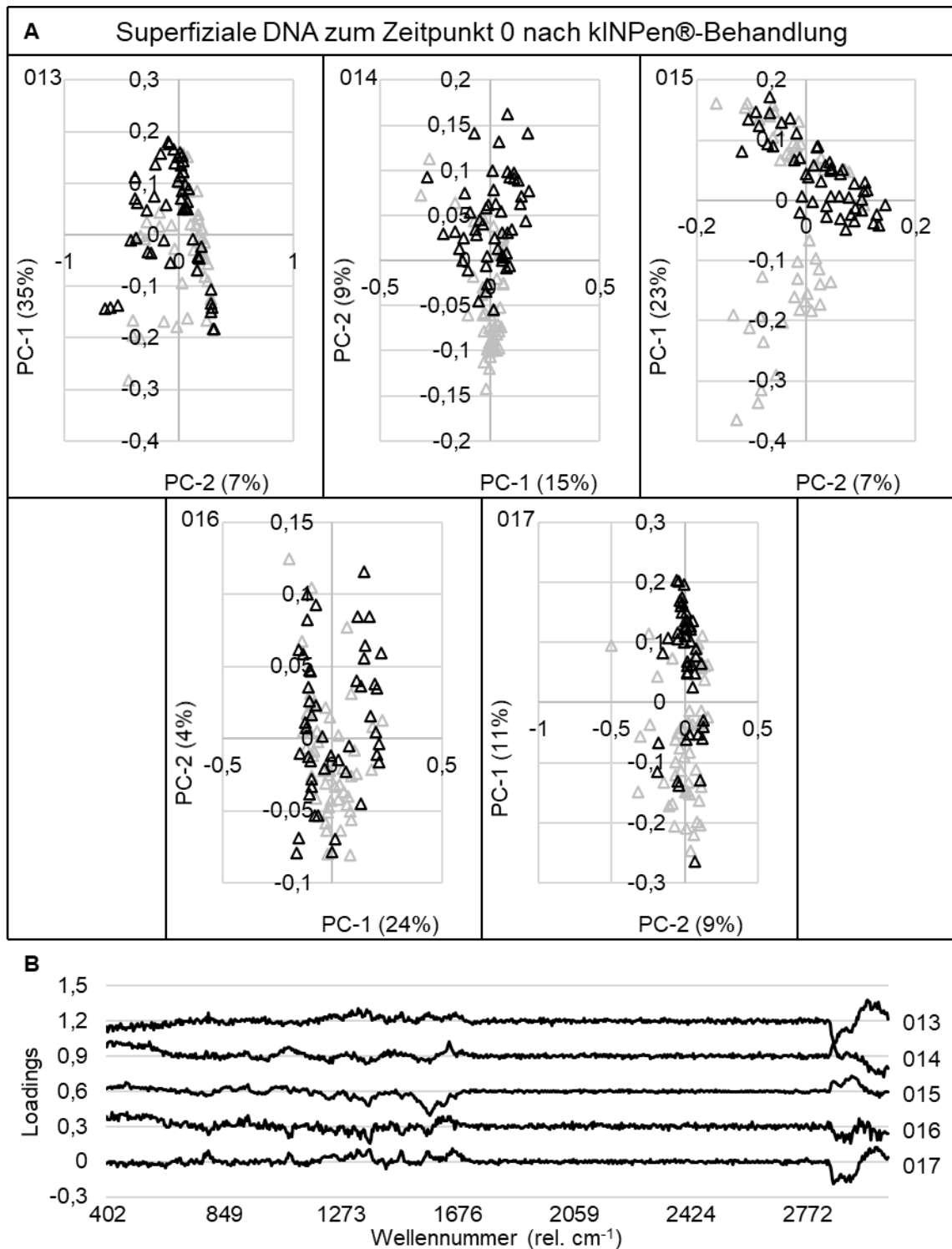
Anhang 4.1: Darstellung einzelner Komponenten für den kINPen®.

TCA der identifizierten Epithelkomponenten unterteilt in verschiedene Konditionen. Intensität abhängig von den CCD counts. Nach fünfminütiger Behandlung zeigen sich in allen Lipidproben Kondensationen. Weitere morphologische Unterschiede waren nicht verlässlich nachweisbar. $p > 0,05$ für alle Vergleiche bei $n = 5$ im gepaarter Wilcoxon Vorzeichen Rang Test. Glykogen war für einen Vergleich nur superfizial zum Zeitpunkt 0 h in ausreichend Proben vorhanden. Die abgebildeten Raman-Bilder sind repräsentativ für alle weiteren Ergebnisse.



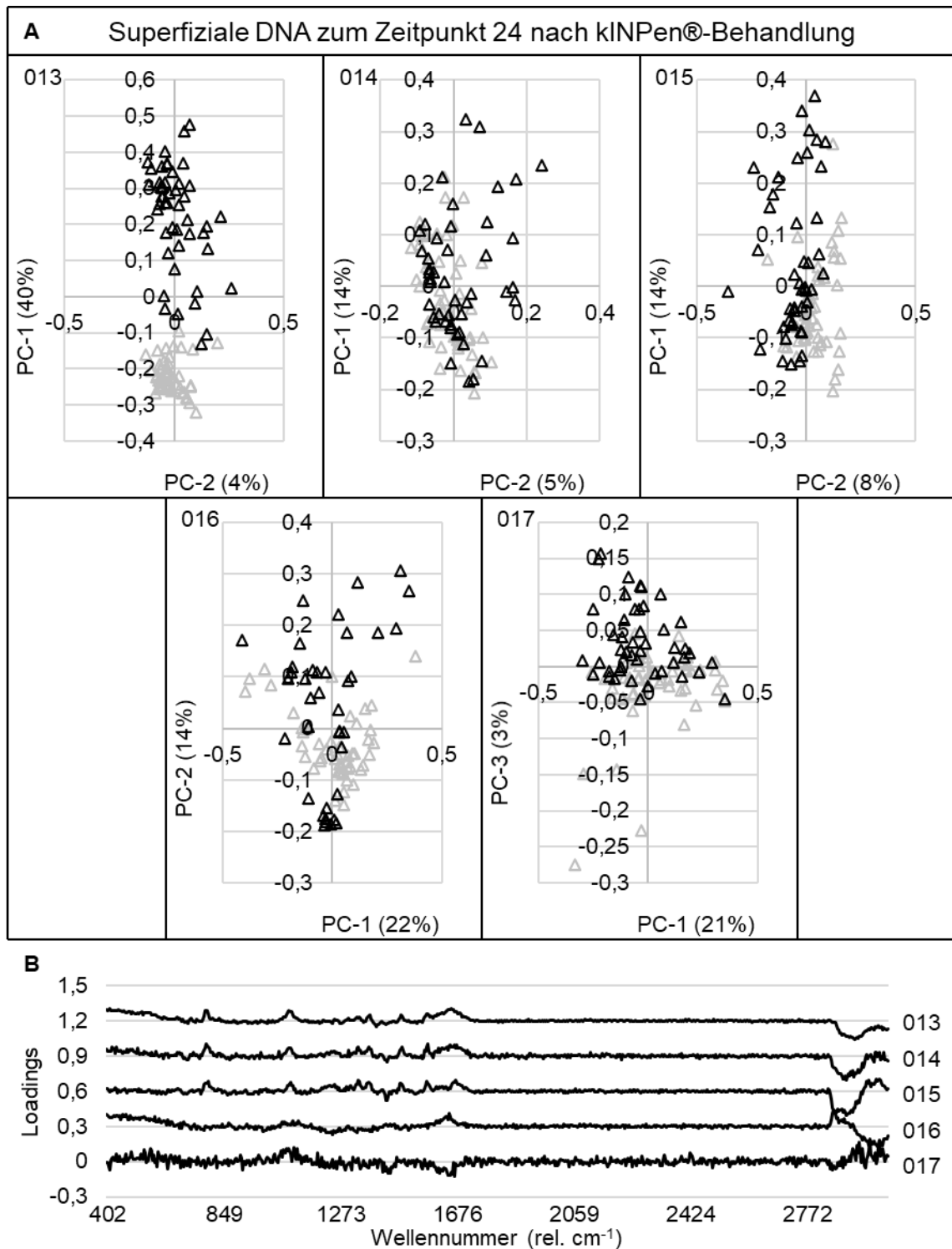
Anhang 4.2: Darstellung einzelner Komponenten für das APCIII.

TCA der identifizierten Epithelkomponenten unterteilt in verschiedene Konditionen. Intensität abhängig von den CCD counts. Nach fünfminütiger Behandlung zeigen sich in allen Lipidproben Kondensationen. Weitere morphologische Unterschiede waren nicht verlässlich nachweisbar. $P > 0,05$ für alle Vergleiche bei $n = 5$ im gepaarter Wilcoxon Vorzeichen Rang Test. Glykogen war in zu wenigen Proben für einen Vergleich vorhanden. Die abgebildeten Raman-Bilder sind repräsentativ für alle weiteren Ergebnisse.



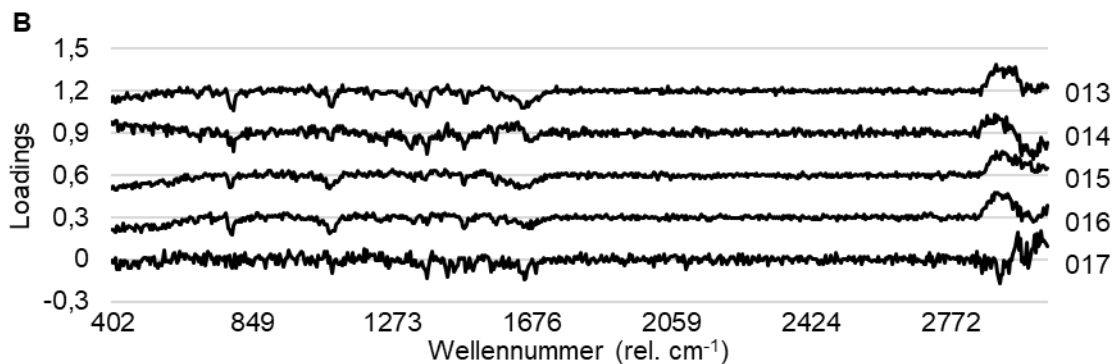
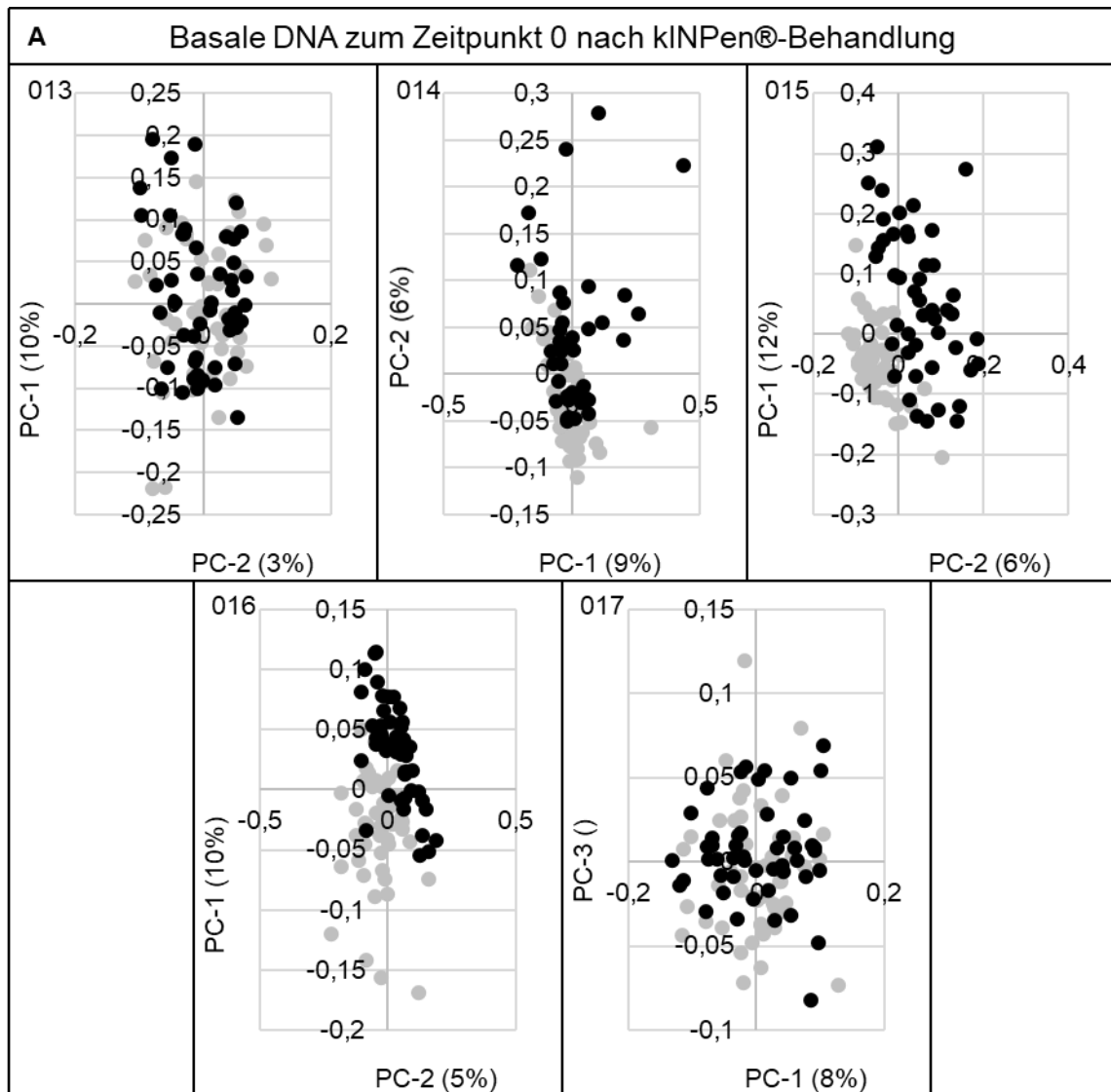
Anhang 5.1.1: PCAs nach fünfminütiger Plasmabehandlung.

Ergebnis der PCA und Auftrennung der akkumulierten Daten in die einzelnen Score-Plots und Loadings. Superfizielle DNA zum Zeitpunkt 0 h. Verwendetes Plasmagerät: kINPen®. A: Fünf Score-Plots der Proben 013-017; grau = unbehandelt, schwarz = behandelt. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: 017, 016, 015, 014, 013.



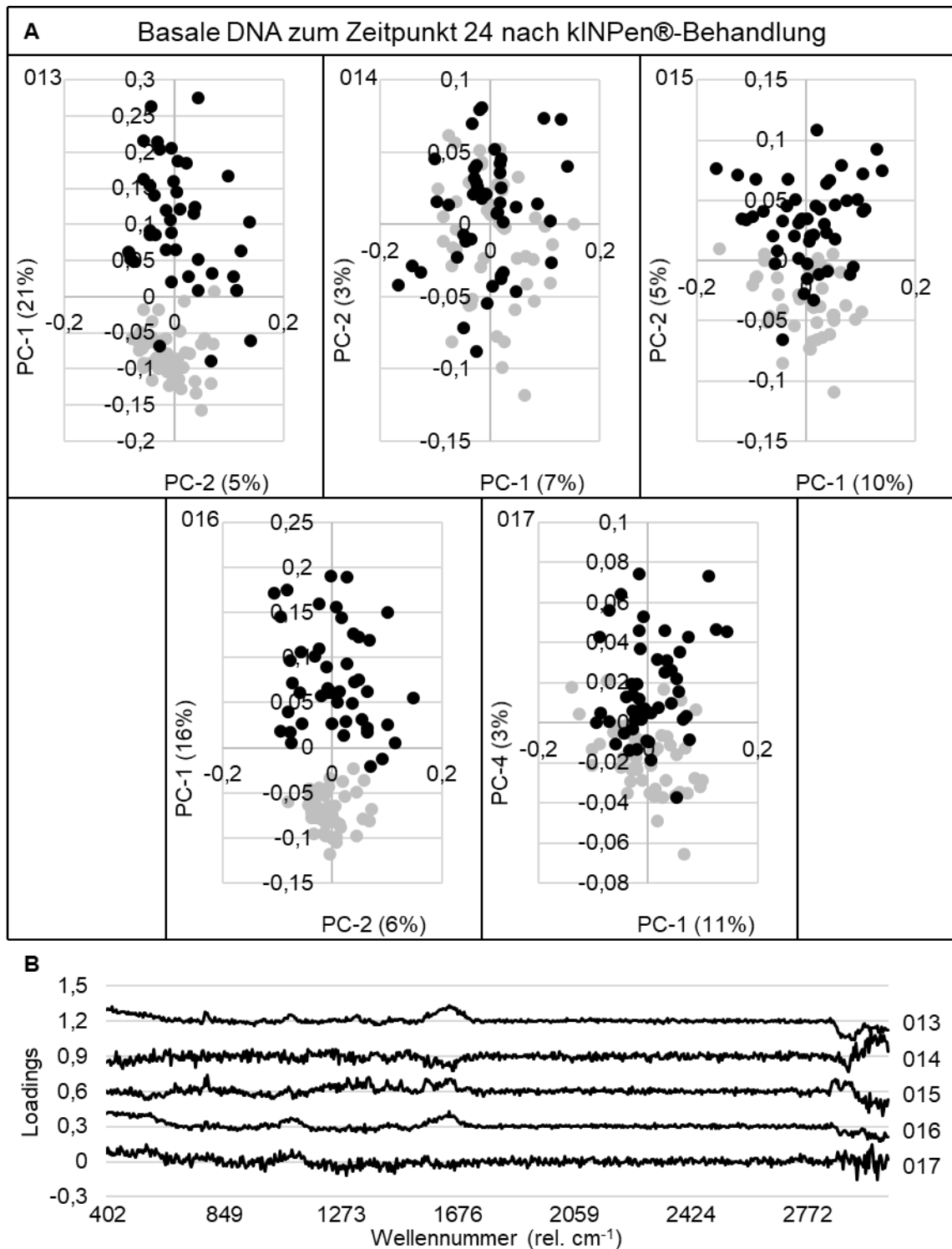
Anhang 5.1.2: PCAs nach fünfminütiger Plasmabehandlung.

Ergebnis der PCA und Auftrennung der akkumulierten Daten in die einzelnen Score-Plots und Loadings. Superfizielle DNA zum Zeitpunkt 24 h. Verwendetes Plasmagerät: kINPen®. A: Fünf Score-Plots der Proben 013-017; grau = unbehandelt, schwarz = behandelt. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: 017, 016, 015, 014, 013.



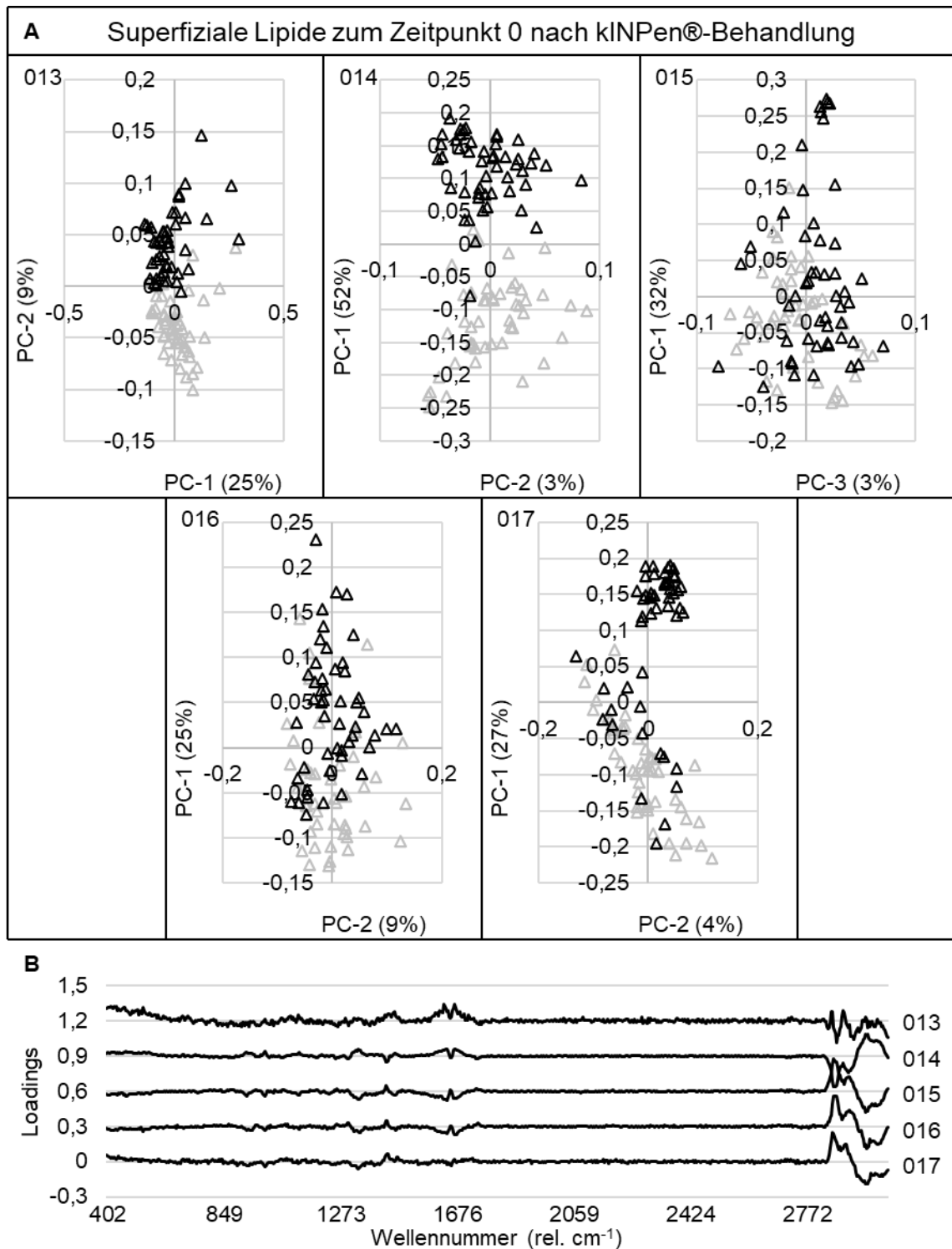
Anhang 5.1.3: PCAs nach fünfminütiger Plasmabehandlung.

Ergebnis der PCA und Auftrennung der akkumulierten Daten in die einzelnen Score-Plots und Loadings. Basale DNA zum Zeitpunkt 0 h. Verwendetes Plasmagerät: kINPen®. A: Fünf Score-Plots der Proben 013-017; grau = unbehandelt, schwarz = behandelt. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: 017, 016, 015, 014, 013.



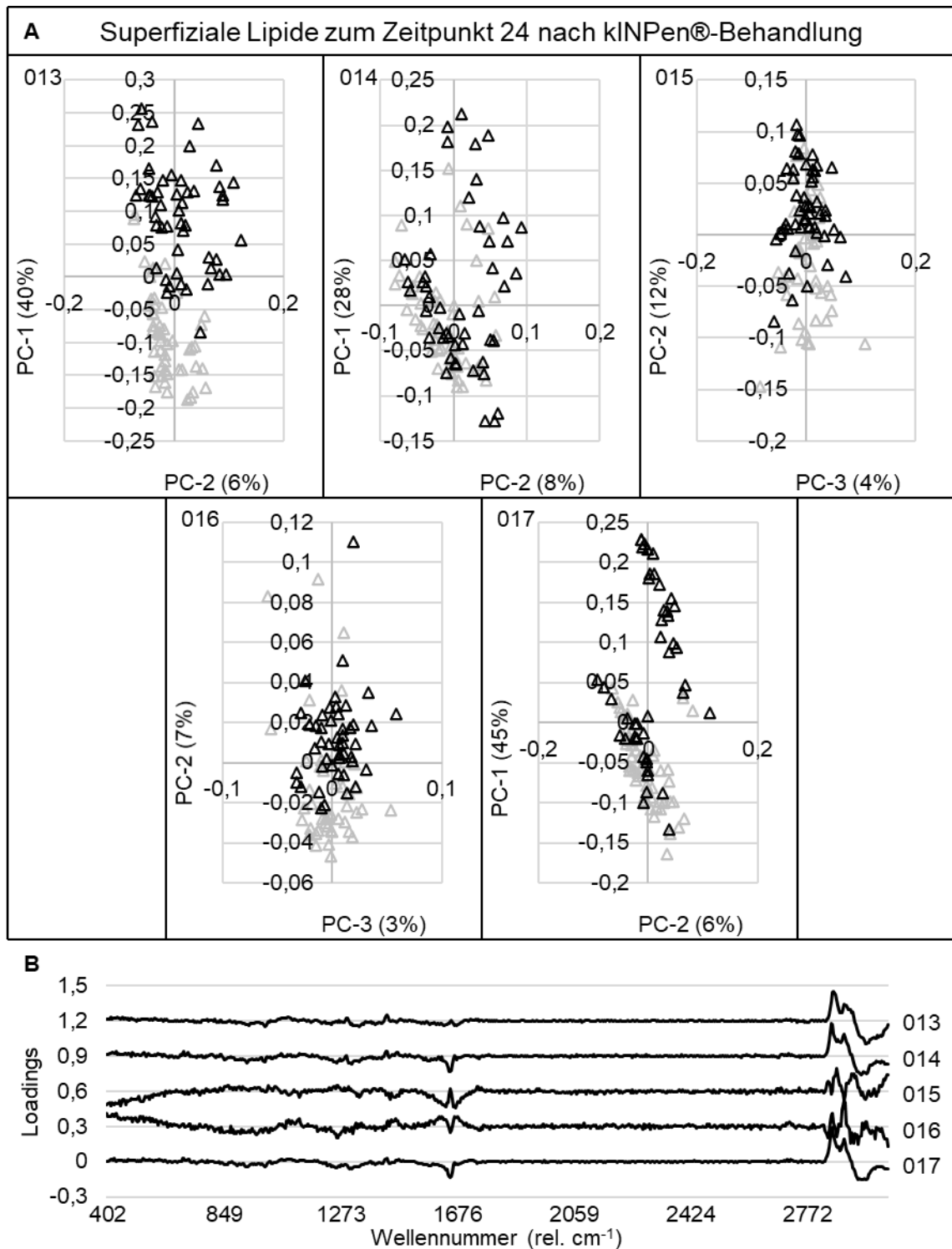
Anhang 5.1.4: PCAs nach fünfminütiger Plasmabehandlung.

Ergebnis der PCA und Auftrennung der akkumulierten Daten in die einzelnen Score-Plots und Loadings. Basale DNA zum Zeitpunkt 24 h. Verwendetes Plasmagerät: kINPen®. A: Fünf Score-Plots der Proben 013-017; grau = unbehandelt, schwarz = behandelt. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: 017, 016, 015, 014, 013.



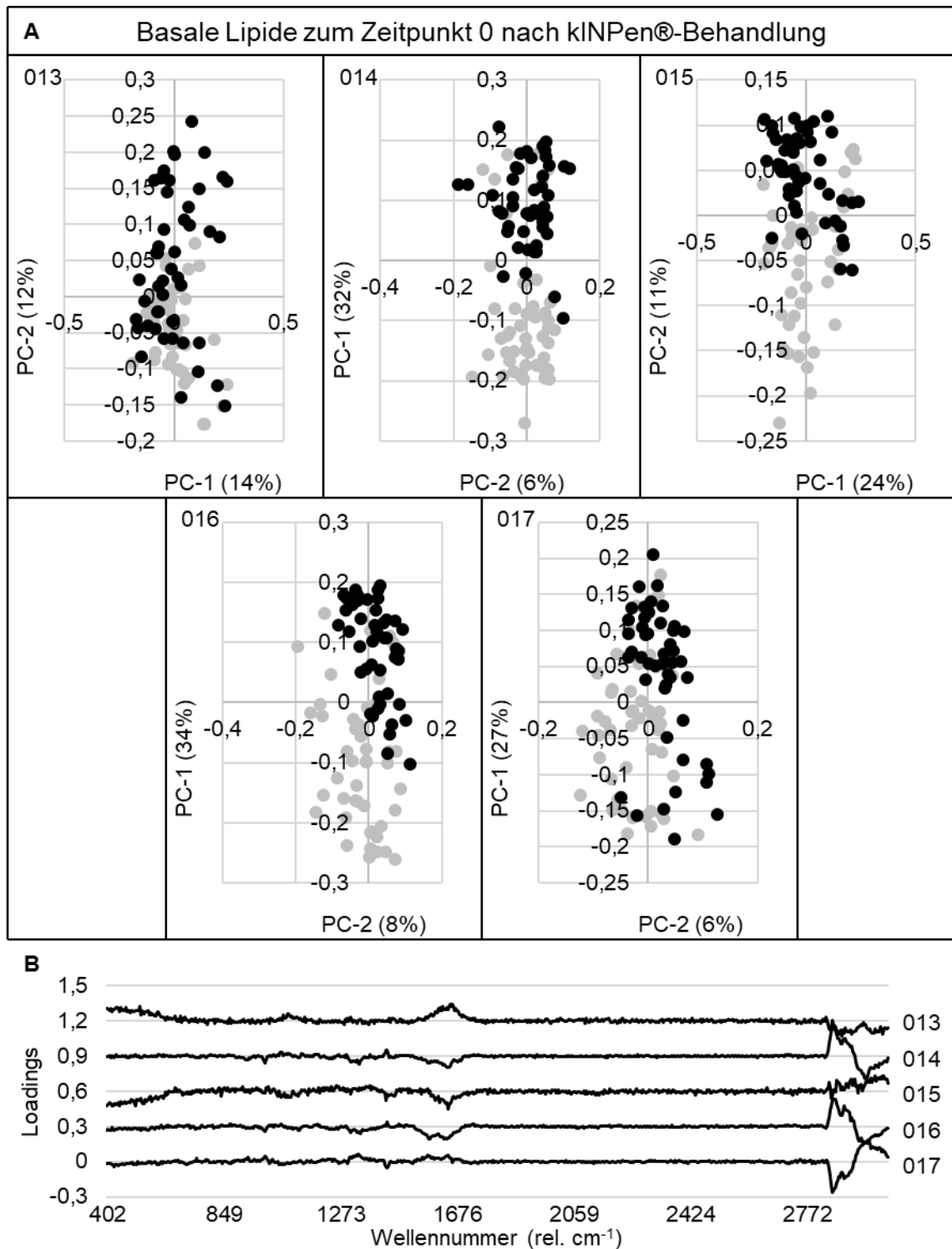
Anhang 5.1.5: PCAs nach fünfminütiger Plasmabehandlung.

Ergebnis der PCA und Auftrennung der akkumulierten Daten in die einzelnen Score-Plots und Loadings. Superfizielle Lipide zum Zeitpunkt 0 h. Verwendetes Plasmagerät: kINPen®. A: Fünf Score-Plots der Proben 013-017; grau = unbehandelt, schwarz = behandelt. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: 017, 016, 015, 014, 013.



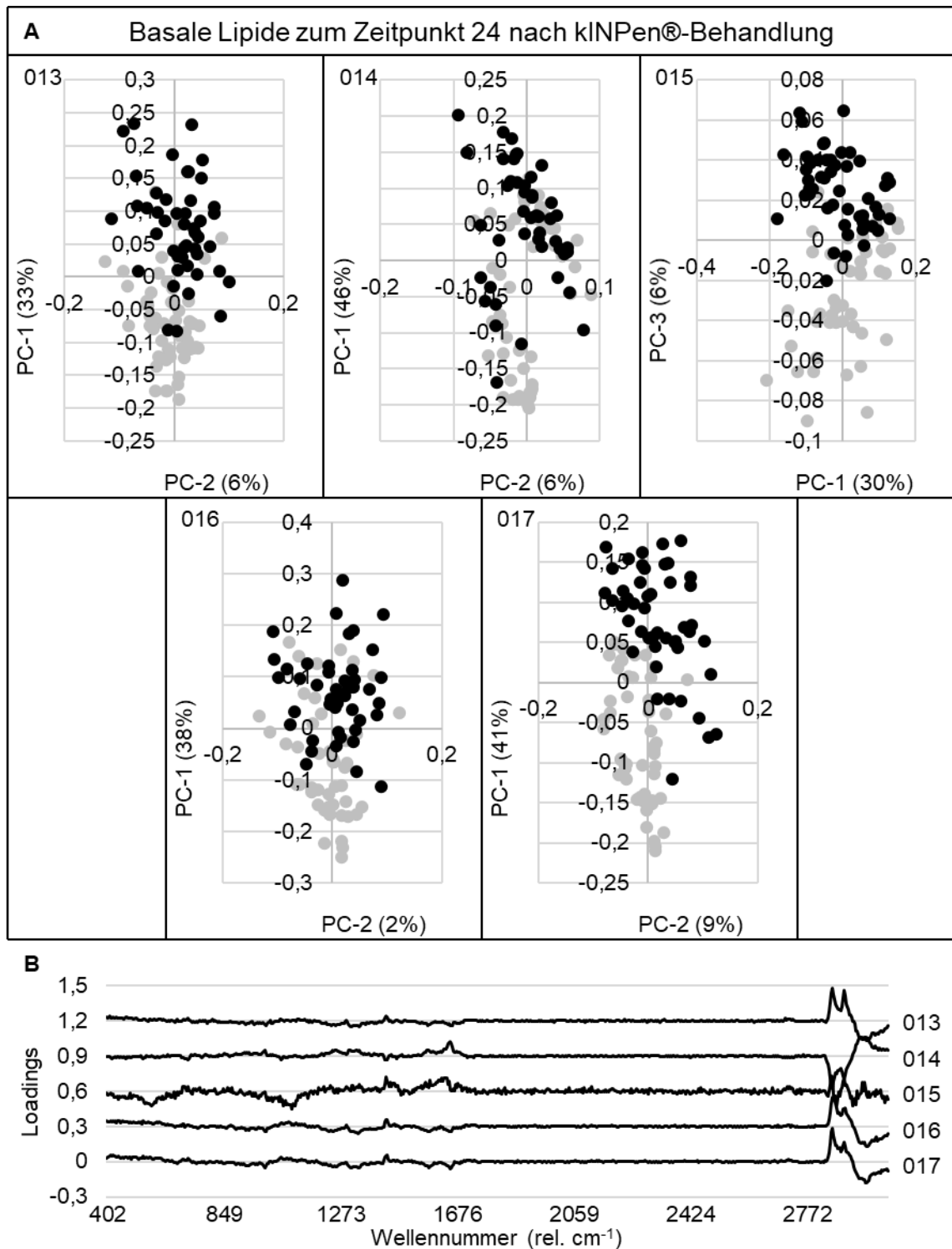
Anhang 5.1.6: PCAs nach fünfminütiger Plasmabehandlung.

Ergebnis der PCA und Auftrennung der akkumulierten Daten in die einzelnen Score-Plots und Loadings. Superfizielle Lipide zum Zeitpunkt 24 h. Verwendetes Plasmagerät: kINPen®. A: Fünf Score-Plots der Proben 013-017; grau = unbehandelt, schwarz = behandelt. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: 017, 016, 015, 014, 013.



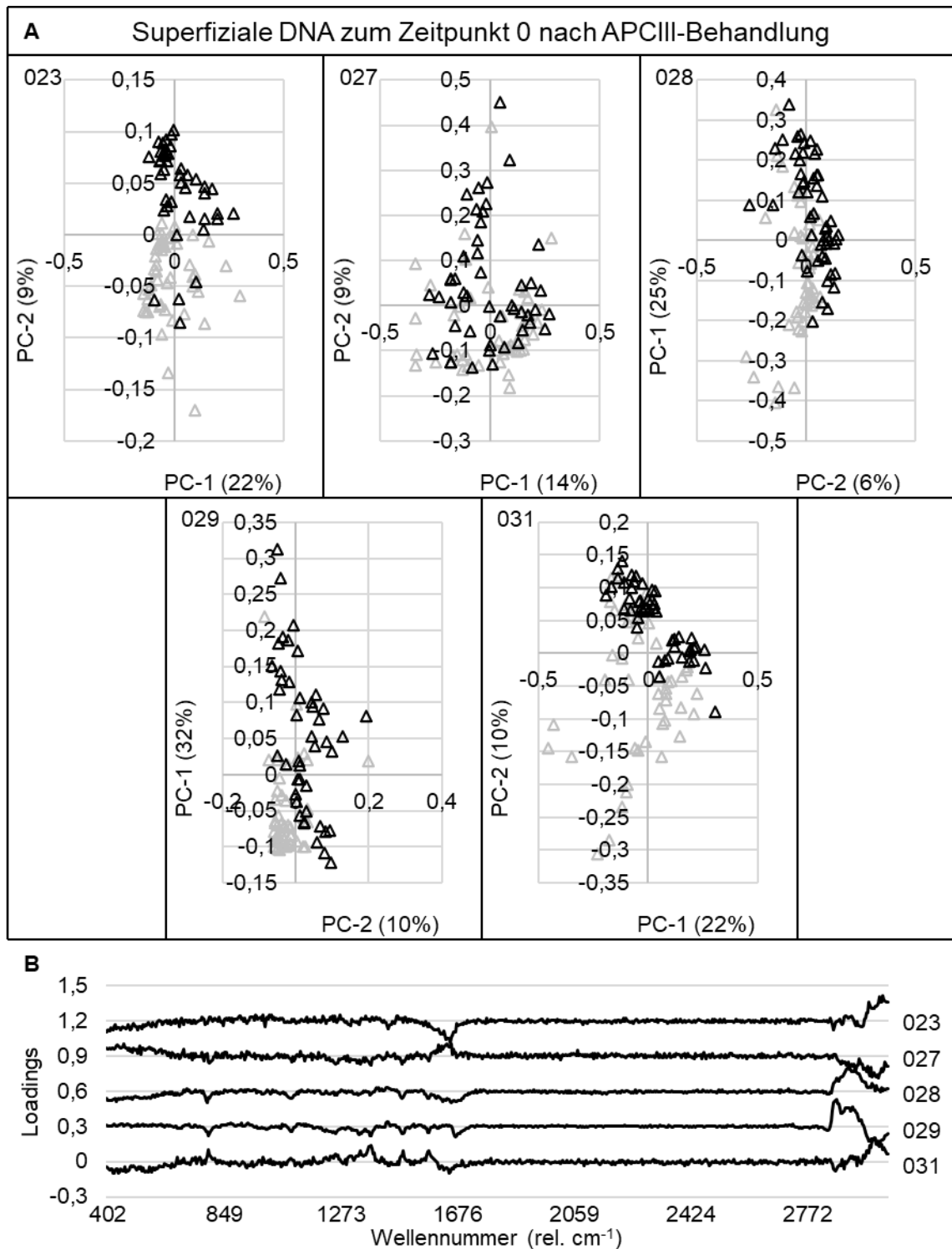
Anhang 5.1.7: PCAs nach fünfminütiger Plasmabehandlung.

Ergebnis der PCA und Auftrennung der akkumulierten Daten in die einzelnen Score-Plots und Loadings. Basale Lipide zum Zeitpunkt 0 h. Verwendetes Plasmagerät: kINPen®. A: Fünf Score-Plots der Proben 013-017; grau = unbehandelt, schwarz = behandelt. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: 017, 016, 015, 014, 013.



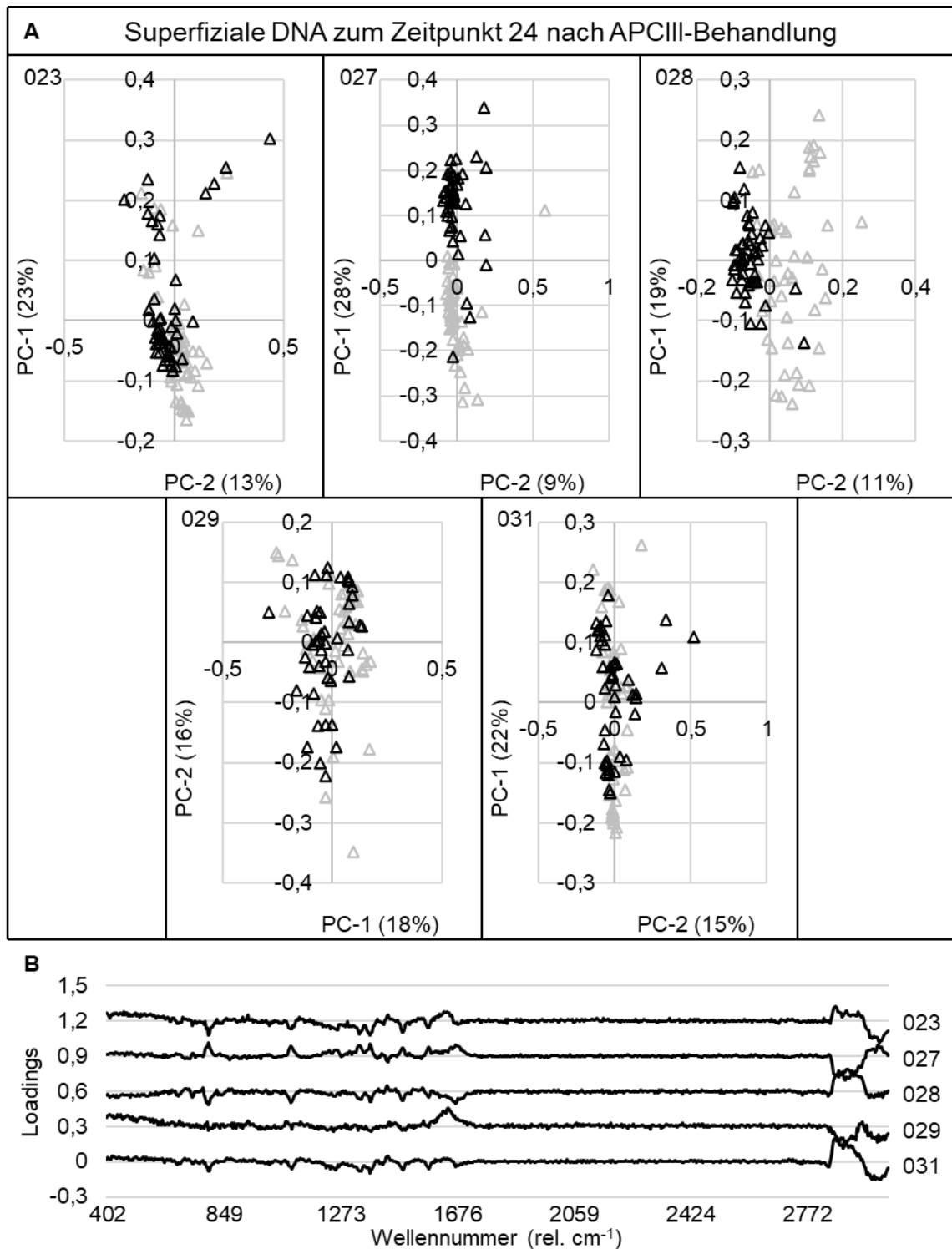
Anhang 5.1.8: PCAs nach fünfminütiger Plasmabehandlung.

Ergebnis der PCA und Auftrennung der akkumulierten Daten in die einzelnen Score-Plots und Loadings. Basale Lipide zum Zeitpunkt 24 h. Verwendetes Plasmagerät: kINPen®. A: Fünf Score-Plots der Proben 013-017; grau = unbehandelt, schwarz = behandelt. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: 017, 016, 015, 014, 013.



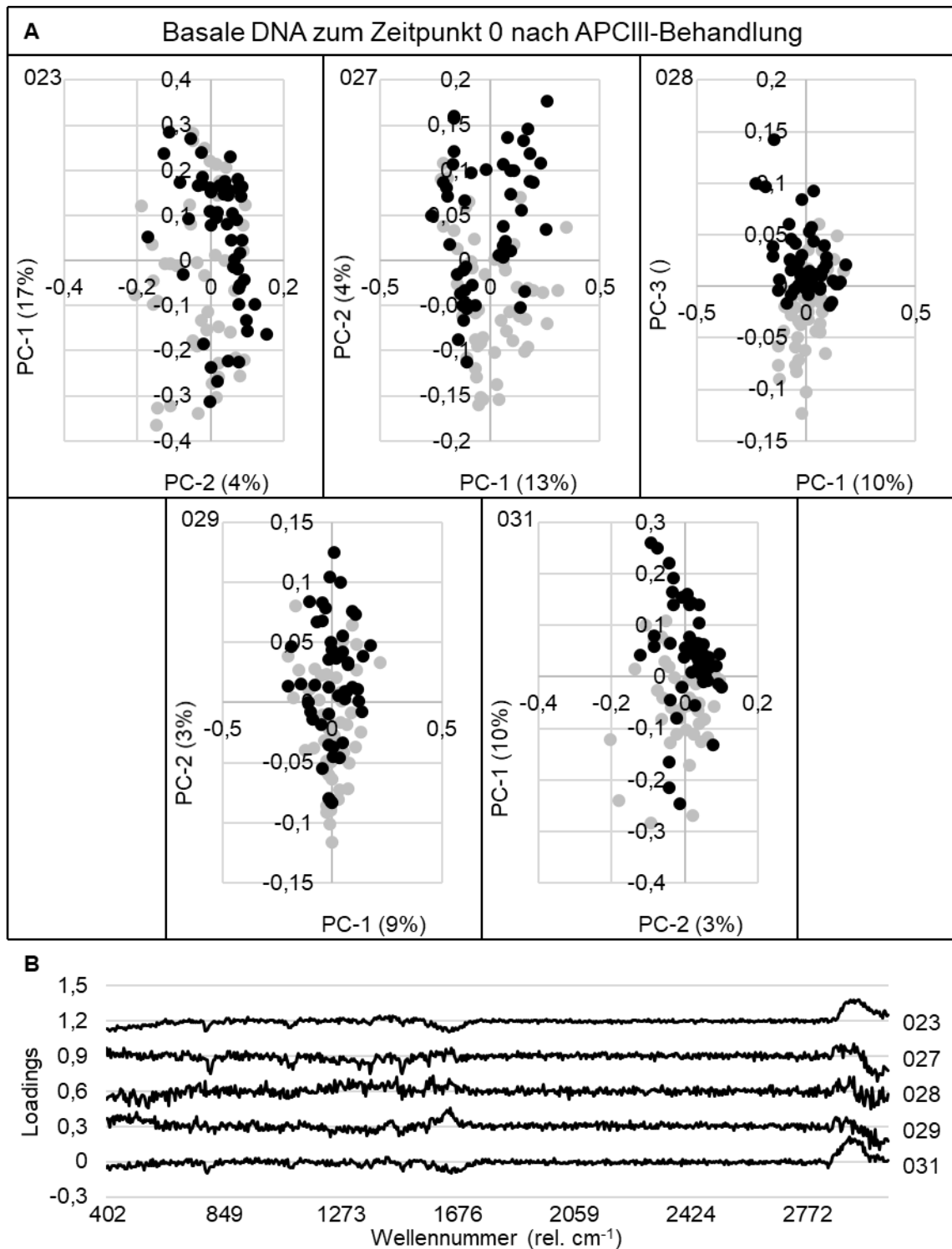
Anhang 5.2.1: PCAs nach fünfminütiger Plasmabehandlung.

Ergebnis der PCA und Auftrennung der akkumulierten Daten in die einzelnen Score-Plots und Loadings. Superfizielle DNA zum Zeitpunkt 0 h. Verwendetes Plasmagerät: APCIII. A: Fünf Score-Plots der Proben 023, 027-029, 031; grau = unbehandelt, schwarz = behandelt. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: 031, 029, 028, 027, 023.



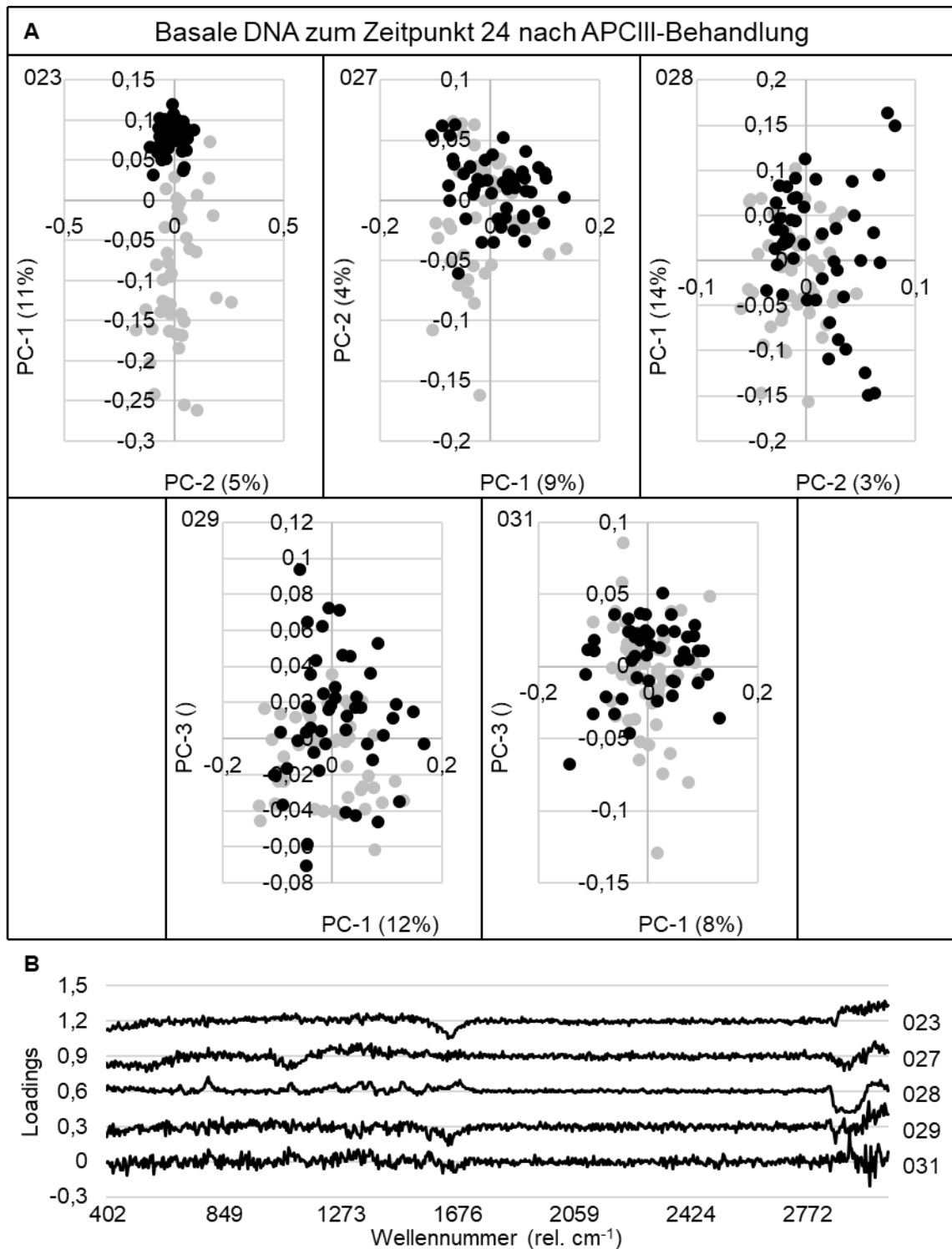
Anhang 5.2.2: PCAs nach fünfminütiger Plasmabehandlung.

Ergebnis der PCA und Auftrennung der akkumulierten Daten in die einzelnen Score-Plots und Loadings. Superfizielle DNA zum Zeitpunkt 24 h. Verwendetes Plasmagerät: APCIII. A: Fünf Score-Plots der Proben 023, 027-029, 031; grau = unbehandelt, schwarz = behandelt. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: 031, 029, 028, 027, 023.



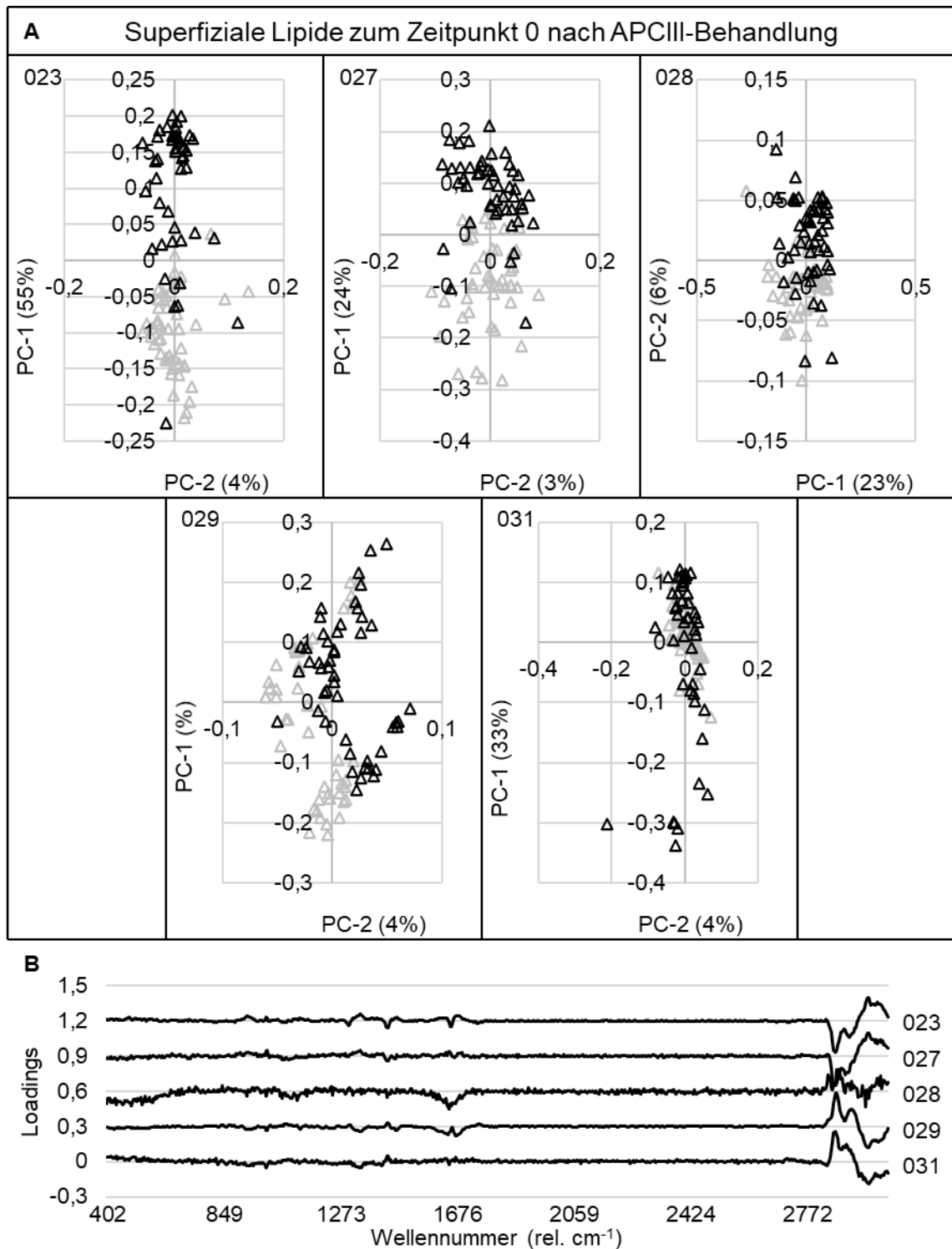
Anhang 5.2.3: PCAs nach fünfminütiger Plasmabehandlung.

Ergebnis der PCA und Auftrennung der akkumulierten Daten in die einzelnen Score-Plots und Loadings. Basale DNA zum Zeitpunkt 0 h. Verwendetes Plasmagerät: APCIII. A: Fünf Score-Plots der Proben 023, 027-029, 031; grau = unbehandelt, schwarz = behandelt. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: 031, 029, 028, 027, 023.



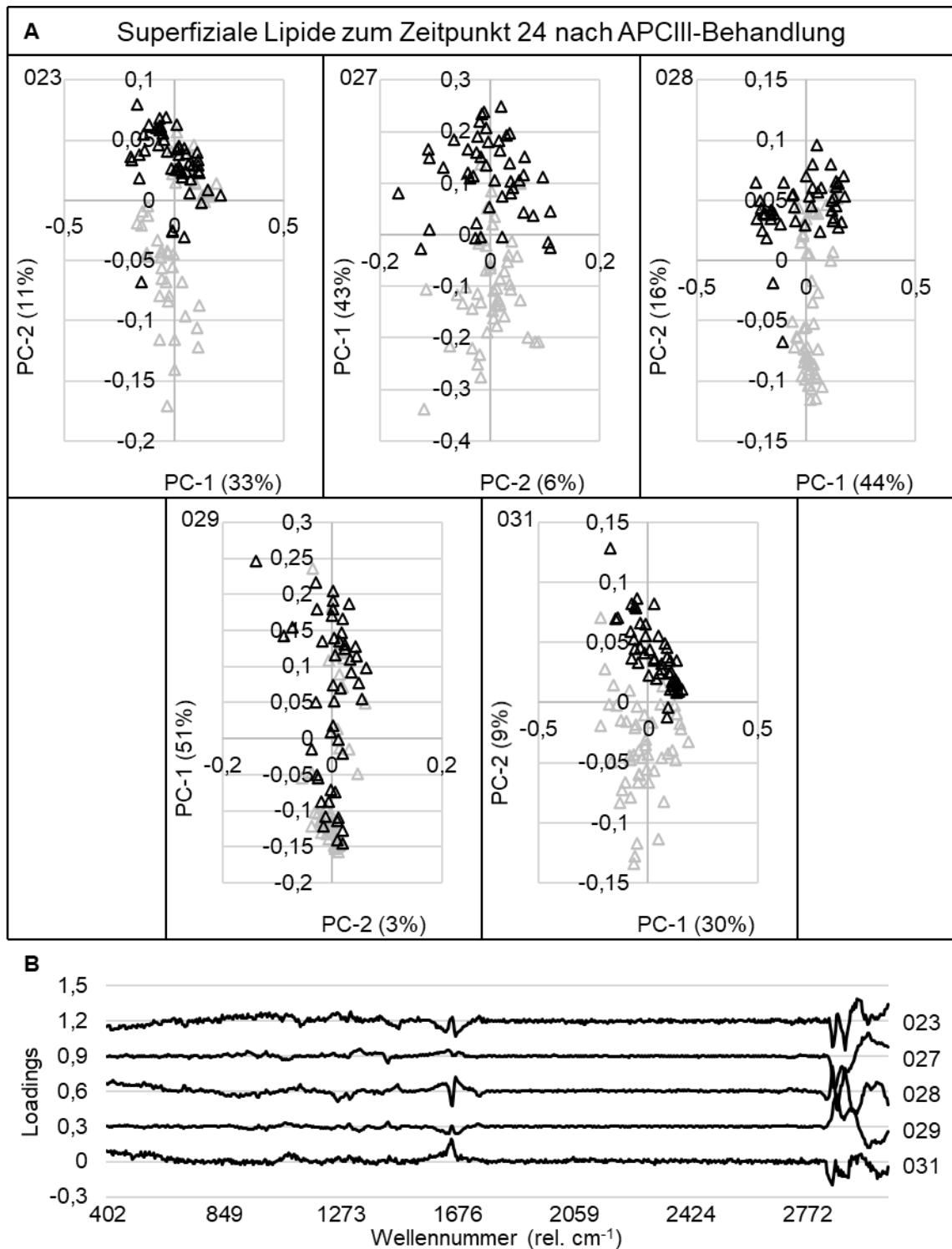
Anhang 5.2.4: PCAs nach fünfminütiger Plasmabehandlung.

Ergebnis der PCA und Auftrennung der akkumulierten Daten in die einzelnen Score-Plots und Loadings. Basale DNA zum Zeitpunkt 24 h. Verwendetes Plasmagerät: APCIII. A: Fünf Score-Plots der Proben 023, 027-029, 031; grau = unbehandelt, schwarz = behandelt. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: 031, 029, 028, 027, 023.



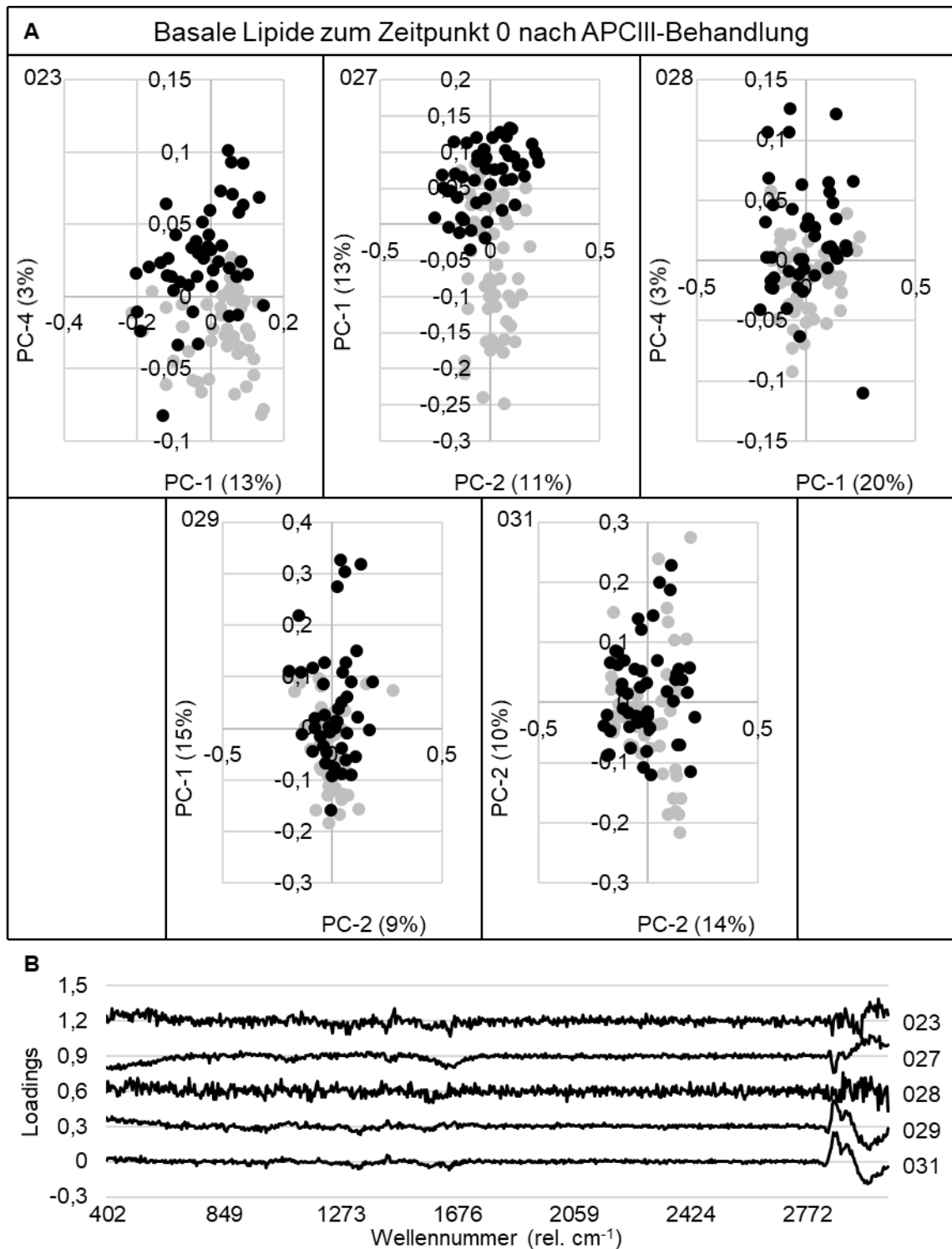
Anhang 5.2.5: PCAs nach fünfminütiger Plasmabehandlung.

Ergebnis der PCA und Auftrennung der akkumulierten Daten in die einzelnen Score-Plots und Loadings. Superfizielle Lipide zum Zeitpunkt 0 h. Verwendetes Plasmagerät: APCIII. A: Fünf Score-Plots der Proben 023, 027-029, 031; grau = unbehandelt, schwarz = behandelt. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: 031, 029, 028, 027, 023.



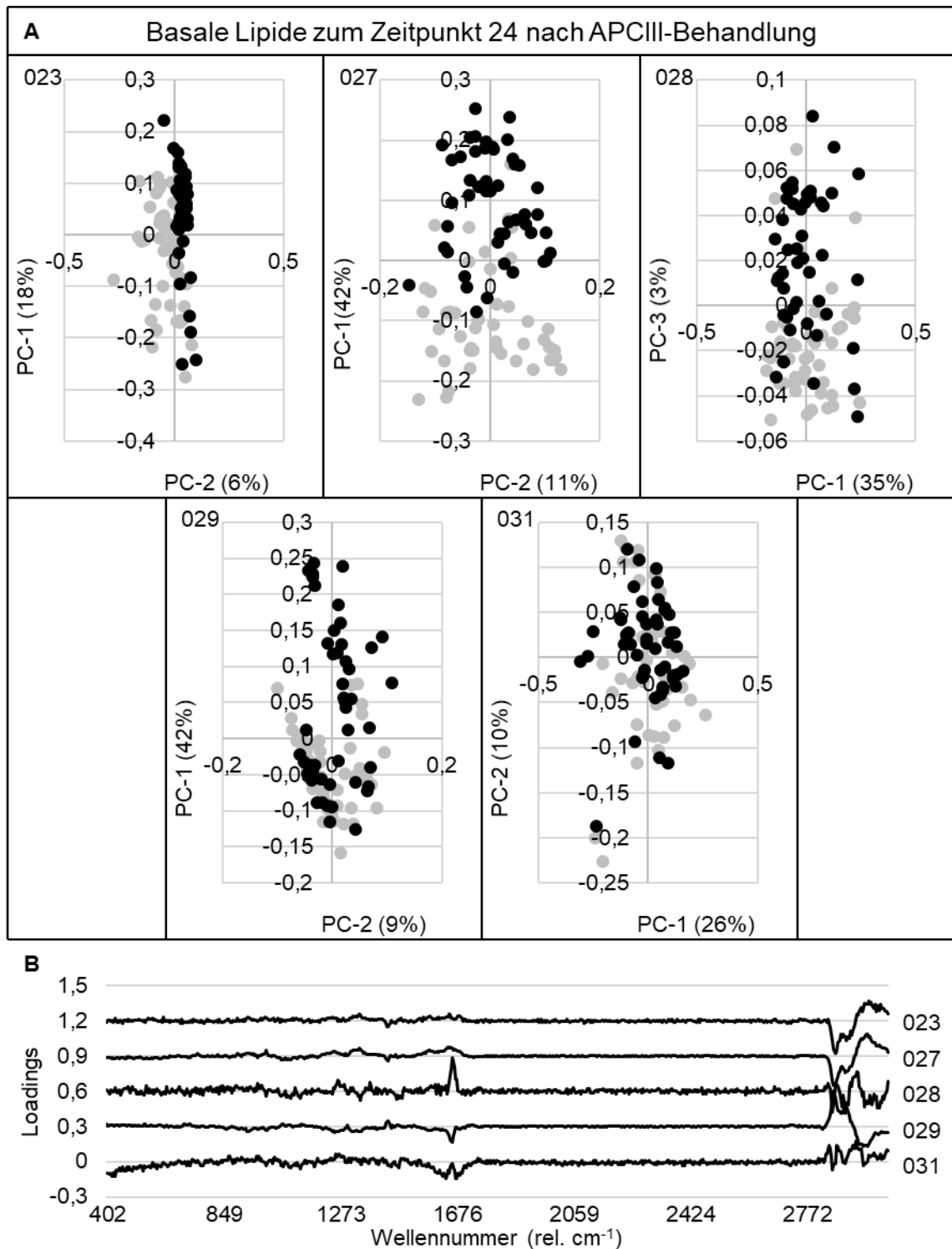
Anhang 5.2.6: PCAs nach fünfminütiger Plasmabehandlung.

Ergebnis der PCA und Auftrennung der akkumulierten Daten in die einzelnen Score-Plots und Loadings. Superfizielle Lipide zum Zeitpunkt 24 h. Verwendetes Plasmagerät: APCIII. A: Fünf Score-Plots der Proben 023, 027-029, 031; grau = unbehandelt, schwarz = behandelt. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: 031, 029, 028, 027, 023.



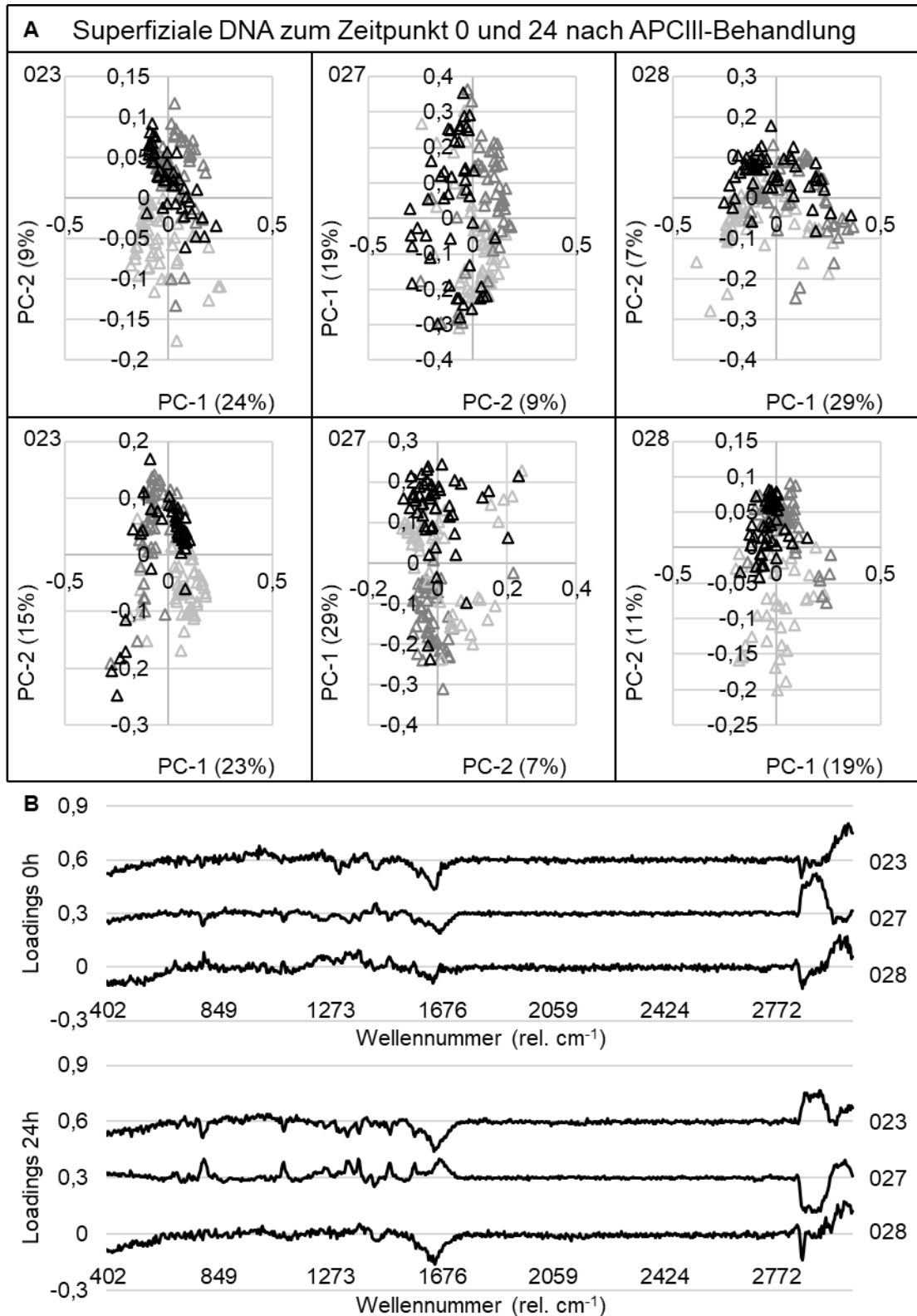
Anhang 5.2.7: PCAs nach fünfminütiger Plasmabehandlung.

Ergebnis der PCA und Auftrennung der akkumulierten Daten in die einzelnen Score-Plots und Loadings. Basale Lipide zum Zeitpunkt 0 h. Verwendetes Plasmagerät: APCIII. A: Fünf Score-Plots der Proben 023, 027-029, 031; grau = unbehandelt, schwarz = behandelt. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: 031, 029, 028, 027, 023.



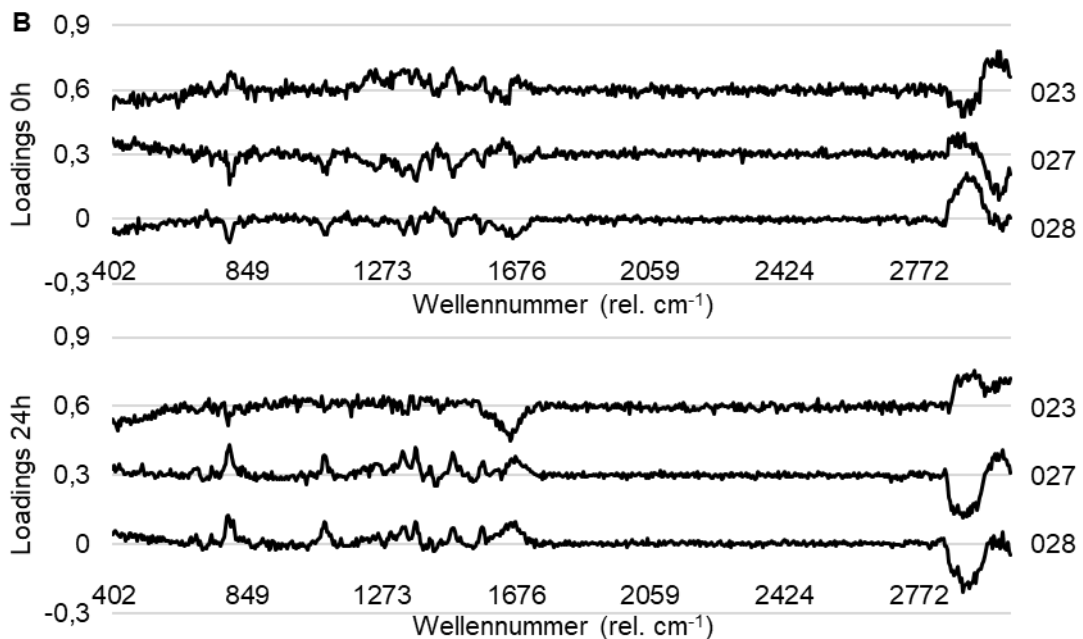
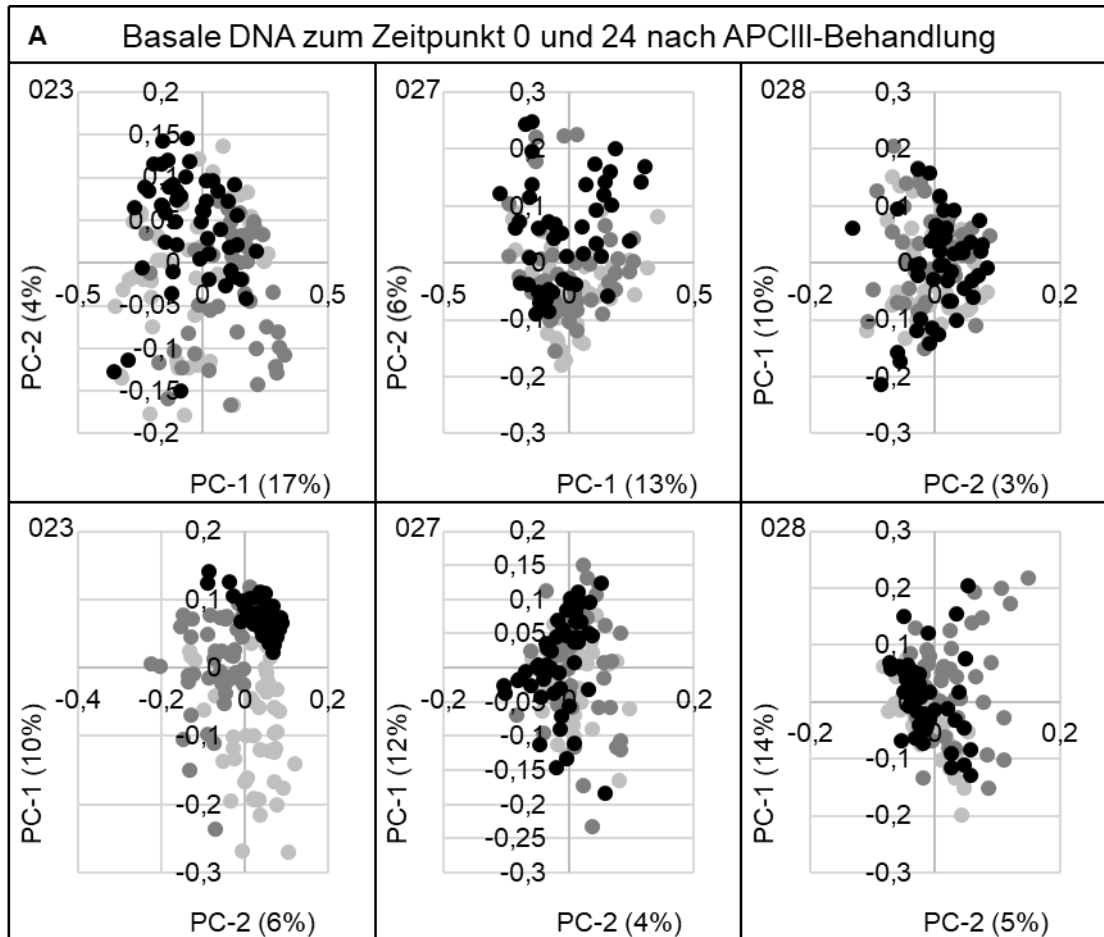
Anhang 5.2.8: PCAs nach fünfminütiger Plasmabehandlung.

Ergebnis der PCA und Auftrennung der akkumulierten Daten in die einzelnen Score-Plots und Loadings. Basale Lipide zum Zeitpunkt 24 h. Verwendetes Plasmagerät: APCIII. A: Fünf Score-Plots der Proben 023, 027-029, 031; grau = unbehandelt, schwarz = behandelt. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: 031, 029, 028, 027, 023.



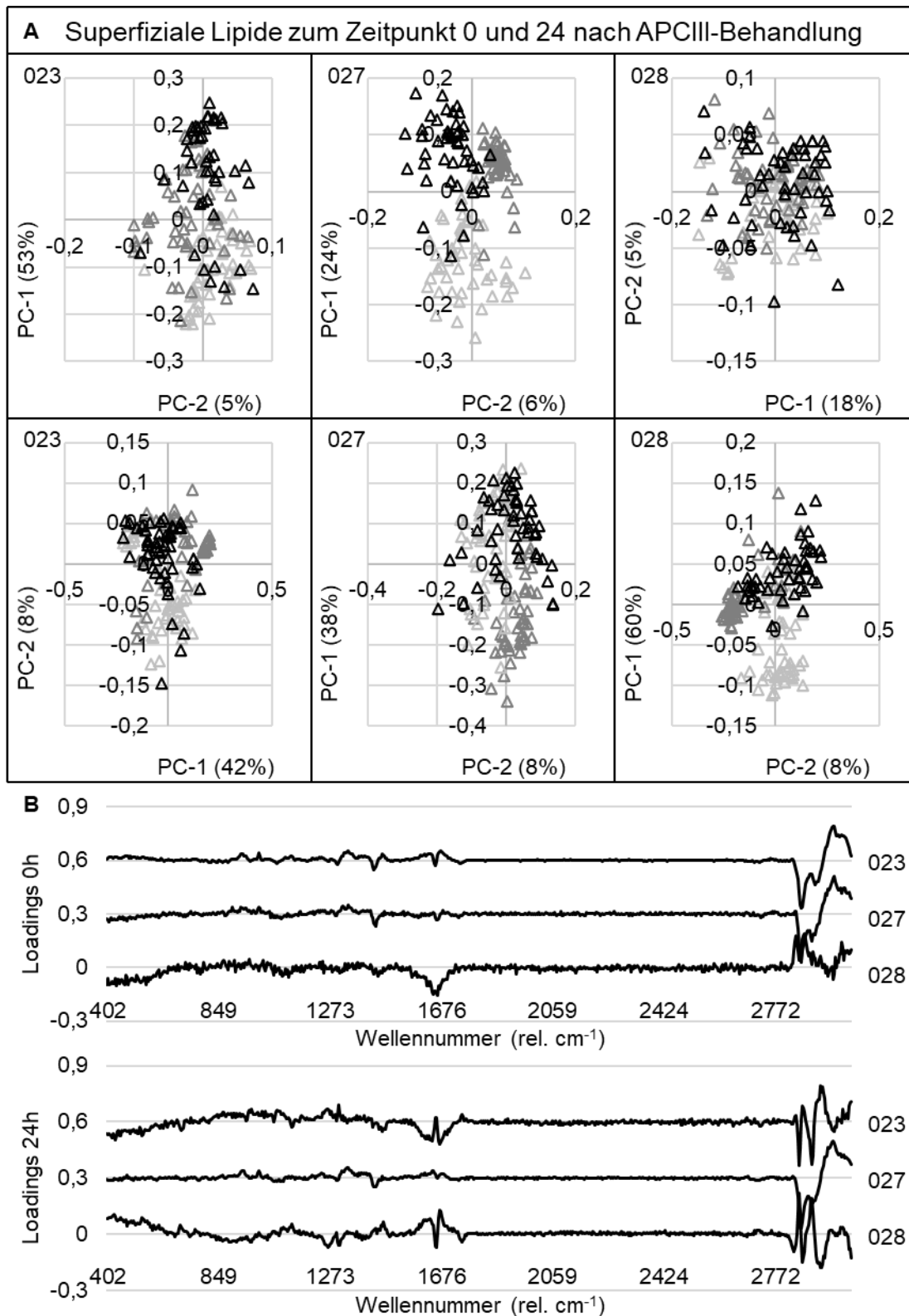
Anhang 6.1: Aufgetrennte Daten der Behandlungsdauer-Analyse.

PCA von akkumulierten Daten in Score-Plots und Loadings. Superfizielle DNA zum Zeitpunkt 0 h und 24. Verwendetes Plasmagerät: APCIII. A: Sechs Score-Plots der Proben 023, 027, 028. Obere Reihe: Zeitpunkt 0 h, untere: Zeitpunkt 24 h; grau = unbehandelt, schwarz = behandelt. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: 028, 027, 023.



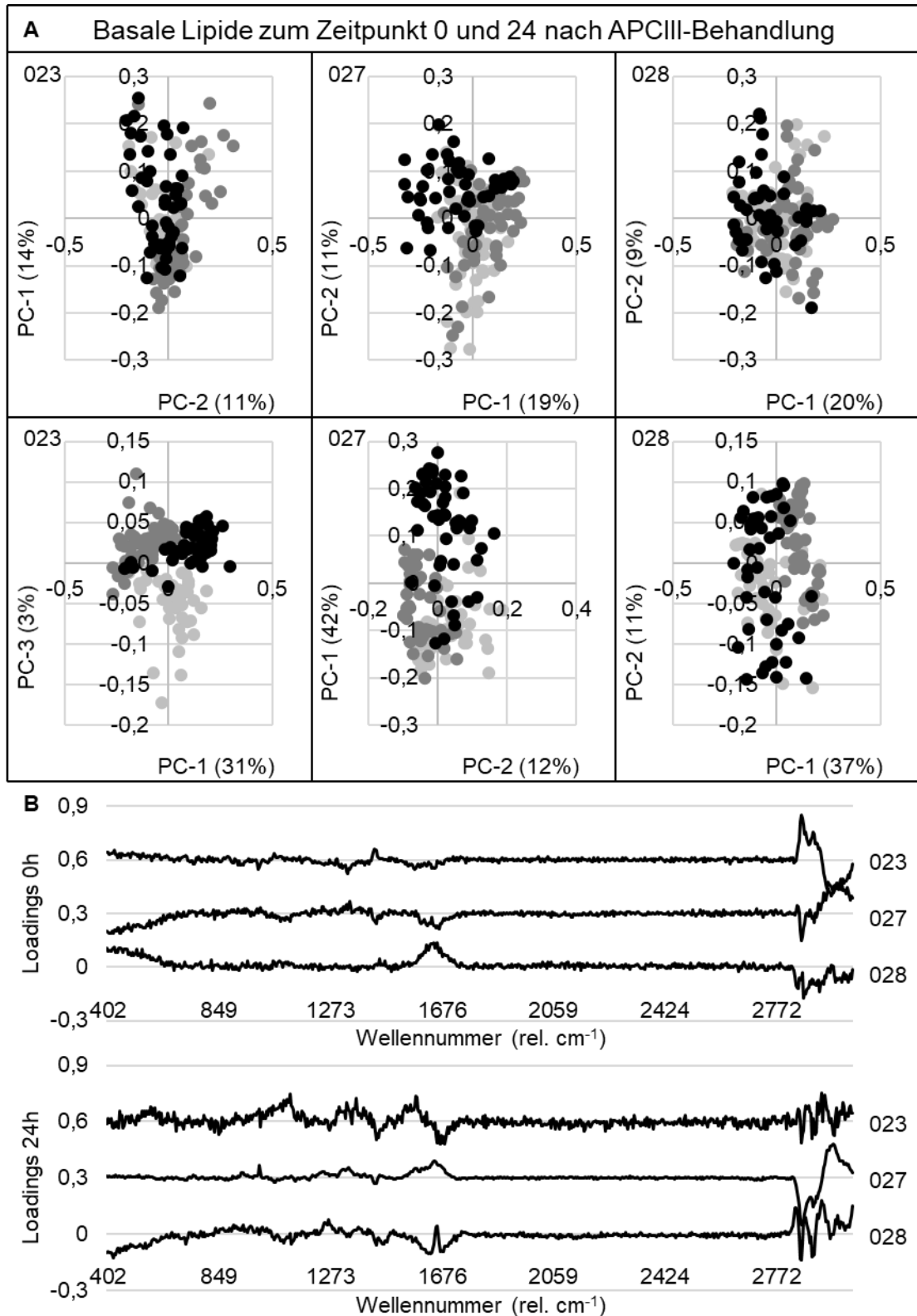
Anhang 6.2: Aufgetrennte Daten der Behandlungsdauer-Analyse.

PCA von akkumulierten Daten in Score-Plots und Loadings. Basale DNA zum Zeitpunkt 0 h und 24. Verwendetes Plasmagerät: APCIII. A: Sechs Score-Plots der Proben 023, 027, 028. Obere Reihe: Zeitpunkt 0 h, untere: Zeitpunkt 24 h; grau = unbehandelt, schwarz = behandelt. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: 028, 027, 023.



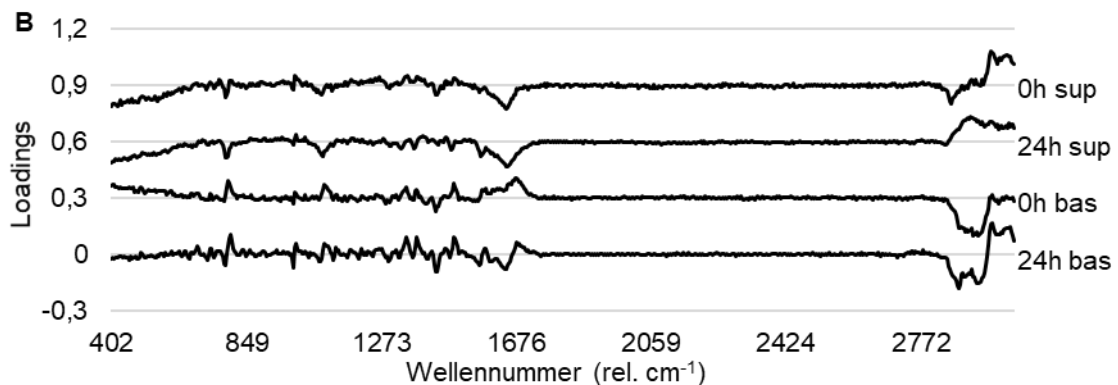
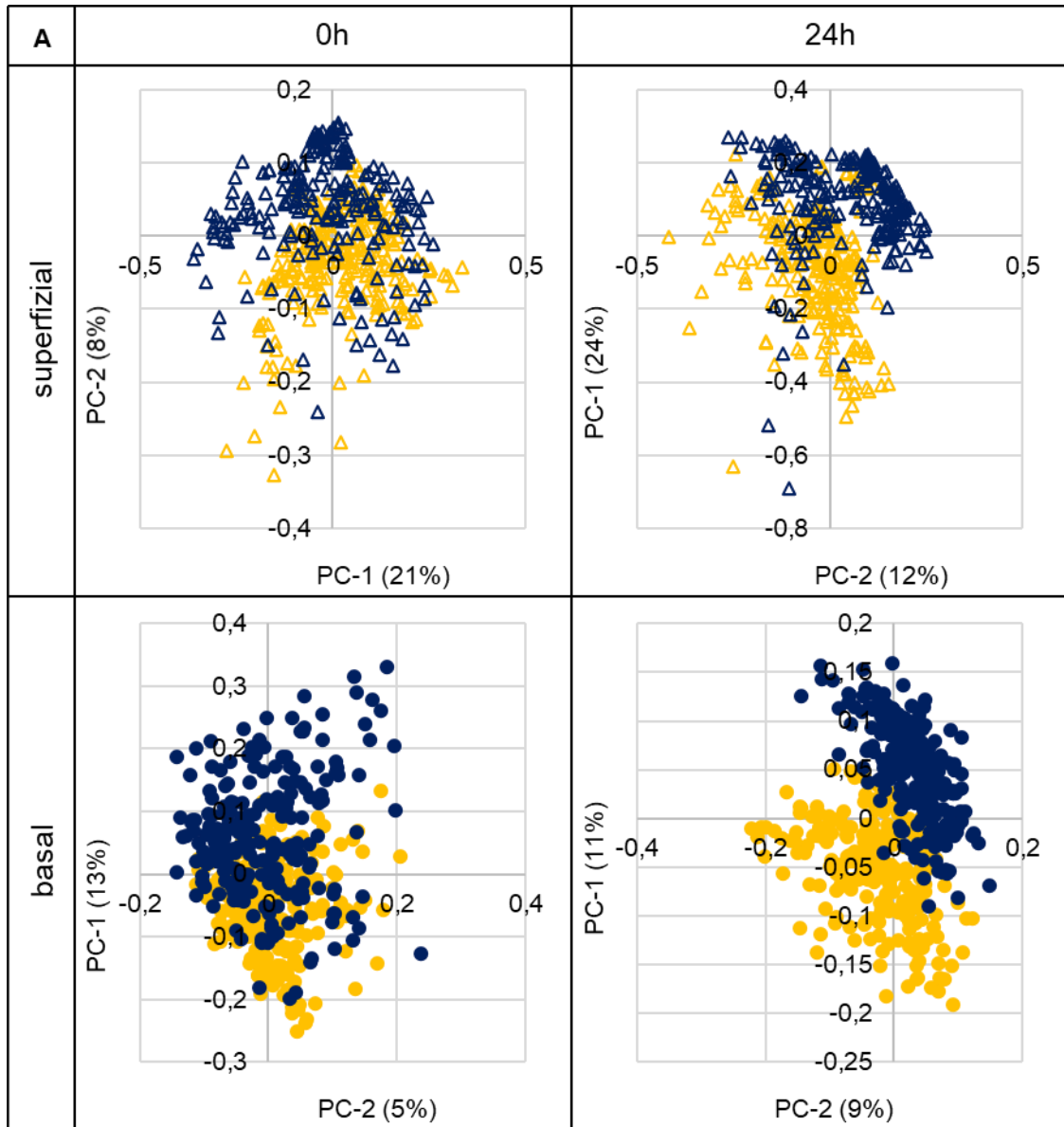
Anhang 6.3: Aufgetrennte Daten der Behandlungsdauer-Analyse.

PCA von akkumulierten Daten in Score-Plots und Loadings. Superfizielle Lipide zum Zeitpunkt 0 h und 24. Verwendetes Plasmagerät: APCIII. A: Sechs Score-Plots der Proben 023, 027, 028. Obere Reihe: Zeitpunkt 0 h, untere: Zeitpunkt 24 h; grau = unbehandelt, schwarz = behandelt. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: 028, 027, 023.



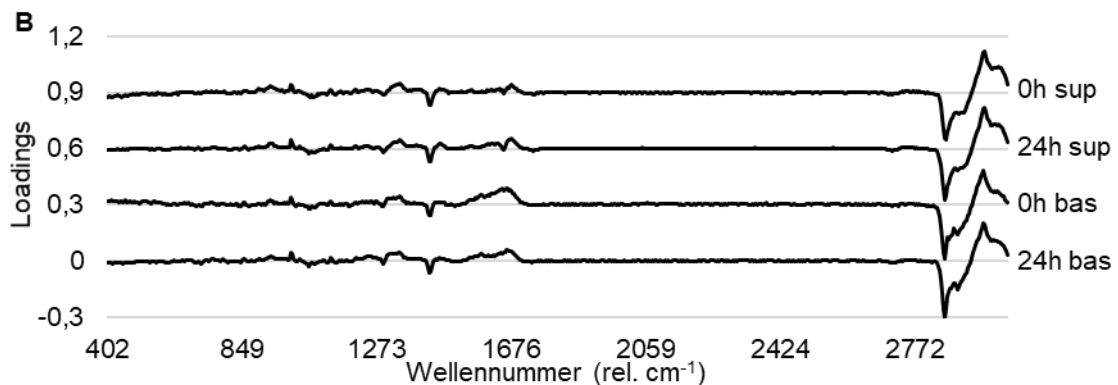
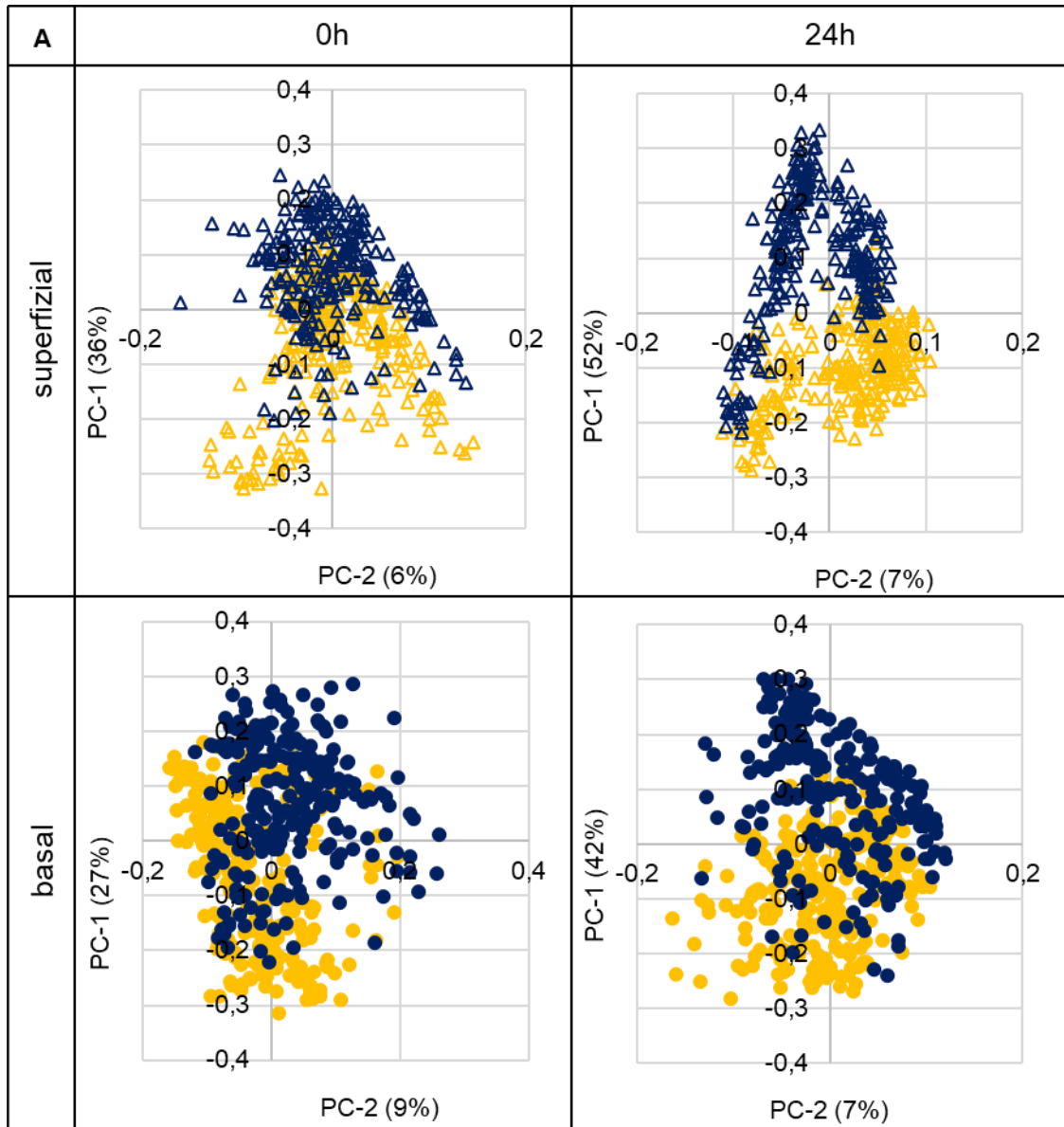
Anhang 6.4: Aufgetrennte Daten der Behandlungsdauer-Analyse.

PCA von akkumulierten Daten in Score-Plots und Loadings. Basale Lipide zum Zeitpunkt 0 h und 24. Verwendetes Plasmagerät: APCIII. A: Sechs Score-Plots der Proben 023, 027, 028. Obere Reihe: Zeitpunkt 0 h, untere: Zeitpunkt 24 h; grau = unbehandelt, schwarz = behandelt. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: 028, 027, 023.



Anhang 7.1: Ergebnisse für den Gerätevergleich auf Basis der DNA.

Ergebnis der PCA von akkumulierten Daten in Score-Plots und Loadings. Verwendete Plasmagerät: kINPen® und APCIII nach jeweils fünfminütiger Behandlung; A: Vier Score-Plots; gelb = kINPen®, blau = APCIII. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: superficial 0 h, superficial 24 h, basal 0 h, basal 24 h.



Anhang 7.2: Ergebnisse für den Gerätevergleich auf Basis der Lipide.

Ergebnis der PCA von akkumulierten Daten in Score-Plots und Loadings. Verwendete Plasmagerät: kINPen® und APCIII nach jeweils fünfminütiger Behandlung; A: Vier Score-Plots; gelb = kINPen®, blau = APCIII. B: Loadings. PC entspricht Y-Achsen aus A. Von oben nach unten: superficial 0 h, superficial 24 h, basal 0 h, basal 24 h.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der AG Schenke-Layland der Universitätsfrauenklinik Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Katja Schenke-Layland durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Martin Weiss [Betreuer], Daniel Carvajal Berrio [Laborbetreuer] und Prof. Dr. Katja Schenke-Layland [Doktor-Mutter].

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder [Daniel Carvajal Berrio, Dr. Martin Weiss, Eva-Maria Brauchle und Simone Liebscher] von mir eigenständig durchgeführt. Die Russell-Movat-Pentachromfärbung wurde von Daniel Carvajal Berrio und Simone Liebscher durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Rücksprache mit Eva-Maria Brauchle durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Thomas Wenzel

8 Veröffentlichungen

- Wenzel, T. et al. (2019) 'Molecular Effects and Tissue Penetration Depth of Physical Plasma in Human Mucosa Analyzed by Contact- and Marker-Independent Raman Microspectroscopy', ACS Applied Materials & Interfaces. American Chemical Society, p. acsami.9b13221. doi: 10.1021/acsami.9b13221.
- Wenzel et al. (2020) 'Trans-Mucosal Efficacy of Non-Thermal Plasma Treatment on Cervical Cancer Tissue and Human Cervix Uteri by a Next Generation Electrosurgical Argon Plasma Device', Cancers. MDPI AG, 12(2), p. 267. doi: 10.3390/cancers12020267.

9 Danksagung

Ich bedanke mich bei Allen, die mich während meiner Laborzeit begleitet haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonderer Dank gilt dabei der AG Schenke-Layland, die mir diese Arbeit ermöglichten und mich bestmöglich unterstützten. Außerdem danke ich meinem Betreuer Martin Weiss ausdrücklich für die gute Zeit.

