

Aus der Abteilung für Zahnerhaltung und Präventivmedizin  
des CharitéCentrum 3 für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der vierte Aggregatzustand in der Zahnmedizin: Nutzung von  
Unterschieden in der Reaktion von Prokaryota und  
eukaryotischen Zellen auf Plasma zur Kariestherapie

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Philipp Pierdzioch

aus Berlin

Datum der Promotion: 25.6.17

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abstrakt</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Einführung</b> .....	<b>4</b>
2.1	Grundlagen des Plasmas.....	4
2.1.1	Physikalische Grundlagen.....	4
2.1.2	Wirkung auf Prokaryota.....	6
2.1.3	Wirkung auf eukaryotische Zellen.....	6
2.1.4	Grundlegende Unterschiede.....	7
2.2	Kariesentstehung.....	7
2.3	Therapie der Karies und Restaurationsspirale.....	8
2.4	Einflussfaktor Parodontitis.....	8
2.5	Zielsetzung.....	9
<b>3</b>	<b>Methodik</b> .....	<b>9</b>
3.1	Proben bakteriell besiedelten Dentins.....	9
3.1.1	Ex vivo Ansatz.....	9
3.1.2	In vitro Ansatz.....	10
3.2	Proben bakteriell besiedelter Wurzelkanäle.....	10
3.3	Proben bakteriell besiedelter Implantate.....	11
3.4	Statistische Auswertung.....	12
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>13</b>
4.1	Proben bakteriell besiedelten Dentins.....	13
4.1.1	Ex vivo Ansatz.....	13
4.1.2	In vitro Ansatz.....	13
4.2	Proben bakteriell besiedelter Wurzelkanäle.....	14
4.3	Proben bakteriell besiedelter Implantate.....	15
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>16</b>
5.1	Bewertung der Ergebnisse.....	16
5.2	Limitationen.....	19
5.3	Schlussfolgerungen.....	20
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>21</b>
<b>7</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung einschließlich Anteilserklärung</b> .....	<b>23</b>
<b>8</b>	<b>Druckexemplare der ausgewählten Publikationen</b> .....	<b>26</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>47</b>
<b>10</b>	<b>Komplette Publikationsliste</b> .....	<b>48</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>49</b>

### 1 Abstrakt

Beim Plasma, das auch als 4. Aggregatzustand bezeichnet wird, handelt es sich um ein teilweise oder vollständig ionisiertes Gas, das durch seine elektrische Leitfähigkeit einige spezifische Eigenschaften besitzt und im medizinischen Bereich als kaltes und heißes Plasma zum Einsatz kommen kann. Nicht abschließend erforscht ist, ob kaltes Plasma, bedingt durch seine antimikrobielle Wirkung, kariöse Prozesse arretieren kann und seine Anwendung prophylaktisch indiziert sein könnte.

Dies stellte den Gegenstand der durchgeführten Untersuchungen dar. In diesem Zusammenhang wurden auch der antimikrobielle Effekt in Wurzelkanälen und auf Implantatoberflächen untersucht, da eine voranschreitende Karies eine endodontische Therapie erforderlich machen und nach Zahnverlust die Implantatversorgung mit dazugehörigen Problemen in den Fokus der Therapie gelangen kann. Hierzu erfolgte eine Plasmabehandlung von zuvor mit Bakterien inkubierten Proben (Wurzeloberflächen, Wurzelkanäle, Implantate). Zudem wurden in einem ex vivo Versuch kariöse Läsionen frisch extrahierter Zähne mit kaltem Plasma (CP) behandelt. Auf kariösen Dentinoberflächen zeigte die Kombination von CHX + CP mit 2,67 log CFU/ml gegenüber der CHX Gruppe mit 4,45 log CFU/ml ein signifikant besseres Ergebnis. Weiterhin führte die adjuvante Applikation von Plasma zum scaling und root planing (SRP) auf infizierten Dentinoberflächen zu einem signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (K) (SRP +CP: 0 log CFU/ml, Kontrolle: Median von 3,85 log CFU/ml). In Wurzelkanälen wurden Reduktionsfaktoren (RF) für CHX + CP von 3,56 log RF ( $p < 0,01$ ), CP von 3,27 log RF ( $p < 0,01$ ) und CHX von 2,66 log RF ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielt. Zudem zeigten sich signifikante Unterschiede auf Implantaten im Vergleich zu Laseranwendung (DL) (K= 4,59 log CFU/ml, DL= 4 log CFU/ml, CP60= 2,38 log CFU/ml und CP120= 2,66 log CFU/ml).

Die Nutzung von Plasma zur Kariestherapie erscheint, ausgehend von der geringeren Resistenz von Prokaryota im Vergleich zu eukaryotischen Zellen, vielversprechend, jedoch müssen weitere klinische Studien durchgeführt werden, um zu überprüfen, inwieweit die hier größtenteils in vitro erlangten Ergebnisse, auch unter Mundhöhlenbedingungen Gültigkeit besitzen.

### English version

Plasma, also known as the 4th state of matter, is a partially or completely ionized gas. Through its electrical conductivity it has a few specific characteristics and is used as cold or warm plasma in medical fields. It's not completely researched if cold plasma, due to its antimicrobial effect, is able to inactive carious processes and application could be indicated prophylactically. This has been part of the present investigations.

In this context antimicrobial effect in root canals and on implant surfaces was investigated as a progressing caries may require root canal treatment. After tooth loss implant restoration could be a therapy option. For this purpose, bacterial incubated samples (root surface, root canals, implants) were treated with cold plasma (CP). Furthermore, in an ex vivo approach freshly extracted teeth with carious lesions were treated with plasma. On carious dentin surfaces combination of CHX + CP (2,67 log CFU/ml) showed significant better results compared to CHX group (4,45 log CFU/ml). Moreover, plasma adjuvantly used to scaling and root planning (SRP) on infected dentin surfaces led to a significant difference compared to the control (K) (median SRP+CP: 0 log CFU/ml, control: 3,85 log CFU/ml). In root canals reduction factors (RF) of 3,56 log RF ( $p < 0,01$ ) for CHX + CP, 3,27 log RF ( $p < 0,01$ ) for CP and 2,66 log RF ( $p < 0,01$ ) for CHX were observed. Also, significant differences on implant surfaces compared to laser usage (DL) were determined (K= 4,59 log CFU/ml, DL= 4 log CFU/ml, CP60= 2,38 log CFU/ml and CP120= 2,66 log CFU/ml). The usage of plasma for caries therapy seems promising, based on the lower resistance of prokaryotes compared to eukaryotic cells. However, further clinical studies are needed to examine obtained results validity under oral cavity conditions.

## 2 Einführung

### 2.1 Grundlagen des Plasmas

#### 2.1.1 Physikalische Grundlagen

Neben den drei klassischen Aggregatzuständen fest, flüssig und gasförmig wird Plasma auch als vierter Aggregatzustand beschrieben. Unter Plasma ist ein ganz oder teilweise ionisiertes Gas zu verstehen, welches aufgrund seiner elektrischen Leitfähigkeit spezifische Eigenschaften zeigt (1).

Plasma entsteht, wenn einem Gas zusätzliche Energie z.B. in Form von Wärme oder starken elektrischen bzw. elektromagnetischen Feldern zugeführt wird, mit der Folge,

dass es zu einer Ionisation der Teilchen und der Herauslösung von Elektronen aus Atomen oder Molekülen kommt. Es entstehen frei bewegliche Elektronen und ionisierte Atome (2).

Auf Grund der annähernd gleichen Anzahl negativer und positiver Ladungsträger ist Plasma als elektrisch neutral einzustufen (Quasineutralität) (3).

Die Plasmaerzeugung beruht u.a. auf dem Prinzip von Gasentladungen. Werden nun bestimmte Spannungen angelegt, können nach *Roth* (4) unterschiedliche Formen der Entladung des Gases auftreten.

Zur grundsätzlichen Differenzierung von Plasmen lassen sich unterschiedliche Parameter heranziehen, wie den bestehenden Gasdruck, die Gasdichte, die Temperatur und die Form des Entstehens (3). Wichtig für das weitere Verständnis ist allerdings die Unterscheidung in thermische und nichtthermische Plasmaquellen, wobei in der plasmamedizinischen Literatur insbesondere die nichtthermischen kalten Plasmen von besonderem Interesse sind (2).

Während thermische Plasmen, welche zur Gewebeentfernung oder Kauterisation verwendet werden (3, 5), durch sehr hohe Temperaturen der Elektronen und schweren Partikel (Ionen und Neutralteilchen) gekennzeichnet sind, lassen sich nichtthermische Plasmen dadurch charakterisieren, dass Energie gezielt nur Elektronen zugeführt wird und schwere Gasteilchen annähernd Raumtemperatur besitzen. Die erhöhten Temperaturen der Elektronen beeinflussen dabei nicht die geringe Gesamttemperatur des Plasmas insgesamt (5).

Der Plasmaerzeugung liegen unterschiedliche Wirkungskonzeptionen zugrunde, von denen die dielektrische Barriereentladung (DBD) und die Plasmajets am meisten verbreitet sind (6).

Charakteristisch für den ersten Entladungstyp ist, dass mindestens ein Dielektrikum zwischen den zwei Elektroden eingeführt wird. Durch die dielektrische Barriere wird die Aufladung im System begrenzt, weil der Stromfluss eingeschränkt wird. Ladungsträger lagern sich am Dielektrikum ab und bauen ein elektrisches Feld auf, welches dem von außen angelegten Feld entgegengesetzt ist. Hierdurch wird die Spannung herabgesetzt, die Entladung kann nicht mehr aufrechterhalten werden und erlischt (7).

Der Prozess lässt sich nur unter kontinuierlicher Wechselspannung aufrechterhalten. Hierdurch wird verhindert, dass sich ein thermodynamisches Gleichgewicht ausbilden kann und es zu einer Bogenentladung kommt. Kaltes Plasma kann auf diese Weise

ökonomisch und zuverlässig hergestellt werden kann (7).

Für die Durchführung der nachfolgend beschriebenen Versuche wurde das kINPen® MED Gerät der Firma neoplas tools GmbH verwendet. Es handelt sich um ein Atmosphärendruck-Plasmajet, der aus einer zentralen Nadelelektrode besteht, die von einem zylindrisch geformten Hohlraum umgeben ist, der von Argon durchströmt wird. Das Anlegen einer hohen elektrischen Spannung führt zur Erzeugung von Plasma, das bedingt durch die Geometrie des Feldes nach außen transportiert wird und dort antimikrobiell wirken kann. Üblicherweise kommen Gasflussraten zwischen 4-6 slm (Standardliter pro Minute) zum Einsatz (2).

Die Wirkungsweise des kalten Atmosphärenplasmas zeigt jedoch Unterschiede in Abhängigkeit davon, ob Prokaryota oder eukaryotische Zellen behandelt werden. Darauf soll in den folgenden Abschnitten eingegangen werden.

### **2.1.2 Wirkung auf Prokaryota**

Der genaue Wirkungsmechanismus des Plasmas auf Mikroorganismen ist noch nicht vollständig geklärt. *Moisan et al.* (8) äußern folgende Vermutungen hinsichtlich grundlegender Prozesse: Durch UV-Bestrahlung kommt es zu einer direkten Schädigung des genetischen Materials. Zudem tritt eine Erosion der Mikroorganismen auf, die durch zwei Prozesse, die Photodesorption und das Ätzen, ausgelöst wird. Einerseits werden durch UV-Photonen chemische Bindungen in den Mikroorganismen aufgelöst und die Atome können flüchtige Verbindungen bilden. Andererseits werden reaktive Spezies des Plasmas auf die Mikroorganismen adsorbiert und können mit Atomen zu flüchtigen Verbindungen reagieren. *Boudam et al.* (9) beschreiben neben lokalen Schädigungen der Zytoplasmamembran, der Proteine und DNA durch Oxidationsprozesse außerdem die Auswirkung auf die Membran durch die von den geladenen Teilchen des Plasmas erzeugte elektrostatische Kraft, die in der Konsequenz zur Lyse des Mikroorganismus führt.

### **2.1.3 Wirkung auf eukaryotische Zellen**

Der Effekt von kaltem Plasma auf eukaryotische Zellen wurde in einigen Studien untersucht. Dabei konnten differierende Effekte in Abhängigkeit von Applikationszeit und -dosis ermittelt werden (10). Zu dieser Erkenntnis kommen auch *Haertel et al.* (11), die darauf hinweisen, dass eine Dosis-Wirkungs-Beziehung besteht und bei kurzer Applikationszeit bzw. geringer Dosis stimulierende Effekte auf eukaryotische Zellen, bei

langer Applikationszeit bzw. hoher Dosis letale Effekte auftreten. Weitere Studien zeigen, dass nach 1-minütiger bzw. 10-minütiger Behandlung mit Plasma histologisch keine signifikanten Veränderungen des oralen Gewebes festgestellt werden können (12, 13). Zudem wird auf eine dosisabhängige Schädigung der DNA (14) und Veränderungen der Zellphysiologie (15) verwiesen. Als weitere Effekte, die auf unterschiedlichen Ebenen der Zelle wirken, können Schädigungen der Zellmembran über Lipidperoxidation und Veränderungen von Adhäsionsmolekülen der Zelle angesehen werden. Zudem sind reaktive Moleküle in der Lage Proteine zu schädigen. Außerdem können Radikale und UV-Strahlung auch die DNA beeinflussen (11).

### 2.1.4 Grundlegende Unterschiede

Die Selektivität in der Wirkung zwischen Prokaryota und eukaryotischen Zellen lässt sich nach *Dobrynin et al.* (16) und *Liu et al.* (13) wie folgt zusammenfassen:

- Die Zellmembran der Prokaryoten (Polysaccharide) ist gegenüber Peroxidationen anfälliger als die von Eukaryoten (Phospholipide).
- Prokaryota könnten allein schon aufgrund geringer Größe bzw. des kleineren Volumens anfälliger auf Plasma reagieren als eukaryotische Zellen.
- Die Zellen von Säugetieren verfügen über mehr Resistenzmechanismen gegenüber äußerem Stress. Zudem führt die unterschiedliche Stoffwechselrate zu einer Diskrepanz in der Aufnahme vom Plasma produzierter Toxine.
- Prokaryota, die sich vermehren, besitzen im Gegensatz zu statischen eukaryotischen Zellen freiliegende, schädigungsanfällige DNA.
- Die durch das Plasma erzeugten Atome sind nur einige Millisekunden vorhanden und können in dieser Zeit keine Schädigung am normalen Gewebe hervorrufen.

Außerdem können mitotische eukaryotische Zellen vorübergehend ihr Wachstum einstellen, um die DNA vor Schäden durch oxidativen Stress zu schützen (17).

## 2.2 Kariesentstehung

Voraussetzung für die Entstehung von Karies ist zunächst die Bildung eines Biofilms. Hierbei handelt es sich um eine von einer Matrix extrazellulärer polymerer Substanzen eingeschlossene Population von Mikroorganismen, die miteinander interagieren und an einer Oberfläche haften (18). Kommt es nun zur Aufnahme fermentierbarer Kohlenhydrate können bestimmte Bakterien durch das in ihnen enthaltene Enzym der Laktatdehydrogenase aus Pyruvat Milchsäure produzieren, was zu einem raschen Abfall

des pH-Wertes führt und der ATP Gewinnung der Mikroorganismen dient (19). Wird durch die Säureproduktion ein spezieller pH-Wert, der sog. kritische pH-Wert, unterschritten, kommt es zu einer Demineralisation der Zahnhartsubstanz (20). Ein erneutes Überschreiten des Grenzwertes führt zu einer Einlagerung von Mineralien, man spricht von einer Remineralisation. Überwiegen Demineralisationsprozesse bei ungenügender Remineralisation kann sich eine Karies entwickeln.

Während sich die Ätiologie der Wurzelkaries gegenüber der Karies im Schmelz nicht unterscheidet, ergeben sich Besonderheiten hinsichtlich der Pathogenese (21).

### **2.3 Therapie der Karies und Restaurationsspirale**

Um die Entstehung und Progression einer Karies zu verhindern, muss eine Beeinflussung des entstehenden Biofilms, von De- und Remineralisationsprozessen sowie der Ernährung erfolgen.

Viele Studien wurden bereits durchgeführt, die sich mit Möglichkeiten der non-invasiven Therapie kariöser Läsionen beschäftigt haben. Neben der Verwendung von fluoridhaltigen Zahncremes, Mundspüllösungen, Lacken und Gelen (22, 23) wurde die Applikation von CHX zur Arretierung kariöser Prozesse untersucht, wobei auf die Gefahr von Verfärbungen hingewiesen wurde (24, 25). Außerdem konnten Wasserstoffperoxid und Natriumhydrogencarbonat das Wachstum von *S. mutans* verhindern (26). Weiterhin wurde der Effekt von Laser und Ozon betrachtet (27, 28). *Wierichs et al.* (24) zeigen in einem systematischen Review, dass einige der genannten Agenzien die Entstehung und Progression von kariösen Läsionen zwar in gewissem Maße beeinflussen können, weisen jedoch gleichzeitig darauf hin, dass die Anzahl der Studien hierzu begrenzt ist. Daraus folgt, dass non-invasive Therapieansätze unverändert intensiv untersucht werden sollten.

Eine invasive Therapie wird erforderlich, wenn die non-invasiven Alternativen fehlschlagen, mit der Konsequenz, dass eine Restaurationsspirale in Gang gesetzt wird (29): Nach Insertion der 1. kleinen Füllung werden im Laufe des Lebens in geringerer Frequenz weitere Therapiemaßnahmen notwendig. Endodontische Behandlungen können erforderlich werden oder bei Zahnverlust eine prothetische Versorgung mit einem Implantat in Erwägung gezogen werden.

### **2.4 Einflussfaktor Parodontitis**

Eine häufige Ursache der Kariesentstehung, insbesondere bei älteren Personen, stellen



pardontale Erkrankungen dar. Die mit Attachmentverlust assoziierte Entstehung von Rezessionen der Gingiva steht hiermit in engem Zusammenhang (30). Therapeutische Schwierigkeiten bereiten häufig verbleibende Bakterien auf schwer zu erreichenden Oberflächen, die zusätzliche antimikrobielle Maßnahmen, wie Antibiotikagabe oder Lasertherapie notwendig werden lassen (13).

### **2.5 Zielsetzung**

Gegenstand der durchgeführten Untersuchung war es festzustellen, welche antimikrobielle Wirkung gewebeverträgliches Plasma auf verschiedene Bakterien hat, die auf natürlichen (Wurzelkanal, Wurzeloberfläche) und synthetischen (Implantat) Oberflächen der Mundhöhle lokalisiert sind. Im Vordergrund stand die Beurteilung der speziellen Wirkung bei Anwendung in der Kariestherapie, darüber hinaus sollte zusätzlich auch der Nutzen in angrenzenden Therapiebereichen einbezogen werden, die in Folge einer fortschreitenden Karies entstehen können.

## **3 Methodik**

### **3.1 Proben bakteriell besiedelten Dentins**

#### **3.1.1 Ex vivo Ansatz**

##### **Probenherstellung**

Das Probenmaterial umfasste 25 frisch extrahierte Zähne mit in vivo gereiften Biofilmen, die bis zum Versuchsbeginn in einer Brain Heart Infusion (BHI) gelagert wurden. Es konnten 16 symmetrisch erscheinende, kariöse Läsionen identifiziert werden. Diese wurden in zwei vergleichbar große Teile geschnitten und daraufhin randomisiert einer der unten genannten Versuchsgruppen zugeordnet.

##### **Versuchsablauf und antibakterielle Behandlung**

Die Karies wurde mit sterilen Rosenbohrern jeweils komplett entfernt, nachdem die Proben zunächst - wie nachfolgend dargestellt - behandelt worden waren:

- 1. Kontrollgruppe (CHX):** Die Proben wurden mit 1% CHX Gel für 30 s behandelt. Anschließend erfolgte eine Spülung mit 5 ml NaCl 0,9%.
- 2. CHX + kaltes Plasma (CP):** Die Zähne wurden zusätzlich zur Behandlung - wie in Gruppe 1 - mit CP für 60 s bei einer Flussrate von 4,9 slm bestrahlt.

Die Dentinspäne wurden in BHI überführt, verdünnt und auf Columbia-Agar Platten abgegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden konnten die koloniebildenden Einheiten (CFU) bestimmt werden.

### **3.1.2 In vitro Ansatz**

#### **Probenherstellung**

Nach Auswahl von 24 Oberkieferzähnen mit geraden Wurzeln und Entfernung koronaler und apikaler Anteile, konnten standardisierte Areale von 4 x 5 mm auf jeder Wurzeloberfläche definiert und die gewonnenen Proben randomisiert einer der unten beschriebenen drei Gruppen zugeordnet werden.

#### **Kultivierung und Kolonisierung mit Bakterien**

Es erfolgte die Inkubation der autoklavierten Proben für 48 h in mit *Streptococcus mitis*, angereicherte BHI. Nach 24 h wurden 25% des Nährmediums durch neues ersetzt.

#### **Versuchsablauf und antibakterielle Behandlung**

Folgende drei Gruppen wurden eingeteilt:

- 1. Kontrolle (K):** Die Proben wurden mit 5 ml sterilem NaCl 0,9% für 30 s gespült.
- 2. SRP:** Neben der Spülung gemäß Gruppe 1, wurde ein SRP mit einer geschliffenen Kürette durchgeführt.
- 3. SRP + kaltes Plasma (CP):** Es erfolgte die gleiche Behandlung wie in der 2. Gruppe, zusätzlich wurde CP für 60 s bei 4,9 slm angewendet.

Mit einem sterilen Skalpell konnte Probenmaterial gewonnen und anschließend in BHI aufgefangen werden. Nach Verteilung auf Agarplatten wurde unter anaeroben Bedingungen für 24 h inkubiert und die CFUs ausgezählt. Unter dem Raster-elektronenmikroskop (REM) wurden eine infizierte unbehandelte und eine behandelte Probe betrachtet.

### **3.2 Proben bakteriell besiedelter Wurzelkanäle**

#### **Probenherstellung**

Das Probenmaterial setzte sich aus 32 Unterkieferprämolaren mit rundem Wurzelquerschnitt und geraden Wurzeln zusammen. Es wurde darauf geachtet, dass keine Veränderungen wie Risse, kariöse Läsionen oder Obliterationen vorlagen. Mit einem Gates-Glidden Bohrer Nr. 1 (0,5 mm) fand eine Standardisierung des Kanaldurchmessers statt, nachdem zuvor die Länge der Kanäle auf 8 mm festgelegt worden war.

Die Proben wurden anschließend in eine transparente Einbettmasse eingebracht, um äußere Dentinkanäle zu verschließen, wobei koronaler und apikaler Bereich mit einem Dentinadhäsiv versiegelt wurden.

### **Kultivierung und Kolonisierung mit Bakterien**

BHI wurde mit *Enterococcus faecalis* konzentriert. Vor Autoklavierung wurden die Proben ultraschallaktiviert mit NaOCl 1%, EDTA 17% und Aqua dest. für vier Minuten gespült. Zur Verbesserung des Eindringens von BHI in die Dentintubuli erfolgte ebenfalls eine ultraschallaktivierte Spülung. Die Inkubation für sieben Tage bei 37° C unter anaeroben Bedingungen schloss sich an. 25% des Nährmediums wurden hierbei nach 24 h durch neues ersetzt.

### **Versuchsablauf und antibakterielle Behandlung**

Vier Gruppen wurden eingeteilt. Jede Probe wurde vorab ultraschallaktiviert mit 5 ml steriler NaCl 0,9% gespült und randomisiert einer der folgenden Gruppen zugeordnet:

- 1. Kontrolle (K):** Es wurden keine weiteren Verfahren angewendet.
- 2. CHX:** Ultraschallaktiviert wurde mit 5 ml CHX 2% für 30 s gespült.
- 3. CP:** Die Proben wurden mit kaltem Plasma für 60 s bei 4,8 slm behandelt.
- 4. CHX + CP:** Nach ultraschallaktivierter Spülung mit 5 ml CHX 2% für 30 s schloss sich eine Plasmaapplikation für 60 s bei 4,8 slm an.

Zur Probenentnahme erfolgte ein Abtrag der Kanalwände

- von 300 µm mit einem Peeso Reamer Nr. 3 (1,1 mm)
- von 500 µm mit einem Peeso Reamer Nr. 5 (1,5 mm)
- von 800 µm mit einem Rosenbohrer 021 (2,1 mm)

Die gewonnenen Späne wurden in BHI eingebracht, verdünnt und abschließend auf Columbia-Agar aufgebracht. Die CFUs wurden nach anaerober Inkubationszeit von 24 h ausgezählt.

## **3.3 Proben bakteriell besiedelter Implantate**

### **Probenmaterial**

Es wurden 32 zweiteilige Titanimplantate mit einer sandgestrahlten, säuregeätzten und hydrophilen, mikro-rauen Oberfläche verwendet.

### **Kultivierung und Kolonisierung mit Bakterien**

Die BHI wurde mit *Streptococcus mitis* konzentriert. Die Implantate wurden in der Bakteriensuspension unter anaeroben Bedingungen für 84 h gelagert.

### **Versuchsablauf und antibakterielle Behandlung**

Es wurden vier Gruppen eingeteilt. Um eine ständige Rotation und Bewegung zu gewährleisten, wurden die Implantate in ein Insertionsinstrument eingefügt und in ein Handstück gesteckt, das an einer verstellbaren Werkbank befestigt war.

Folgendermaßen wurde vorgegangen:

- 1. Negative Kontrolle (K):** Spülung mit 5 ml NaCl 1%, 60 s, 60 rpm (rounds per minute), Vorschub 0,22 mm/s
- 2. Diodenlaser (DL):** Behandlung der Implantate mit einem DL für 60 s, 60 rpm, Vorschub 0,22 mm/s
- 3. Kaltes Plasma (CP60):** Applikation von kaltem Plasma für 60 s bei 4,3 slm, 60 rpm, Vorschub 0,22 mm/s
- 4. Kaltes Plasma (CP120):** Applikation von kaltem Plasma für 120 s bei 4,3 slm, 60 rpm, Vorschub 0,11 mm/s

Zur Probengewinnung wurde wie folgt verfahren:

Nach Inkubation in 1 ml BHI fand eine direkte Beschallung für 60 s statt. Anschließend wurde die Oberfläche des Implantats mit einer Bürste abgestrichen, der Bürstenkopf entfernt und in 2 ml BHI, das Implantat in 1ml BHI eingebracht. Beide wurden in einem Ultraschallbad für 60 s indirekt beschallt. Die Bakteriensuspension wurde auf Agarplatten aufgebracht und bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Die Auszählung der CFUs erfolgte nach 24 h.

Zusätzlich fanden Untersuchungen behandelter Proben unter Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskop statt. Ein inkubierter zersägter Teil der Implantatspitze wurde unter einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop betrachtet. Zur Identifikation der Bakterien erfolgte eine Gram-Färbung sowie die Verwendung eines biochemischen Identifikationssystems.

### **3.4 Statistische Auswertung**

Zur Bestimmung der Reduktionsfaktoren (RF) wurden die ermittelten Werte logarithmiert

und anhand folgender Formel bestimmt:

$$\log RF = \log (\text{Kontrolle}) - \log (\text{Desinfektionsmethode}) \quad (31)$$

Für die Ansätze wurden unter Verwendung der SPSS Statistics 21.0 Software Kruskal-Wallis Test und Mann-Whitney-U Test durchgeführt und p-Werte unter 0,05 als signifikant angesehen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Proben bakteriell besiedelten Dentins

#### 4.1.1 Ex vivo Ansatz

Es zeigte sich, dass die zusätzliche Anwendung von Plasma zum CHX mit 2,67 log CFU/ml im Durchschnitt zu einem signifikant besseren Ergebnis führte als die alleinige CHX Applikation mit 4,45 log CFU/ml ( $p=0,002$ , Mann-Whitney-U Test). Bis auf die Proben drei, sechs und acht wurden in der Kontrollgruppe höhere Werte ermittelt als in der Plasmagruppe. Während bei 10 der 16 Proben aus der CHX + CP Gruppe eine Reduktion von mindestens einer logarithmischen Stufe im Vergleich zur Kontrolle erzielt werden konnte, war bei fünf dieser Proben sogar eine Reduktion um mehr als zwei logarithmische Stufen erkennbar und keine CFUs auf den Agarplatten mehr nachweisbar (s. Abb. 1).

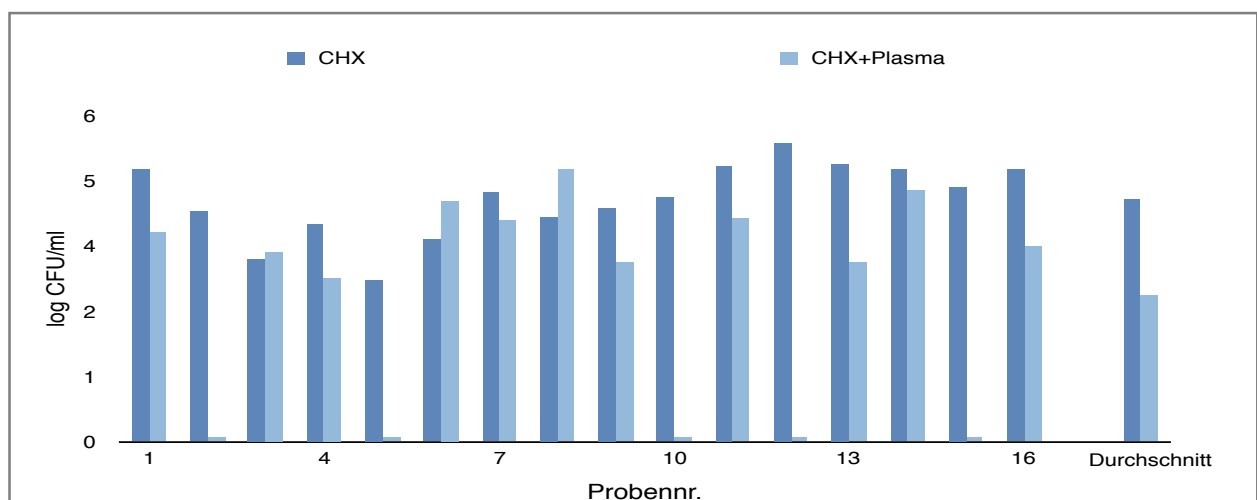


Abb. 1: ermittelte log CFU/ml der CHX und CHX + Plasma Gruppe

#### 4.1.2 In vitro Ansatz

Die Begutachtung unter dem REM ergab bei der unbehandelten Probe die Besiedlung

der Oberfläche mit einem dichten Biofilm. Nach erfolgtem SRP und Spülung mit Wasserstoffperoxid konnten verbleibende Mikroorganismen in Rillen und kleinen Nischen nachgewiesen werden.

Es ließ sich eine schrittweise Reduktion der Zahl der verbleibenden Mikroorganismen beobachten: ausgehend von der Kontrollgruppe mit einem Median von 3,85 log CFU/ml über die SRP Gruppe, die eine signifikante Reduktion auf 2,98 CFU/ml ( $p=0,002$ , Mann-Whitney-U Test) zeigte, bis hin zur CP Gruppe, die sogar eine hoch signifikante Reduktion auf 0 log CFU/ml ( $p=0,000$ ) aufwies. Die sich hieraus ergebenden Reduktionsfaktoren (RF) lauteten für die SRP Gruppe 0,87 log RF und 3,85 log RF für die CP Gruppe. Entsprechende Werte sind in Abb. 2 ersichtlich.

Eine vollständige Elimination auf 0 CFUs konnte in sechs der acht Proben bei Plasmaanwendung ermittelt werden. Bei zwei Proben der letzten Gruppe verblieben jeweils 20 CFUs. Die Durchführung des SRP konnte bei fünf Proben eine Reduktion um mindestens eine log Stufe erreichen. Im Mittel führte die Applikation von Plasma zu einer Reduktion um mehr als 3 log Stufen gegenüber der Kontrolle.

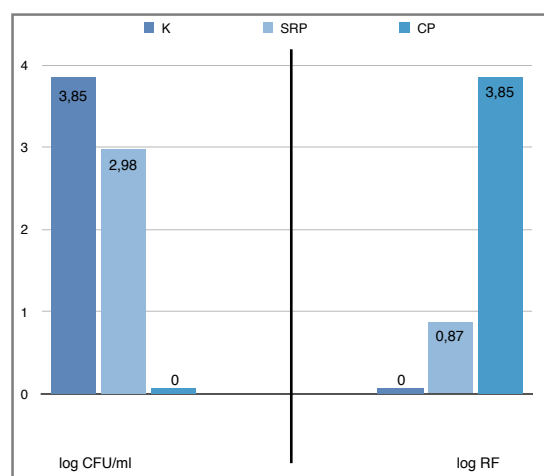


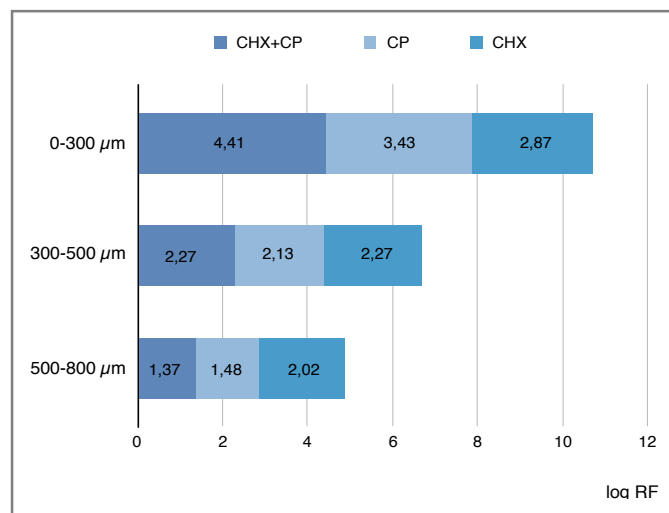
Abb. 2: log CFU/ml der drei Versuchsgruppen mit dazugehörigen Reduktionsfaktoren

### 4.2 Proben bakteriell besiedelter Wurzelkanäle

Bei der schichtenunabhängigen Betrachtung zeigte sich, dass in allen Desinfektionsgruppen signifikant weniger Bakterien nachweisbar waren als in der Kontrollgruppe ( $p<0,01$ , Mann-Whitney-U Test). Weiterhin konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der weniger effektiven CHX und der CHX + CP Behandlung ermittelt werden. Alle anderen Gruppen zeigten beim Vergleich untereinander keinen signifikanten Unter-

schied. Der Median in der Kontrollgruppe betrug 6,82 log CFU/ml, in der CP Gruppe 3,55 log CFU/ml, in der CHX Gruppe 4,16 log CFU/ml und bei der CHX + CP Behandlung 3,26 log CFU/ml. Ausgedrückt in RF resultierten Werte für CHX + CP von 3,56 log RF ( $p < 0,01$ ), CP von 3,27 log RF ( $p < 0,01$ ), CHX von 2,66 log RF ( $p < 0,01$ ).

In der detaillierten Betrachtung innerhalb der verschiedenen Schichten wurde eine absteigende Effektivität der Desinfektionswirkung in allen Gruppen ausgehend von der oberflächlichen Schicht bis in die tiefste Schicht von 500-800  $\mu\text{m}$  beobachtet. Während CHX + CP in der oberflächlichen Schicht (0-300  $\mu\text{m}$ ) den signifikant höchsten log RF mit 4,41 im Vergleich zu den anderen Gruppen aufwies ( $p < 0,01$ ), zeigte CHX in 500-800  $\mu\text{m}$  mit 2,02 log RF den besten Effekt. In einer Tiefe von 300-500  $\mu\text{m}$  ließ sich eine ähnlich gute Effektivität bei CHX + CP und CHX Anwendung beobachten. In 0-300  $\mu\text{m}$  war die Wirkung bei alleiniger CHX Applikation am geringsten, in 500-800  $\mu\text{m}$  wiesen CHX + CP das schlechteste Ergebnis auf (s. Abb. 3).



**Abb. 3: Logarithmische Reduktionsfaktoren der Desinfektionsmethoden in verschiedenen Tiefen des Dentins. (CP: kaltes Plasma)**

### 4.3 Proben bakteriell besiedelter Implantate

Eine vollständige Abtötung von Bakterien konnte bei keiner Methode der Desinfektion erzielt werden. Die Anwendung von Plasma führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu signifikant geringeren CFU Werten ( $p = 0,012$  und  $p = 0,024$ ), wobei der Vergleich der Plasmagruppen eine Unabhängigkeit des antimikrobiellen Effekts von der Behandlungszeit zeigte ( $p = 0,958$ ).

Die Behandlung gemäß den einzelnen Gruppen führte zu logarithmischen Mittelwerten

von  $K=4,59 \log \text{CFU/ml}$ ,  $DL= 4,0 \log \text{CFU/ml}$ ,  $CP60= 2,38 \log \text{CFU/ml}$  und  $CP120= 2,66 \log \text{CFU/ml}$ . Diese sind mit den dazugehörigen Reduktionsfaktoren in Abb. 4 dargestellt. Die Laseranwendung zeigte gegenüber der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,674$ ).

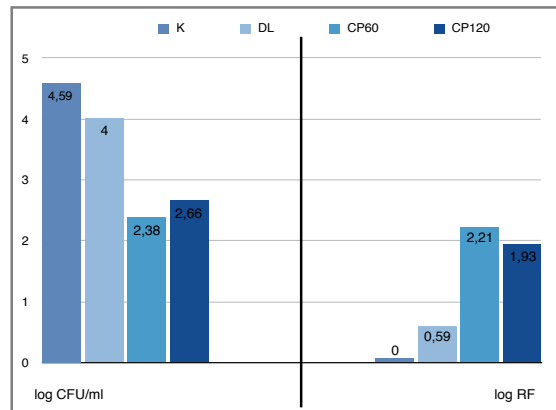


Abb. 4: log CFU/ml der vier Versuchsgruppen mit dazugehörigen Reduktionsfaktoren

In der Fluoreszenzmikroskopie konnten auf dem Implantat der Kontrollgruppe überwiegend grün fluoreszierende Regionen beobachtet werden, die auf vitale Bakterien hindeuten. Demgegenüber stehen rote Areale, wie auf den zuvor antimikrobiell behandelten Implantaten ermittelt, für abgetötete Mikroorganismen. In beiden CP Gruppen war der Anteil höher als in der DL Gruppe. Zwischen den einzelnen CP Gruppen zeigte sich kein nennenswerter Unterschied. Im REM waren beim inkubierten Implantat runde und oval geformte Strukturen auf der Oberfläche zu erkennen. Auf der sterilen Implantatoberfläche zeigte sich keine Bakterienkolonisierung.

## 5 Diskussion

### 5.1 Bewertung der Ergebnisse

Ziel der durchgeführten Untersuchungen war es, die Effizienz der antimikrobiellen Wirkung des Plasmas beurteilen zu können. Grundsätzlich konnten in allen Teilbereichen vielversprechende Ergebnisse erzielt werden.

Auf kariösen Läsionen führte die zusätzliche Applikation von Plasma im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikanten Effektivitätssteigerung, allerdings verbunden mit einer deutlichen Variabilität zwischen den einzelnen Proben. In fünf mit Plasma behandelten Proben ließen sich keine Bakterien mehr nachweisen, in fünf weiteren zeigten sich Werte über  $4 \log \text{CFU/ml}$ . Die unterschiedlichen Ergebnisse dürften sich auf



Form und Größe der kariösen Läsionen zurückführen lassen. Demzufolge dürfte auch die Anzahl der besiedelnden Bakterien deutlich differiert haben. Zudem ist die Wirkung des Plasmas in tieferen Läsionen bedingt durch Veränderungen des Dentin-Pulpa Komplexes im Zuge einer Karies (32) möglicherweise verringert.

Ein unterschiedliches Spektrum an Mikroorganismen bei den verschiedenen Proben lässt sich allerdings nicht ausschließen. Die von *Klämpfl et al.* (33) beschriebene gewisse Variabilität des Plasmas bei der Inaktivierungswirkung verschiedener Bakterien könnte demnach ebenfalls zu Abweichungen beigetragen haben.

Die Inkubationsbedingungen des Versuchsteils führten zu einer positiven Selektion schnell wachsender, anaerober Bakterien. Demzufolge dürfte eine gute Übertragbarkeit auf *Streptococcus mutans* und *Lactobacillus azidophiles* bestehen. Der Effekt des Plasmas auf *S. mutans*, einem wichtigen Leitkeim der Karies, konnte bereits in anderen Studien nachgewiesen werden (34, 35).

Ausgehend von der ökologischen Plaquehypothese (36) ist jedoch in Frage zu stellen, ob eine alleinige Beeinflussung der Bakterienzahl durch Plasmabehandlung therapeutisch vielversprechend ist. Nach Inaktivierung der kariogenen Bakterien könnte es schnell zu einer Wiederbesiedlung der Oberflächen durch im Speichel enthaltene azidogene und azidurische Spezies kommen. *Baysan und Lynch* stellen zwar die Hypothese auf, dass eine initiale Herabsetzung der Bakterienzahl dazu führen würde, dass eine Rekolonisierung durch Resistenz der oralen residenten Flora verhindert wird (27), jedoch müssen weitere Untersuchungen diese Auffassung erst noch abschließend bestätigen. So könnte eine Kombinationsbehandlung mit einem Adhäsivsystem zur Versiegelung der Oberfläche ein erneutes Eindringen von Bakterien in die Tiefe möglicherweise verhindern.

Die Möglichkeit der Verwendung von Adhäsivsystemen zur Arretierung der Progression von kariösen Läsionen wurde in vielen Studien bereits untersucht (37, 38). Des Weiteren wurden Adhäsive mit antimikrobiellem Effekt entwickelt (39) sowie die Fähigkeit zur Verringerung der Biofilmbildung beschrieben (40). Es zeigte sich jedoch, dass eine Langzeitprävention für die Demineralisation nicht erzielt werden konnte (30). *Zhang et al.* (41) haben vor kurzem die Entwicklung eines vielversprechenden multifunktionalen Adhäsivs beschrieben, die allerdings durch weitergehende Untersuchungen verifiziert werden müsste.

Zudem machten *Sladek et al.* (42) schon vor Jahren den Vorschlag, Plasma zur Therapie von Karies einzusetzen. Dabei untersuchten sie ob es zu einer Schädigung der Pulpa durch Temperaturerhöhung kommt, was jedoch nicht bestätigt werden konnte.

Ergibt sich die Indikation zu invasiven Interventionen der kariösen Läsionen, besitzt die Plasmaanwendung den Vorteil der Verbesserung des Haftverbundes von Restaurationmaterialien: Grundlage hierfür stellt die Fähigkeit des Plasmas dar, nach anschließendem Rewetting, Dentinkanäle zu öffnen und dadurch eine verbesserte Penetration des Adhäsivsystems zu ermöglichen (43). In der Konsequenz entsteht eine dickere Hybridschicht. Weiterhin werden zahlreichere und tieferreichende Zapfen des penetrierten Kunststoffes beschrieben (44), die auf einer erhöhten Benetzbarkeit des Dentins nach Plasmaanwendung beruhen (45). Diese könnte nicht nur im Rahmen der Füllungstherapie genutzt werden, sondern auch bei der Befestigung keramischer Restaurationen hilfreich sein (46).

Im *in vitro* Ansatz des bakteriell besiedelten Dentins konnte durch das SRP eine signifikante Bakterienreduktion im Vergleich zur Kontrolle erreicht werden, während das Plasma sogar zu einer hoch signifikanten Reduktion führte. Bei einem großen Teil der Proben dieser Gruppe war kein Bakterienwachstum nachweisbar.

Es lässt sich bei kritischer Betrachtung anmerken, dass sich die Anzahl verbleibender Bakterien möglicherweise lediglich unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Quantifizierungsmethode befand und demnach die Wirkung des Plasmas überschätzt werden könnte.

Der alleinige antimikrobielle Effekt des Plasmas wurde in diesem Versuchsteil nicht untersucht. Es wird davon ausgegangen, dass eine initiale mechanische Entfernung des Biofilms unumgänglich ist, bevor adjuvant Plasma zur Abtötung noch verbleibender Mikroorganismen eingesetzt werden kann.

Zudem zeigte sich, dass es bei Applikation von Plasma *in vitro* zur einer verbesserten Migration und Proliferation von Osteoblasten kommt (47), was sich positiv auf die Gewebeheilung auswirken könnte.

Weiterhin wurde beobachtet, dass eine Parodontaltherapie dazu führen kann, dass es zu einem Anstieg von kariogenen Bakterien kommt (48, 49) und in der Folge das Risiko einer Progression bzw. Entstehung einer Karies erhöht ist. Diese enge Assoziation führt zur Annahme, dass eine adjuvante Applikation des Plasmas zur Elimination von kariogenen Bakterien möglicherweise den Therapieerfolg verbessern könnte.

Die Plasmaapplikation in der Endodontie scheint adjuvant zur gängigen Anwendung von Spüllösungen wie CHX eine positive Beeinflussung in der Desinfektionswirkung herbeizuführen: In der Gesamtbetrachtung der Schichten führte die Kombination aus CHX + CP zum besten Ergebnis. Bis in Tiefen von 800 µm konnte ein Desinfektionseffekt des Plasmas ermittelt werden, wobei in der CHX Gruppe in der tiefsten Schicht am wenigsten Bakterien verblieben.

Die Tiefenwirkung des Plasmas könnte zudem auch hinsichtlich der Kariestherapie interessant sein, da bei der Entstehung von Wurzelkaries des Dentins Bakterien ebenfalls in freiliegende Dentintubuli einwandern und bei Persistenz die Entwicklung einer Karies verschärfen können (50).

Die Tatsache, dass in der oberflächlichen, am stärksten kontaminierten Schicht, mit CP + CHX bzw. nachfolgend CP die höchste Reduktion von Bakterien erzielt werden konnte, lässt zudem vermuten, dass insbesondere bei initialen, nicht tiefreichenden Läsionen der Wurzeloberfläche durch das Plasma eine effektive Bakterienreduktion herbeigeführt werden könnte. Eine direkte Übertragung fällt jedoch bedingt durch die stattfindenden Strukturveränderungen des Dentins im Zuge des Kariesprozesses schwer (32).

Abschließend zeigte sich eine signifikante Reduktion der CFUs bei Behandlung von Implantatoberflächen im Vergleich zur negativen Kontrollgruppe. Die Vermutung, dass eine Verdopplung der Applikationszeit eine deutliche Steigerung im antimikrobiellen Effekt erzielen würde, konnte jedoch nicht bestätigt werden.

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse bleibt offen, inwieweit eine ähnliche Wirkung auch in vivo erzielt werden kann, da der Zugang zur Implantatoberfläche eingeschränkt sein dürfte. Weiterhin waren verbleibende Bakterien bei jeder Desinfektionsmethode nachweisbar.

### **5.2 Limitationen**

Hinsichtlich der Bewertung der Ergebnisse ist auf gewisse Limitationen bezüglich der durchgeführten Methodik hinzuweisen:

Kariöse Läsionen waren nicht standardisiert, was bei weiterführenden Studien beachtet werden sollte. Zusätzlich erscheint es sinnvoll eine negative Kontrollgruppe einzuführen, die im vorliegenden Versuchsteil fehlte.

Zu den infizierten, nicht kariösen Läsionen ist anzumerken, dass eine direkte Übertragung in die in vivo Situation nur eingeschränkt möglich ist, da Proben lediglich mit einer Bakterienspezies inkubiert wurden. Für weitere Untersuchungen würde sich

anbieten, auf verschiedene Bakterienspezies zurückzugreifen, um die Bedingungen der Mundhöhle realistischer abzubilden. Weiterhin könnten in vivo gereifte Biofilme frisch extrahierter Zähne genutzt werden.

Weitere Limitationen ergeben sich bei der Übertragbarkeit der Untersuchungsergebnisse in den Wurzelkanälen auf die in vivo Situation. Die Kanäle wurden vor Inkubation auf 0,5 mm standardisiert und mit EDTA gespült, was ein erleichtertes Eindringen von CHX ermöglichte. Die Wirkung könnte in vivo unter Umständen auf Grund der suboptimalen Bedingungen verringert sein, wobei das Plasma auch bei kleineren Kanälen ähnlich effektiv sein dürfte

### **5.3 Schlussfolgerungen**

Unter Berücksichtigung der Limitationen lassen sich zusammenfassend folgende Aussagen festhalten:

Die Nutzung von kaltem Plasma zur Therapie der Karies stellt - aufgrund der nachgewiesenen antimikrobiellen Effekte auf kariösen Läsionen - einen aussichtsreichen Therapieansatz dar. Allerdings sollten weitergehende Studien diese Ergebnisse verifizieren. Die Applikation auf kariösen Läsionen erscheint vor allem bei solchen Patienten sinnvoll, bei denen alternative Therapieansätze aufgrund bestehender Risikofaktoren nur eingeschränkt möglich sind.

Neben einer Bakterienelimination durch das Plasma sollte eine Kombination mit einer abschließenden Versiegelung der Oberfläche mit einem Adhäsivsystem erfolgen, um ein erneutes Eindringen von Bakterien in die Dentintubuli zu verhindern.

Überdies lässt sich das Potential des Plasmas in der Parodontaltherapie adjuvant zum mechanischen Debridement erkennen. Die Anwendung von CP auf Implantaten führte ebenfalls zu vielversprechenden Resultaten, wenngleich weitere antimikrobielle Maßnahmen ergänzend notwendig erscheinen, weil eine Desinfektionsqualität nicht erreicht werden konnte.

Abschließend scheint auch eine Anwendung im Rahmen der endodontischen Behandlung sinnvoll.

Grundsätzlich sollte schon im frühen Stadium der Karies non-invasiv interveniert werden, um das Auslösen und Voranschreiten der oben beschriebenen Restaurationsspirale zu unterbinden.

### 6 Literaturverzeichnis

1. Bárdos L, Baránková H. Cold atmospheric plasma: Sources, processes, and applications. *Thin Solid Films*. 2010;518(23):6705-13.
2. Metelmann HR, von Woedtke T, Weltmann KD. *Plasmamedizin: Kaltplasma in der medizinischen Anwendung*. Springer Verlag Berlin Heidelberg; 2016. p. 4-10, 39.
3. Kim JH, Lee MA, Han GJ, Cho BH. Plasma in dentistry: a review of basic concepts and applications in dentistry. *Acta Odontol Scand*. 2014;72(1):1-12.
4. Roth JR. *Industrial Plasma Engineering: Volume 1: Principles*. Bristol: Institute of Physics Publishing; 1995. p. 148-51.
5. Heinlin J, Isbary G, Stolz W, Morfill G, Landthaler M, Shimizu T, et al. Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011;25(1):1-11.
6. von Woedtke T, Reuter S, Masur K, Weltmann KD. Plasmas for medicine. *Physics Reports*. 2013;530(4):291-320.
7. Baldus S. *Mechanismen der Wechselwirkung einer dielektrischen Barriereentladung und biologischen Systemen [Dissertation]*. Bochum: Ruhr Universität Bochum; 2015. p. 9-14.
8. Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M, Yahia LH. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Int J Pharm*. 2001;226(1-2):1-21.
9. Boudam MK, Moisan M, Saoudi B, Popovici C, Gherardi N, Massines F. Bacterial spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2006;39(16):3494-507.
10. Hoffmann C, Berganza C, Zhang J. Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. *Med Gas Res*. 2013;3(1):21.
11. Haertel B, von Woedtke T, Weltmann KD, Lindequist U. Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing. *Biomolecules & therapeutics*. 2014;22(6):477-90.
12. Delben JA, Zago CE, Tyhovych N, Duarte S, Vergani CE. Effect of Atmospheric-Pressure Cold Plasma on Pathogenic Oral Biofilms and In Vitro Reconstituted Oral Epithelium. *PloS one*. 2016;11(5):e0155427.
13. Liu D, Xiong Z, Du T, Zhou X, Cao Y, Lu X. Bacterial-killing effect of atmospheric pressure non-equilibrium plasma jet and oral mucosa response. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2011;31(6):852-6.
14. Kalghatgi S, Kelly CM, Cerchar E, Torabi B, Alekseev O, Fridman A, et al. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PloS one*. 2011;6(1):e16270.
15. Wende K, Strassenburg S, Haertel B, Harms M, Holtz S, Barton A, et al. Atmospheric pressure plasma jet treatment evokes transient oxidative stress in HaCaT keratinocytes and influences cell physiology. *Cell Biol Int*. 2014;38(4):412-25.
16. Dobrynin D, Fridman G, Friedman G, Fridman A. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New Journal of Physics*. 2009;11(11):115020.
17. Davies KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*. 2000;50(4-5):279-89.
18. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(2):95-108.
19. Cole A, Eastoe J. *Biology of the mouth. Biochemistry and Oral Biology*. 2nd ed. London: Wright; 1988. p. 503-4.
20. ten Cate JM, Larsen MJ, Pearce EIF, Fejerskov O. Chemical interactions between the tooth and oral fluids. In: Fejerskov O, Kidd EAM, editors. *Dental Caries: The Disease and its Clinical Management*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008. p. 218-9.
21. Ekstrand KR, Zero DT, Martignon S, Pitts NB. Lesion activity assessment. *Monogr Oral Sci*. 2009;21:63-90.
22. Brailsford SR, Fiske J, Gilbert S, Clark D, Beighton D. The effects of the combination of chlorhexidine/thymol- and fluoride-containing varnishes on the severity of root caries lesions in frail institutionalised elderly people. *Journal of dentistry*. 2002;30(7-8):319-24.
23. Walls AW, Meurman JH. Approaches to caries prevention and therapy in the elderly. *Adv Dent Res*. 2012;24(2):36-40.
24. Wierichs RJ, Meyer-Lueckel H. Systematic review on noninvasive treatment of root caries lesions. *Journal of dental research*. 2015;94(2):261-71.
25. Supranoto SC, Slot DE, Addy M, Van der Weijden GA. The effect of chlorhexidine dentifrice or gel versus chlorhexidine mouthwash on plaque, gingivitis, bleeding and tooth discoloration: a systematic review. *Int J Dent Hyg*. 2015;13(2):83-92.
26. Silhacek KJ, Taake KR. Sodium bicarbonate and hydrogen peroxide: the effect on the growth of *Streptococcus mutans*. *Journal of dental hygiene : JDH / American Dental Hygienists' Association*. 2005;79(4):7.
27. Baysan A, Lynch E. The use of ozone in dentistry and medicine. Part 2. Ozone and root caries. *Prim Dent Care*. 2006;13(1):37-41.

28. Geraldo-Martins VR, Lepri CP, Faraoni-Romano JJ, Palma-Dibb RG. The combined use of Er,Cr:YSGG laser and fluoride to prevent root dentin demineralization. *J Appl Oral Sci.* 2014;22(5):459-64.
29. Qvist V. Longevity of Restorations – “The Death Spiral”. In: Fejerskov O, Kidd EAM, editors. *Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management.* 2nd ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008. p. 443–56.
30. Gando I, Ariyoshi M, Ikeda M, Sadr A, Nikaido T, Tagami J. Resistance of dentin coating materials against abrasion by toothbrush. *Dent Mater J.* 2013;32(1):68-74.
31. Holler C, Martiny H, Christiansen B, Ruden H, Gundermann KO. The efficacy of low temperature plasma (LTP) sterilization, a new sterilization technique. *Zentralbl Hyg Umweltmed.* 1993;194(4):380-91.
32. Zavgorodniy AV, Rohanizadeh R, Swain MV. Ultrastructure of dentine carious lesions. *Arch Oral Biol.* 2008;53(2):124-32.
33. Klämpfl TG, Isbary G, Shimizu T, Li YF, Zimmermann JL, Stolz W, et al. Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(15):5077-82.
34. Yang B, Chen J, Yu Q, Li H, Lin M, Mustapha A, et al. Oral bacterial deactivation using a low-temperature atmospheric argon plasma brush. *Journal of dentistry.* 2011;39(1):48-56.
35. Rupf S, Lehmann A, Hannig M, Schafer B, Schubert A, Feldmann U, et al. Killing of adherent oral microbes by a non-thermal atmospheric plasma jet. *Journal of medical microbiology.* 2010;59(Pt 2):206-12.
36. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994;8(2):263-71.
37. Tajima K, Nikaido T, Inoue G, Ikeda M, Tagami J. Effects of coating root dentin surfaces with adhesive materials. *Dent Mater J.* 2009;28(5):578-86.
38. Kaneshiro AV, Imazato S, Ebisu S, Tanaka S, Tanaka Y, Sano H. Effects of a self-etching resin coating system to prevent demineralization of root surfaces. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials.* 2008;24(10):1420-7.
39. Kuramoto A, Imazato S, Walls AW, Ebisu S. Inhibition of root caries progression by an antibacterial adhesive. *Journal of dental research.* 2005;84(1):89-93.
40. Daneshmehr L, Matin K, Nikaido T, Tagami J. Effects of root dentin surface coating with all-in-one adhesive materials on biofilm adherence. *Journal of dentistry.* 2008;36(1):33-41.
41. Zhang N, Melo MA, Chen C, Liu J, Weir MD, Bai Y, et al. Development of a multifunctional adhesive system for prevention of root caries and secondary caries. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials.* 2015;31(9):1119-31.
42. Sladek REJ, Stoffels E, Walraven R, Tielbeek PJA, Koolhoven RA. Plasma Treatment of Dental Cavities: A Feasibility Study. *IEEE Transactions on Plasma Science.* 2004;32(4):1540-3.
43. Dong X, Li H, Chen M, Wang Y, Yu Q. Plasma treatment of dentin surfaces for improving self-etching adhesive/dentin interface bonding. *Clin Plasma Med.* 2015;3(1):10-6.
44. Han GJ, Kim JH, Chung SN, Chun BH, Kim CK, Seo DG, et al. Effects of non-thermal atmospheric pressure pulsed plasma on the adhesion and durability of resin composite to dentin. *Eur J Oral Sci.* 2014;122(6):417-23.
45. Chen M, Zhang Y, Sky Driver M, Caruso AN, Yu Q, Wang Y. Surface modification of several dental substrates by non-thermal, atmospheric plasma brush. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials.* 2013;29(8):871-80.
46. Han GJ, Chung SN, Chun BH, Kim CK, Oh KH, Cho BH. Effect of the applied power of atmospheric pressure plasma on the adhesion of composite resin to dental ceramic. *J Adhes Dent.* 2012;14(5):461-9.
47. Koban I, Duske K, Jablonowski L, Schröder K, Nebe B, Sietmann R, et al. Atmospheric Plasma Enhances Wettability and Osteoblast Spreading on Dentin In Vitro: Proof-of-Principle. *Plasma Processes and Polymers.* 2011;8(10):975-82.
48. De Soete M, Dekeyser C, Pauwels M, Teughels W, van Steenberghe D, Quirynen M. Increase in cariogenic bacteria after initial periodontal therapy. *Journal of dental research.* 2005;84(1):48-53.
49. Quirynen M, Gizani S, Mongardini C, Declerck D, Vinckier F, Van Steenberghe D. The effect of periodontal therapy on the number of cariogenic bacteria in different intra-oral niches. *Journal of clinical periodontology.* 1999;26(5):322-7.
50. Brittan JL, Sprague SV, Macdonald EL, Love RM, Jenkinson HF, West NX. In vivo model for microbial invasion of tooth root dentinal tubules. *J Appl Oral Sci.* 2016;24(2):126-35.

## 7 Eidesstattliche Versicherung einschließlich Anteilserklärung

„Ich, Philipp Pierdzioch, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

### **Der vierte Aggregatzustand in der Zahnmedizin: Nutzung von Unterschieden in der Reaktion von Prokaryota und eukaryotischen Zellen auf Plasma zur Kariestherapie**

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

## **Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen**

Philipp Pierdzioch hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

### **Publikation 1**

Autoren: **Philipp Pierdzioch**, Stefan Hartwig, Sascha R Herbst, Jan Dirk Raguse, Henrik Dommisch, Shady Abu-Sirhan, Henrik C Wirtz, Moritz Hertel, Sebastian Paris, Saskia Preissner

Titel: Cold plasma: a novel approach to treat infected dentin - a combined ex vivo and in vitro study

Zeitschrift: Clinical Oral Investigations (PMID: 26781436)

Erscheinungsjahr: 2016, IF: 2,207

**Beitrag im Einzelnen:** Literaturrecherche, Mitarbeit beim Konzipieren der Zielsetzung, Herstellung der Versuchsprouben, Entwicklung und Durchführung der Versuchsmethodik und der Vorversuche sowie der Hauptversuche, Mitarbeit bei der Auswertung der REM-Aufnahmen, Auswertung der Versuchsergebnisse, Mitarbeit beim Schreiben des Manuskriptes und Erstellung von Grafiken.

### **Publikation 2**

Autoren: Sascha R. Herbst, Moritz Hertel, Husam Ballout, **Philipp Pierdzioch**, Klaus-Dieter Weltmann, Henrik C. Wirtz, Shady Abu-Sirhan, Eckehard Kostka, Sebastian Paris, Saskia Preissner

Titel: Bactericidal Efficacy of Cold Plasma at Different Depths of Infected Root Canals in Vitro

Zeitschrift: The Open Dentistry Journal (PMID: 26962378)

Erscheinungsjahr: 2015, IF: --

**Beitrag im Einzelnen:** Unterstützung bei der Literaturrecherche, Mitarbeit bei der Ausführung der Versuchsabläufe der Vor- und Hauptversuche, Unterstützung bei der Probeninkubation, Mitarbeit bei der Auswertung der Daten, Mitarbeit bei der Erstellung und Finalisierung des Manuskriptes.



### Publikation 3

Autoren: Saskia Preissner, Henrik C. Wirtz, Anne-Kristin Tietz, Shady Abu-Sirhan, Sascha R. Herbst, Stefan Hartwig, **Philipp Pierdzioch**, Andrea Maria Schmidt-Westhausen, Henrik Dommisch, Moritz Hertel

Titel: Bactericidal efficacy of tissue tolerable plasma on microrough titanium dental implants: An in-vitro-study

Zeitschrift: Journal of Biophotonics (PMID:26349849)

Erscheinungsjahr: 2015, IF: 3,818

**Beitrag im Einzelnen:** Literaturrecherche, Unterstützung bei der Probeninkubation, Mitarbeit bei der Durchführung der Vor- und Hauptversuche, bei den Gram-Färbungen, bei den Auswertungen am Konfokalmikroskop, beim Entwerfen und Schreiben des Manuskriptes.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

---

## **8 Druckexemplare der ausgewählten Publikationen**

### **Cold plasma: a novel approach to treat infected dentin - a combined ex vivo and in vitro study**

Philipp Pierdzioch, Stefan Hartwig, Sascha R Herbst, Jan Dirk Raguse, Henrik Dommisch, Shady Abu-Sirhan, Henrik C Wirtz, Moritz Hertel, Sebastian Paris, Saskia Preissner

Clinical Oral Investigations, 2016,

<http://dx.doi.org/10.1007/s00784-016-1723-5>

### **Bactericidal Efficacy of Cold Plasma at Different Depths of Infected Root Canals in Vitro**

Sascha R. Herbst, Moritz Hertel, Husam Ballout, Philipp Pierdzioch, Klaus-Dieter Weltmann, Henrik C. Wirtz, Shady Abu-Sirhan, Eckehard Kostka, Sebastian Paris, Saskia Preissner

The Open Dentistry Journal, 2015, 9, 486-491

<http://dx.doi.org/10.2174/1874210601509010486>

### **Bactericidal efficacy of tissue tolerable plasma on microrough titanium dental implants: An in-vitro-study**

Saskia Preissner, Henrik C. Wirtz, Anne-Kristin Tietz, Shady Abu-Sirhan, Sascha R. Herbst, Stefan Hartwig, Philipp Pierdzioch, Andrea Maria Schmidt-Westhausen, Henrik Dommisch, Moritz Hertel

Journal of Biophotonics, 2015

<http://dx.doi.org/10.1002/jbio.201500189>













































## **9 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **10 Komplette Publikationsliste**

### **Publikation 1**

Philipp Pierdzioch, Stefan Hartwig, Sascha R Herbst, Jan Dirk Raguse, Henrik Dommisch, Shady Abu-Sirhan, Henrik C Wirtz, Moritz Hertel, Sebastian Paris, Saskia Preissner

#### **Cold plasma: a novel approach to treat infected dentin - a combined ex vivo and in vitro study**

Zeitschrift: Clinical Oral Investigations

Erscheinungsjahr: 2016

Impact Factor: 2.207

### **Publikation 2**

Sascha R. Herbst, Moritz Hertel, Husam Ballout, Philipp Pierdzioch, Klaus-Dieter Weltmann, Henrik C. Wirtz, Shady Abu-Sirhan, Eckehard Kostka, Sebastian Paris, Saskia Preissner

#### **Bactericidal Efficacy of Cold Plasma at Different Depths of Infected Root Canals in Vitro**

Zeitschrift: The Open Dentistry Journal

Erscheinungsjahr: 2015

Impact Factor: 0

### **Publikation 3**

Saskia Preissner, Henrik C. Wirtz, Anne-Kristin Tietz, Shady Abu-Sirhan, Sascha R. Herbst, Stefan Hartwig, Philipp Pierdzioch, Andrea Maria Schmidt-Westhausen, Henrik Dommisch, Moritz Hertel

#### **Bactericidal efficacy of tissue tolerable plasma on microrough titanium dental implants: An in-vitro-study**

Zeitschrift: Journal of Biophotonics

Erscheinungsjahr: 2015

Impact Factor: 3.818



## **11 Danksagung**

Zunächst möchte ich mich vor allem bei Frau PD Dr. Saskia Preißner dafür bedanken, dass sie mir es ermöglicht hat an einem sehr interessanten, innovativen Forschungsprojekt teilnehmen zu dürfen. Gleichmaßen aber auch für ihr großes Engagement und fachlich außerordentlich kompetente Unterstützung, verbunden mit der Bereitschaft für Rückfragen und konstruktive Diskussionen jederzeit zur Verfügung zu stehen. Frau PD Dr. Saskia Preißner hat damit maßgeblich zum Gelingen des Forschungsprojektes beigetragen.

Mein Dank gilt aber auch der gesamten Forschungsgruppe. Der gegenseitige Gedankenaustausch und vor allem die freundschaftliche Unterstützung und Motivation sowie die jederzeitigen bereitwilligen Hilfestellungen und Diskussionen haben mir vor allem auch in kritischen Phasen eine wertvolle Hilfestellung bedeutet.

Nicht zuletzt möchte ich auch meiner Familie und meinen Freunden für Ihre Geduld, das mir entgegengebrachte Verständnis und die stets aufmunternden Worte danken, die einen wesentlich Beitrag zur Vollendung dieser Arbeit bedeutet haben.