

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

DISSERTATION

Etablierung neuer Methoden zur Diagnostik und Therapie der
oralen Candidiasis

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Isabell Kastner
aus Luckenwalde

Datum der Promotion: 14.09.2018

Meinen Eltern

Inhalt

1. Zusammenfassung	4
Abstrakt (Deutsche Version)	4
Abstract (English version).....	6
2. Einleitung.....	8
Orale Candidiasis	8
Diagnostik	9
Therapie.....	9
Problemstellung	9
Atemdiagnostik in der Medizin	10
Gewebeverträgliches Kaltplasma	11
Zielstellung.....	11
Diagnostik.....	11
Therapie.....	12
3. Methodik.....	12
<i>in vitro</i> Headspace Analyse	12
Mikrobiologische - Diagnostik	13
<i>ex vivo</i> Atemgasanalyse	14
VOC-Analyse (GC/MS) und Signaturdetektion.....	15
<i>in vivo</i> Plasma-Behandlung	15
Datenauswertung	16
<i>in vitro</i> headspace-Analyse.....	16
<i>ex vivo</i> Atemgasanalyse.....	16
<i>in vivo</i> Plasmabehandlung	17
4. Ergebnisse.....	17
<i>in vitro</i> headspace-Analyse	17
<i>ex vivo</i> Atemgasanalyse	17
VOC-Analyse.....	18
<i>in vivo</i> Plasmabehandlung	18
5. Diskussion.....	19
Diagnostik	19
Therapie.....	20
6. Literaturverzeichnis.....	22
7. Eidesstattliche Versicherung.....	25
8. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	28
9. Lebenslauf	58
10. Komplette Publikationsliste.....	59
11. Danksagung	61

1. Zusammenfassung

Abstrakt (Deutsche Version)

Hintergrund

Die Diagnosestellung der oralen Candidiasis erfordert zeitaufwändige Kulturtests, führt zur Latenz bis zum Therapiebeginn und zieht oft den Einsatz von Breitspektrumantimykotika nach sich. Das Ziel war es, anhand von spezifischen volatilen organischen Verbindungen (VOCs) einen Atemtest zu konzipieren, der die Candida-Spezies non-invasiv und ohne Verzögerung bestimmen kann. Weiterhin wurde eine Untersuchung zur Effektivität und Auswirkung von adjuvanter Mucosa- und Zahnersatzdekontamination mit gewebeverträglichem Kaltplasma (tissue-tolerable-plasma, kurz: TTP) bei Patienten mit Prothesenstomatitis konzipiert.

Methoden

Von *Candida albicans*, *glabrata*, *tropicalis* und *krusei* wurden *in vitro* mithilfe von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS) spezifische VOCs ermittelt und individuelle Signaturen erstellt. Daran anschließend wurden Atemproben von jeweils 10 Probanden mit und ohne Candidainfektion untersucht und ebenfalls mittels GC/MS analysiert.

Im Rahmen einer doppelt verblindeten Splitmouthstudie wurden acht Patienten mit einer oralen Candidiasis für sechs Wochen adjuvant mit TTP behandelt. Parallel erhielten die Patienten topisch angewandte Antimykotika. Die Ergebnisauswertung erfolgte mittels computergestützter Erythemvermessung und Visual analogue scale (VAS).

Ergebnisse

In vitro emittierte VOCs machten die Unterscheidung der Candida-Spezies möglich. Charakteristisch für *C. albicans* waren hierbei 3-Methyl-2-Butanon und Styrol, für *C. krusei* eine Kombination von p-Xylol, 2-Octanon, 2-Heptanon und n-Butylacetat und bei *C. tropicalis* 1-Hexanol. Für *C. glabrata* war das Fehlen dieser Bestandteile spezifisch. Bislang ließen sich *in vitro* emittierte VOCs nicht *in vivo* nachweisen. Es konnte jedoch

ein Muster von neun organischen Verbindungen identifiziert werden, das deutliche Änderungen vor und nach antimykotischer Therapie aufwies. Ein Rückgang von vier Verbindungen wurde nachgewiesen, wohingegen fünf Verbindungen in erhöhtem Maße auftraten und in vergleichbaren Mengen auch in der Kontrollgruppe gefunden wurden.

Nach sechsmaliger TTP-Anwendung zeigte sich bei drei Patienten eine vollständige Remission, sowie Beschwerdefreiheit auf der Testseite. Die mittleren Veränderungen der Erythemoberflächen zeigten eine signifikante Verkleinerung im Verlauf der TTP-Anwendung im Vergleich zur Kontrollseite.

Schlussfolgerung

Die Entwicklung eines Atemtests ist ein vielversprechender Ansatz zur para-klinischen Bestätigung der oralen Candidiasis. Mithilfe des Musters aus neun organischen Verbindungen, kann die Remission nachgewiesen werden und eine ausgedehnte medikamentöse Therapie, mit der Gefahr einer Resistenzentwicklung, vermieden werden. Allerdings sind zur Bestätigung der klinischen Diagnose weiterhin mikrobiologische Abstriche nötig.

TTP ist ein vielversprechendes Forschungsgebiet, um die Schwächen der rein medikamentösen Behandlung zu überwinden. Insbesondere in Bezug auf die Ersttherapie, bevor mikrobielle Testergebnisse vorliegen, kann es den Einsatz von Breitspektrantimykotika vermeiden. Außerdem bietet es den großen Vorteil, dass auch therapierefraktäre Infektionen und Rezidive in Zukunft vermindert werden können.

Abstract (English version)

Background

The diagnosis of oral candidiasis requires time-consuming culture tests, leads to therapy-latency and often leads to the use of broad-spectrum antimycotics. The aim was to design a breath test using specific volatile organic compounds (VOCs), which can determine the *Candida* species non-invasively and without delay. Furthermore, a study was conducted on the effectiveness and effect of adjuvant mucosal and denture decontamination with tissue-tolerable-plasma (TTP) in patients with denture stomatitis.

Methods

Candida albicans, *glabrata*, *tropicalis* and *krusei* were used to determine specific VOCs *in vitro* using gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS) and individual signatures were generated. Breath samples from 10 subjects with and without candida infection were examined and also analyzed by GC/MS.

In a double-blinded split-mouth study, eight subjects suffering from denture stomatitis were treated for six weeks adjuvant with TTP. Meanwhile, patients received topically applied antimycotics. The results were evaluated by means of computer-assisted erythema measurement and visual analogue scale (VAS).

Results

In vitro emitted VOCs were 3-methyl-2-butanone and styrene for *C. albicans*, a combination of p-xylene, 2-octanone, 2-heptanone and n-butyl acetate for *C. krusei* and for *C. tropicalis* 1-hexanol was found to be specific. *C. glabrata* was characterized through the absence of these components. Up to now VOCs emitted *in vitro* could not be detected *in vivo*. However, a pattern containing nine organic compounds could be identified which showed characteristic changes before and after antifungal therapy. A decrease of four compounds was detected, whereas five compounds were found to an increased extent and were found in the control group in comparable quantities.

After six times TTP application, three patients showed a complete remission as well as a lack of complaints on the test side. The mean changes of the erythema surfaces

showed a significant reduction in the course of the TTP application compared to the control side.

Conclusion

The development of a breath test is a promising approach to confirm oral candidiasis para-clinically. Using the pattern of nine organic compounds, the remission can be demonstrated and extensive drug therapy, with the risk of resistance development, can be avoided. However, microbiological swabs are still necessary to confirm the clinical diagnosis.

TTP is a promising research-field to overcome the weaknesses of purely medicamentous treatment. Particularly with respect to the initial therapy, before microbial test results are available, it can avoid the use of broad-spectrum antimycotics. Furthermore, it offers the great advantage that treatment-resistant infections and recurrences can also be reduced in the future.

2. Einleitung

Orale Candidiasis

Hinter dem Begriff *Candida* verbergen sich mehr als 150 verschiedene Spezies von Hefepilzen. Sie gelten als die am häufigsten vorkommenden Pilze auf der humanen oralen Mukosa und obwohl sie sich in gesunden Individuen in Symbiose mit dem Wirt befinden, kann es durch einige Umstände zu einem mikrobiellen Ungleichgewicht führen. Besonders ältere Menschen, die Probleme mit der Speichelqualität und –produktion haben, unter Antibiotikagabe oder bei immunsupprimierten Patienten wird häufig das Auftreten eines Ungleichgewichtes beobachtet [1, 2]. Aus der Dysbiose resultierend entsteht die orale Candidiasis [3, 4]. Die Proliferation eines Biofilms ist die Folge. Dieser weist Eigenschaften auf, wie es auch freischwebende oder planktonische Zellen tun. Er hat die Fähigkeit, hohe antimykotische Konzentrationen zu tolerieren und sich der Wirtsabwehr zu entziehen [1]. Somit haben *Candida*-Spezies die Fähigkeit, arzneimittelresistente Biofilme zu bilden [5, 6] und der Therapie zu widerstehen.

Candida albicans ist die weit verbreitetste Spezies. 30% - 50% der Menschen tragen ihn in sich, wobei die Häufigkeit mit zunehmendem Alter steigt [3]. So können bei 60% der bezahnten Patienten mit einem Alter von über 60 Jahren *Candida albicans* nachgewiesen werden [3]. Weitere Spezies, die typischer Weise auf der oralen Mukosa auftreten, sind *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea* und *C. tropicalis* [3].

Da es sich bei *Candida* Spezies um Kommensale auf der Haut und Schleimhaut handelt, die dort regelhaft vorkommen, zeigen sich die verschiedenen klinischen Krankheitsbilder oft erst in Verbindung mit prädisponierenden Faktoren, wie Zahnprothesen, Stoffwechselerkrankungen, Immunsuppression oder der Therapie mit Breitspektrumantibiotika [7, 8].

Klinisch lässt sich die Infektion in akute und chronische Formen einteilen. Die akute pseudomembranöse Candidose, welche oft auch als Soor oder oral thrush bezeichnet wird steht hierbei den chronischen Formen, wie zum Beispiel der erythematösen oralen Candidiasis (umgangssprachlich auch Prothesen-Stomatitis genannt), *Candida* – Cheilitis oder der chronisch hyperplastischen Candidose gegenüber [8].

Diagnostik

Die Diagnostik der oralen Candidiasis erfolgt im klinischen Alltag durch einen Mundhöhlenabstrich. Oftmals wird zuvor visuell eine Verdachtsdiagnose gestellt. Die mikrobiologische Diagnostik des Abstriches via Kultivierung, Identifikation und Quantifizierung der Erreger erfolgt in einem Labor und nimmt in der Regel mindestens drei Tage in Anspruch. Eine weitere Möglichkeit der Diagnostik besteht in der Biopsie mit anschließender histopathologischer Untersuchung. Diese findet vor allem bei der chronisch hyperplastischen Candidiasis ihre Anwendung.

Therapie

Eine Einschätzung der prädisponierenden Faktoren, sowie die Unterscheidung zwischen akuter und chronischer Infektion spielt bei der Behandlung der Candidiasis eine entscheidende Rolle. Handelt es sich um eine erythematöse orale Candidose, kann diese oftmals effektiv mit topisch angewandten Antimykotika vom Polyen – Typ (Nystatin, Amphotericin B), in Form von Salben, Suspensionen oder Lutschtabletten, therapiert werden. Die Behandlung erfolgt bis mindestens 48 Stunden nach Einstellen einer subjektiven und objektiven Symptombefreiheit [8]. Lässt sich durch diese Therapieform keine Besserung der Infektion erwirken, kann eine systemische Behandlung indiziert sein. Auch bei Vorliegen einer chronisch mukokutanen Candidose, in Verbindung mit Immunsuppression, kann es dazu kommen, dass die topische antimykotische Therapie nicht effektiv genug ist. Für die systemische Behandlung werden in der Regel Azole, wie zum Beispiel Fluconazol, für 14 Tage angewandt. Unterstützend kommt bei beiden Therapiemöglichkeiten die Durchführung von lokal desinfizierenden Maßnahmen (z.B. Octenisept®) zum Einsatz [3, 8].

Problemstellung

Die bisherige Diagnostik und Behandlung der oralen Candidiasis ist durch eine Latenz bis zum Therapiebeginn gekennzeichnet. Nachdem ein Abstrich der Mundhöhle entnommen wurde, wird dieser in einem Labor der mikrobiologischen Diagnostik zugeführt. Somit vergehen einige Tage, an denen der Patient trotz seines Leidensdruckes und bereits gestellter visueller Verdachtsdiagnose durch den Behandler keine gezielte Therapie nach Erregerspektrum erhalten kann. Oft werden aus diesem Grund bereits vor Identifikation der Erreger Breitspektrumantimykotika eingesetzt. Die

immer häufigere Entstehung von arzneimittelresistenten Stämmen ist die Folge, da einige Candida-Arten, wie *C. glabrata* und *C. krusei* weniger gut auf die Behandlung mit Azolen ansprechen und *C. albicans* in der Lage ist eine Azolresistenz zu erwerben [9]. Da vor allem ältere Patienten immer häufiger unter der Pilzinfektion leiden, fällt ein weiterer prädisponierender Faktor ins Gewicht. Unter dem die Mundschleimhaut bedeckenden Zahnersatz entsteht ein sauerstoffarmes, anaerobes Milieu mit einem niedrigen pH-Wert und begünstigt das Wachstum und die Vermehrung der Pilze [3, 7]. Zusätzlich stellen mikrobiell kontaminierte Mikroporositäten des Zahnersatzes ein Keimreservoir dar. Da es sich um eine Biofilmerkrankung handelt, kommt dessen physikomechanischer Zerstörung eine besondere Bedeutung zu. Beides bedingt eine relativ lange Dauer der medikamentösen Behandlung und unter Umständen Refraktärität sowie häufige Rezidive.

Atemdiagnostik in der Medizin

Eine non-invasive Methode zum Nachweis von Krankheiten zu entwickeln ist schon längere Zeit Gegenstand vieler Forschungsthemen und die Atemgasanalytik gewinnt immer mehr an Bedeutung. Es liegen bereits etablierte Atemtests zum Nachweis einer offenen Tuberkulose-Infektion und des Magenerkrankungen verursachenden Bakteriums *Helicobacter pylori* vor. Auch in der Diagnostik von Lungenkrebs wird an einem Verfahren gearbeitet, das ein Screening von Risikogruppen ermöglicht, ohne die bisherigen Untersuchungen wie Bronchoskopien und Nadelbiopsien zu erfordern [10]. In der Intensivmedizin [11] und Gastroenterologie [12] ist die Analyse von Atemgasen ebenfalls ein Thema.

2.000 verschiedene volatile Verbindungen (VOCs) konnten bereits im menschlichen Körper nachgewiesen werden [13]. Trotzdem werden Atemgasanalysen bisher in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde ausschließlich zur Halitosis-Diagnostik eingesetzt [14] und das große diagnostische Potenzial blieb bisher ungenutzt und wurde nicht näher untersucht. Die Vorteile, die non-invasive Atemtests gegenüber bestehenden diagnostischen Verfahren mit sich bringen, sind jedoch zahlreich. Sie könnten nicht nur eine höhere Akzeptanz der Patienten im Gegensatz zu invasiven Untersuchungsmethoden fördern, die Geschwindigkeit und Wiederholbarkeit ist ein weiterer Pluspunkt. Auf Grund der Genauigkeit von Atemtests durch die Feststellung

spezifischer VOC-Profile, kann die Therapie somit nicht nur schneller erfolgen, sie ist auch noch gezielter auf das Keimspektrum abgestimmt.

Gewebeverträgliches Kaltplasma

Die klinische Anwendung von gewebeverträglichem Kaltplasma am Menschen, war bereits Gegenstand zahlreicher Studien und die antimikrobielle Wirkung auf Haut und Schleimhaut konnte nachgewiesen werden [15-17]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Kaltplasma in der Lage ist Biofilme zu entfernen und klinisch relevante Bakterienspezies, wie methicillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli* oder *Pseudomonas aeruginosa* vollständig zu inaktivieren [18-21]. In der Dermatologie hat sich das Plasma bereits seit einigen Jahren in der adjuvanten Therapie superinfizierter chronischer Wunden mit Therapie resistenten Keimen etabliert [22]. Durch die Plasmaanwendung werden antimikrobielle Effekte verstärkt und die Wunden heilen schneller [23].

Bei der angewandten Plasmaquelle handelt es sich um eine Kaltplasmaquelle, den "kinpen MED" (neoplas tools GmbH, Greifswald). Dieser besteht aus einem Handstück, einer Gleichstromquelle und einer Gasversorgungseinheit. Das Handstück enthält eine Quarz - Kapillare, in der sich eine stiftförmige Elektrode befindet. An dieser Elektrode liegt im Arbeitsmodus des Gerätes eine Hochfrequenzspannung an. Als Trägergas wird das Edelgas Argon verwendet und mit Hilfe eines Druckminderers auf eine Gasflussrate von 5 slm (Standard Liter / min) eingestellt. Das Plasma wird an der Spitze der Elektrode erzeugt. Durch die hohe Spannung wird das Argon ionisiert und mit Hilfe des großen Gasdrucks aus dem Pen heraus gepresst. Der Plasmastrahl breitet sich in der den Pen umgebenden Luft aus und es kommt zur Ozonbildung. Die Folge ist eine stark antimikrobielle Wirkung an der behandelten Oberfläche, die auch bei multiresistenten Bakterien zur Zerstörung der Zellwand führt [24-26].

Zielstellung

Diagnostik

Ziel der *in vitro* Studie war es, flüchtige organische Verbindungen zu identifizieren, die von den vier häufigsten Erregern einer oralen Candidiasis freigesetzt werden. Mithilfe von Gaschromatographie und Massenspektrometrie sollten so von *C. albicans*, *C.*

glabrata, *C. tropicalis* und *C. krusei* spezifische VOCs detektiert werden, um einen Atemtest für die schnelle und nicht-invasive Diagnose der oralen Candidiasis zu konzipieren. Darüber hinaus wurde untersucht, ob VOCs, die für Hefen spezifisch sind, zur Unterscheidung von Candida-Spezies verwendet werden können. Es wurde vermutet, dass Spezies-spezifische VOCs nachgewiesen werden können. In der nachfolgenden *ex vivo* Studie war das primäre Ziel zu untersuchen, ob mikrobielle VOCs von denen bekannt ist, dass sie von Candida *in vitro* emittiert werden, bei Patienten mit oraler Candidiasis erkannt werden können. Des Weiteren galt es zu beurteilen, ob diese volatilen Verbindungen bei Patienten ohne Candida und bei erkrankten Probanden, die einen negativen Kulturtest nach antifungaler Therapie zeigten, fehlten.

Therapie

Ziel der Studie war es, die Dekontaminationswirkung von gewebeverträglichem Kaltplasma bei der Behandlung einer oralen Candidiasis *in vivo* zu überprüfen. Der Biofilm sollte dabei physikomechanisch zerstört werden, ohne die Mundschleimhaut zu reizen oder weiter zu schädigen. Des Weiteren sollten die Keimreservoirs in mucosal gelagerten Prothesen eliminiert werden. Gegenstand der Studie war es, nachzuweisen, dass durch dieses Vorgehen eine schnellere klinische Remission als durch die alleinige medikamentöse Therapie erreicht werden kann und pathogene Spezies in therapiebedürftiger Quantität (entsprechend mäßigem oder reichlichem Wachstum) auf klinisch reizloser Mucosa nach Anwendung des Kaltplasmas nicht mehr nachweisbar sind.

3. Methodik

***in vitro* Headspace Analyse**

Zur Untersuchung des headspace (= Raum über den Kulturen, eingeschlossen von einer Glaskuppel) von Candidaspezies wurden vier Monokulturen auf Sabouraud's-Dextrose (4% Glucose)-agar (SDA) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) angelegt. Die Mikroorganismen wurden zuvor mit Hilfe eines standardisierten biochemischen Identifikationssystems (API Candida, bioMérieux, Nürtingen, Germany) als *Candida albicans*, *glabrata*, *tropicalis* und *krusei* (DSM 70014, 24506, 24507, 6128, DSMZ,

Braunschweig, Germany) identifiziert. Nach jeweils acht und 24 Stunden wurde der headspace über den Mikroorganismen in Tenax-Röhrchen (Tenax, Gerstel, Mühlheim, Germany) gesammelt. Zur Vergleichskontrolle wurde auch über einem ungeimpften SDA der headspace aufgefangen. Mit Hilfe einer Pumpe wurde der Inhalt der Tenax-Röhrchen in eine VOC-Flasche überführt und konnte so der Analyse zugeführt werden. Die quantitative Analyse der VOCs wurde entsprechend DIN ISO 16000-6 mittels gekoppelter Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS) durchgeführt. Zur qualitativen Evaluation der Proben wurden Chromatogramme angefertigt und diese mit Hilfe eines Algorithmus (Probability Based Matching, PBM) verglichen und bekannten Chromatogrammen aus einer Datenbank (yeast metabolome database, YMDB) zugeordnet.

Mikrobiologische - Diagnostik

Vor Durchführung des Atemtests wurden mikrobielle Abstriche aus der Mundhöhle der Probanden genommen. Die Entnahme erfolgte bei der Testgruppe in Abhängigkeit von der Lokalisation der Erytheme und wurde nach Therapieabschluss wiederholt. Die mikrobiellen Abstriche der Kontrollgruppe wurden von der rechten bukkalen Wangenschleimhaut und dem dorsum linguae genommen und einmalig durchgeführt. Die Probengewinnung erfolgte mit Hilfe eines sterilen Wattetupfers (Transwab M40 Compliant, MWE Medical Wire, Corsham, UK). Diese wurden in einem gepuffertem Aktivkohle-Medium (Amies Medium für Probenentnahme & Transport, MWE Medical Wire, Corsham, UK) gelagert und innerhalb von 24 h ins Labor gebracht. Die Tupfer wurden auf festen Kulturmedien ausgestrichen. Nach der Kultivierung für mindestens 48 Stunden auf SDA und CHROMagar™ wurden die CFUs gezählt und in vereinzelt (<8 CFU), geringes (≥ 8 CFU bis zu $\frac{1}{4}$ der Agarplatte bedeckend), mäßiges (CFU bedecken zwischen $\frac{1}{4}$ und $\frac{3}{4}$) und reichliches (CFU mit mehr als $\frac{3}{4}$) Wachstum klassifiziert, die Spezies identifiziert und mittels Matrix-assistierter Laser-Desorption / Ionisation und Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) typisiert.

Die mikrobiologische Untersuchung vor Beginn der Anwendung des gewebeverträglichen Kaltplasmas (tissue tolerable plasma, kurz: TTP) beinhaltete einen Mundhöhlenabstrich von jeder Seite des Gaumens bzw. Alveolarkamms abhängig von der Lokalisation des Erythems. Die Probenentnahme, Lagerung, Klassifizierung durch

CFU-Zählung und Bestimmung der Spezies erfolgte nach oben beschriebenem Vorgehen. Zum Therapieende nach 6 Wochen wurde bei der Testgruppe erneut eine mikrobiologische Untersuchung durchgeführt.

***ex vivo* Atemgasanalyse**

In Übereinstimmung mit der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin (EA1/048/15) wurde eine Genehmigung der Untersuchungen gewährt. Nach der Erstvorstellung (Erhebung der Anamnese und klinischer Befunde) wurden die Patienten, welche die Einschlusskriterien erfüllten, über die Möglichkeit zur Teilnahme an der Studie aufgeklärt. Frühestens 24 Stunden nach der Aufklärung unterschrieben die Patienten die Einwilligungserklärung. Alle Patienten gaben vor Beginn der Pilotstudie ihre Zustimmung. Die gesammelten Daten wurden pseudonymisiert.

Untersucht wurden jeweils zehn Patienten und zehn gesunde Probanden. Für die Studie geeignete Patienten waren zwischen 18 und 95 Jahren alt, Nichtraucher (seit ≥ 5 Jahren) und trugen herausnehmbare Prothesen. Patienten mit schweren Allgemeinerkrankungen, einem malignen Tumor in den letzten 5 Jahren, Schwangere, Alkohol- oder Drogenabhängige wurden von der Studie ausgeschlossen.

Alle Patienten mit der Diagnose orale Candidiasis erhielten eine antimykotische Therapie mit 100,000 I.U. Nystatinsalbe (Nystaderm Mundgel, Dermapharm, Grünwald, Germany). Diese wurde für sechs Wochen vier Mal täglich auf die betroffene Mundschleimhaut aufgetragen. Zusätzlich spülten die Patienten (nach Entfernen der Prothesen) zwei Mal täglich für 60 s mit Chlorhexidin-Mundspülung (CHX) (Chlorhexamed Forte, GlaxoSmithKline, Bühl, Germany). Die Probanden der Kontrollgruppe erhielten keine Medikation. Beide Gruppen wurden über die richtige Reinigung und Lagerung ihrer Prothesen aufgeklärt.

Vor Therapiebeginn wurden von allen Studienteilnehmern mikrobiologische Abstriche genommen und untersucht. Nach dem Ende der Studie wurde dieses Vorgehen bei der Testgruppe wiederholt.

Von der Patientengruppe wurden zwei Atemproben genommen. Die erste vor Therapiebeginn, die zweite nach Abschluss der Behandlung, Probanden der Kontrollgruppe gaben nur eine Atemprobe ab. Das Probeentnahmevervolumen betrug

750ml. Nach Inspiration durch die Nase erfolgte eine tiefe Expiration durch ein Teflonmundstück in den Sammelbehälter (sog. Mylar-Bag). Die gesammelte Atemluft wurde für die Laboranalyse in Tenax-Sammelröhrchen überführt. Dieses Procedere erfolgte für beide Gruppen identisch.

VOC-Analyse (GC/MS) und Signaturdetektion

Die in den Atemproben enthaltenen VOCs wurden mit Hilfe einer Pumpe aus den Mylar-Bags in Tenax-Röhrchen überführt und innerhalb von 24 Stunden mittels gekoppelter Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) analysiert. Nach qualitativer Analyse der VOCs wurden diese umfangreichen Datenbankabgleichen unterzogen.

***in vivo* Plasma-Behandlung**

Bei acht Patienten mit der Verdachtsdiagnose einer oralen Candidiasis wurde entsprechend des regulären Vorgehens eine mikrobiologische Diagnostik (Mundhöhlenabstrich) durchgeführt. Zusätzlich zur sich anschließenden topischen antimykotischen Therapie, wurde auf einer randomisiert ausgewählten Seite eines bilateral infizierten Kiefers TTP angewandt. Anwender des TTP und Untersucher der Fotografien waren verschiedene Personen, wobei dem Untersucher nicht bekannt war, welche Kieferhälfte wie behandelt wurde. Auch den Patienten war nicht bekannt, welche Seite mit Plasma behandelt wurde, da das oberflächliche Abfahren der Mundschleimhaut auch auf der Kontrollseite bei abgeschaltetem Gerät erfolgte.

Der primäre Endpunkt der Studie wurde als Remission des Erythems und der Beschwerden, sowie der ausbleibende Nachweis von Candida-Spezies oder allenfalls Nachweis von vereinzelttem Wachstum auf der Testseite definiert. Der sekundäre Endpunkt wurde mit Abschluss der sechsfachen TTP-Behandlung nach sechs Wochen erreicht.

Bei allen Studienteilnehmern erfolgte eine antimykotische Therapie mit 100.000 I.U. Nystatinsalbe (Nystaderm Mundgel, Dermapharm, Grünwald, Germany). Das Gel wurde vier Mal täglich auf die Mundschleimhaut und die korrespondierende Zahnersatzoberfläche aufgetragen. Zusätzlich spülten die Patienten zwei Mal täglich für 60 s mit Chlorhexidin-Mundspülung (CHX) (Chlorhexamed Forte, GlaxoSmithKline, Bühl, Germany) nach Entfernen der Prothesen.

Mindestens 24 Stunden nach Einverständniserklärung des Patienten wurden die Testseite des Gaumens und die korrespondierende Zahnersatzoberfläche mit TTP behandelt. Der Plasma-Pen wurde in 8 mm Abstand und mit einer Geschwindigkeit von 10mm/sec zuerst über die Prothesenoberfläche der Testseite, danach über die Schleimhaut der gleichen Seite und anschließend bei ausgeschaltetem Gerät (für den Placeboeffekt) über die Schleimhaut der Kontrollseite bewegt. Für sechs Wochen wurde die TTP- Behandlung alle sieben Tage wiederholt. Die TTP-, Nystatin- und CHX-Therapie wurden zeitgleich begonnen und für sechs Wochen durchgeführt.

In Übereinstimmung mit der World Medical Association Declaration of Helsinki für medizinische Forschungsprotokolle und Ethik wurde eine Genehmigung des Vorhabens der Ethikkommission der Charité (EA2/026/15) erteilt. Alle Patienten gaben vor Beginn der Pilotstudie ihre schriftliche Zustimmung. Die gesammelten Daten wurden pseudonymisiert.

Datenauswertung

***in vitro* headspace-Analyse**

Zur Identifizierung der VOCs aus den GC/MS-Daten wurde die Hefe-Metabolom-Datenbank (Yeast Metabolome Database, YMDB) [27] durchsucht. Die mVOC-Datenbank [28] wurde nach den identifizierten VOCs durchsucht, um deren Gattungs- und Artenspezifität zu bestimmen. Der Zugangszeitpunkt war der 9. April 2011.

***ex vivo* Atemgasanalyse**

Aufgrund der begrenzten Anzahl von Patienten in dieser Pilotstudie wurde die Datenanalyse primär deskriptiv unter Verwendung der Software SPSS Statistics 23 (IBM, Armonk, NY, USA) durchgeführt. Die Validierung der detektierten VOC-Muster erfolgte über:

1. Jackknife / Leave-One-Out Kreuzvalidierung
2. n-fache Kreuzvalidierung
3. Die mVOC-Datenbank [28] wurde verwendet, um die abgerufenen Ergebnisse auf ihre Spezifität zu überprüfen.

***in vivo* Plasmabehandlung**

Vor jeder TTP-Behandlung erfolgte eine klinische Untersuchung, die eine Fotodokumentation beinhaltet. Für jede durchgeführte Fotografie wurde eine kleine Einwegskala auf der Schleimhaut befestigt. Somit konnten die Untersucher mit Hilfe einer computergestützten Analysesoftware (Photoshop CS5 Extended Version 12, Adobe Systems, Dublin, Irland) die Größe der Erytheme bestimmen. Die mikrobiologische Diagnostik (Mundhöhlenabstrich) erfolgte vor Beginn der Therapie und bei Erreichen des jeweiligen Endpunktes. Die Patienten wurden zu jedem Termin gebeten mögliche Beschwerden in einer Skala (VAS = visual analogue scale) von 0 (=keine Beschwerden) bis 10 (=schlimmste vorstellbaren Schmerzen) einzuordnen. Hierbei wurde der Oberkiefer in rechts und links unterschieden. Die Datenanalyse wurde mithilfe der Software SPSS (IBM SPSS® 21.0, IBM, Armonk, IL, USA) durchgeführt.

4. Ergebnisse

***in vitro* headspace-Analyse**

Die Auswertung der VOCs aus den headspaces durch GC/MS zeigte eine Vielzahl von flüchtigen Bestandteilen. Darunter zum Beispiel Alkane, Aromaten, einwertige Alkohole, cyclische Ether und Glykole. Es wurden sowohl interspezifische Unterschiede in Art und Menge der detektierten Substanzen zwischen acht und 24 Stunden gefunden, als auch innerhalb der gleichen Spezies. Mit Hilfe der gewonnenen volatilen Verbindungen, war die Unterscheidung der Candida-Spezies *in vitro* möglich. Für *C. albicans* waren 3-Methyl-2-Butanon und Styrol spezifisch, bei *C. krusei* eine Kombination von p-Xylol, 2-Octanon, 2-Heptanon und n-Butylacetat und bei *C. tropicalis* 1-Hexanol. Charakteristisch für *C. glabrata* war das Fehlen dieser volatilen Bestandteile.

***ex vivo* Atemgasanalyse**

Vor Therapiebeginn wurden bei sechs Patienten der Testgruppe *C. albicans* nachgewiesen. Bei einer Patientin wurde *C. tropicalis* identifiziert und bei drei weiteren Studienteilnehmern (ein Mann und zwei Frauen) wurden nicht-Albicans-Arten (*C. glabrata* mit / ohne *C. parapsilosis*) nachgewiesen. Nach Ende der Therapie war der Candida-Nachweis bei einer Patientin noch immer positiv, jedoch quantitativ kleiner als

zuvor. Auch das Erythem war nur teilweise zurückgegangen. Bei ihr wurde ursprünglich eine Monoinfektion mit *C. albicans* diagnostiziert. Bei allen übrigen Studienteilnehmern konnte eine vollständige Remission der Erytheme beobachtet werden. Es gab keinen Nachweis für Pilzwachstum mehr. Unter den Probanden der Kontrollgruppe wurde keine Candidainfektion nachgewiesen.

VOC-Analyse

143 volatile Stoffe konnten aus den Atemproben der Probanden durch gekoppelte GC/MS erkannt werden. Keine der volatilen Verbindungen, die zuvor *in vitro* bei Candida nachgewiesen werden konnten, wurde gefunden. Des Weiteren, war es nicht möglich eine spezifische Verbindung zur Differenzierung zwischen gesunden und kranken Probanden festzustellen. Die Vergleiche der Atemmuster der erkrankten Patienten vor und nach Therapie, zeigten charakteristische Veränderungen innerhalb eines aus neun VOCs bestehenden Musters. Nach der antimykotischen Therapie konnte ein Rückgang von vier Verbindungen (Methylacetat MET, 2-Methyl-2-butanol 2ME, Hexanal HEX, Longifolen LON) nachgewiesen werden. Fünf Verbindungen erhöhten sich hingegen nach der Therapie und konnten in vergleichbaren Mengen auch in der Kontrollgruppe gefunden werden. Der Datenbankabgleich der neun erkannten VOCs ergab, dass sieben davon von einer Vielzahl von Mikroorganismen emittiert werden. Die meisten dieser Bakterien und Pilze kommen nicht in der Mundhöhle vor, somit handelt es sich wahrscheinlich um Produkte von Stoffwechselprozessen.

***in vivo* Plasmabehandlung**

Die durchschnittliche TTP-Bestrahlungszeit betrug $8,6 \pm 2,9$ min. auf der Mukosa und $6,9 \pm 1,6$ min. auf der korrespondierenden Prothesenunterseite. Nach sechsmaliger TTP-Anwendung zeigte sich bei drei Patienten eine vollständige Remission der Erytheme, sowie Beschwerdefreiheit auf der Testseite. Die CFU-Zählung nach mikrobiologischer Untersuchung ergab bei fünf Patienten auf der Testseite und bei drei Patienten auf der Kontrollseite positive Ergebnisse für Candida. Zwei Patienten zeigten Werte, die höher einzustufen waren als „geringes Wachstum“. Somit erreichte nur ein Patient den primären Endpunkt. Im Mittel betrugen die Erythemoberflächen zu Beginn der Studie auf der Testseite $2,92\text{cm}^2$ und auf der Kontrollseite $4,04\text{cm}^2$. Die mittleren

Veränderungen der Erythemoberflächen der Testseite zeigten eine signifikante Verkleinerung der Fläche im Verlauf der TTP-Anwendung im Vergleich zur Kontrollseite.

5. Diskussion

Diagnostik

Die Diagnosestellung der oralen Candidiasis erfolgt grundsätzlich klinisch und basiert auf dem Erkennen der Läsion. Mikrobiologische Untersuchungen kommen weiterführend zum Einsatz, wenn die klinische Diagnostik bestätigt werden muss, um eine Differentialdiagnose zu ermitteln und in Fällen, die durch eine Resistenz gegen Antimykotika gekennzeichnet sind [29]. Die Unterscheidung von Pilzen hinsichtlich ihrer Gattung durch bestimmte VOC-Profile, konnte bereits mit GC/MS erreicht werden. Bislang war jedoch die Zuordnung zu den verschiedenen Candidaspezies nicht möglich [30].

Die Entwicklung eines Atemtests ist ein vielversprechender Ansatz bei der paraklinischen Bestätigung des Verdachts auf orale Candidiasis. Die Nachteile der mikrobiologischen Kulturtests, wie ein hoher logistischer und finanzieller Aufwand, sowie die Latenz bis zum gezielten Therapiebeginn, könnten umgangen werden. *In vitro* gelang es bereits die Spezies *C. albicans*, *glabrata*, *tropicalis* und *krusei* anhand spezifischer VOCs zu unterscheiden. Die Ergebnisse dieser Studie deuten jedoch darauf hin, dass der Candida-Metabolismus stark von den Umweltbedingungen, die Bedingungen bei der Kultivierung eingeschlossen, beeinflusst wird und somit möglicherweise die Diagnostik mittels Atemtest erschwert. Da headspace-Analysen und *in vivo* Atemtestergebnisse unterschiedliche volatile Verbindungen aufzeigten, müssen bei zukünftigen *in vitro* Versuchen die Umweltbedingungen der Mundhöhle berücksichtigt werden, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Somit war die Übertragbarkeit der VOC-Profile, welche *in vitro* gefunden wurden, *in vivo* nicht möglich und die zuvor als spezifisch bestimmten VOCs, konnten in den analysierten Atemproben nicht nachgewiesen werden. Auf Grund der Tatsache, dass sich *in vivo* sehr abwechslungsreiche VOC-Muster darstellten, ließ sich kein spezifisches Profil für die Diagnose der oralen Candidiasis festlegen. Die volatilen

Verbindungen von erkrankten und gesunden Probanden unterschieden sich hinsichtlich der An- oder Abwesenheit von spezifischen VOCs nicht. Allerdings zeigten sich in der Testgruppe nach antimykotischer Therapie Veränderungen der emittierten Menge eines Musters von neun organischen Verbindungen. Eine Bestätigung der Ergebnisse *in vivo* kann nur erfolgen, wenn Atemtests bei erkrankten und gesunden Probanden durchgeführt werden und das Muster bei einer größeren Patientenzahl bestätigt werden kann. Die Weiterentwicklung der VOC-Datenbanken könnte in Zukunft dazu beitragen dieses Problem zu lösen. Bisher scheint somit das Potenzial eines Atemtests auf die Überwachung der Remission beschränkt zu sein. Er kann jedoch dabei helfen, die Abwesenheit einer Candidiasis nach antimykotischer Therapie zu bestätigen und somit ausgedehnte medikamentöse Therapien zu vermeiden. Darüber hinaus könnte ein Atemtest für eine Candidiasis-Überwachung bei gefährdeten Patientengruppen, wie älteren Menschen oder Patienten unter Immunsuppression verwendet werden. In der vorliegenden Studie wurden Träger der Pilzinfektion, die keine Symptome zeigten, und Raucher nicht berücksichtigt. Weitere Untersuchungen mit einer größeren Anzahl von Patienten sind in Zukunft nötig, um einen Atemtest zu konzipieren, der in den klinischen Alltag integriert werden kann.

Therapie

In der Bevölkerung kann ein stetiger Anstieg von Pilzinfektionen beobachtet werden. Grund dafür ist eine vermehrte Antibiotikaresistenz und eine begrenzte Anzahl von Antimykotika [31]. Trotz des therapeutischen Fortschritts, hat sich vor allem bei Prothesenträgern die Prävalenz für opportunistische Pilzinfektionen erhöht und obwohl *C. albicans* immer noch die häufigste Candida-Art ist, die mit Schleimhautläsionen und Prothesenstomatitis assoziiert wird, kann immer öfter ein Spezies-shift zu nicht-*albicans*-Arten, wie beispielsweise *C. glabrata* (zweithäufigste Art auf Prothesenoberflächen und Gaumenschleimhaut), beobachtet werden [32]. Dies hat die Notwendigkeit für eine alternative therapeutische Strategie veranlasst. Plasmabehandlung ist ein neues interdisziplinäres Forschungsthema, das auf Grund seiner bakteriziden, viruziden, sporiziden und fungiziden Eigenschaften [33, 34] immer mehr an Bedeutung gewinnt. Außerdem macht die starke Zunahme von bakteriellen Resistenzen gegen Antibiotika die Plasma-Medizin zusätzlich interessant [35, 36].

Zahlreiche Forschungsarbeiten beschäftigen sich vor allem mit *Candida albicans* [37-39], da er bei anfälligen Individuen häufig für ein breites Spektrum von Infektionen verantwortlich ist und immer noch als Hauptursache für lebensbedrohliche Infektionen auf der ganzen Welt gilt [37]. In einer Untersuchung zur logarithmischen CFU-Reduktion verschiedener Mikroben auf Agarplatten mittels Kaltplasma, stellte sich heraus, dass *C. albicans* am schwersten zu inaktivieren war [40]. Im Gegensatz dazu, konnte jedoch in anfangs beschriebener Studie die Anwendung des TTP *in vivo* in drei von acht Patienten mit einer *C. albicans* Monoinfektion eine vollständige Remission der Infektion erreichen und zeigt deutlich, welches große Potenzial in der Plasma-Medizin steckt. Insbesondere in der Ersttherapie, bevor mikrobielle Testergebnisse zur Verfügung stehen, ist TTP aufgrund seiner antiseptischen Effekte [41] ein vielversprechender Ansatz. Der Vergleich der Wirksamkeit von TTP zu Antimykotika bei einer größeren Anzahl von Patienten, könnte den Schwerpunkt zukünftiger Untersuchungen darstellen. So ist es denkbar, dass künftig eine Behandlung ohne die Einnahme von Antimykotika möglich sein wird. Allerdings würde der Erfolg dieser Therapievariante stark von der Mitarbeit des Patienten abhängen. Dieser müsste häufigere Arztbesuche in Kauf nehmen, da eine Behandlung zu Hause nicht möglich wäre. In Anbetracht der heutzutage häufigen Rezidive unter Antimykotika und Resistenzen, die oft eine intermittierende Behandlung über mehrere Monate nach sich ziehen, könnte der Einsatz von TTP eine sehr gute Lösung sein. Ebenso wäre die Behandlung von anderen klinischen Präsentationstypen der oralen Candidose, z.B. Glossitis rhombica mediana oder Cheilitis angularis, denkbar.

6. Literaturverzeichnis

1. Nett, J.E., *The Host's Reply to Candida Biofilm*. Pathogens, 2016. **5**(1).
2. Lopez-Ribot, J.L., *Candida albicans biofilms: more than filamentation*. Curr Biol, 2005. **15**(12): p. R453-5.
3. Singh, A., R. Verma, A. Murari and A. Agrawal, *Oral candidiasis: An overview*. J Oral Maxillofac Pathol, 2014. **18**(Suppl 1): p. S81-5.
4. Ohshima, T., Y. Kojima, C.J. Seneviratne and N. Maeda, *Therapeutic Application of Synbiotics, a Fusion of Probiotics and Prebiotics, and Biogenics as a New Concept for Oral Candida Infections: A Mini Review*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 10.
5. Chandra, J., D.M. Kuhn, P.K. Mukherjee, L.L. Hoyer, T. McCormick and M.A. Ghannoum, *Biofilm formation by the fungal pathogen Candida albicans: development, architecture, and drug resistance*. J Bacteriol, 2001. **183**(18): p. 5385-94.
6. Scorzoni, L., E.S.A.C. de Paula, C.M. Marcos, P.A. Assato, W.C. de Melo, H.C. de Oliveira, C.B. Costa-Orlandi, M.J. Mendes-Giannini and A.M. Fusco-Almeida, *Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 36.
7. Akpan, A. and R. Morgan, *Oral candidiasis*. Postgrad Med J, 2002. **78**(922): p. 455-9.
8. Reinel, D., A. Plettenberg, C. Seebacher, D. Abeck, J. Brasch, O. Cornely, I. Effendy, G. Ginter-Hanselmayer, N. Haake, G. Hamm, U.C. Hipler, H. Hof, H.C. Korting, P. Mayser, M. Ruhnke, K.H. Schlacke and H.J. Tietz, *[Oral candidiasis]*. J Dtsch Dermatol Ges, 2008. **6**(7): p. 593-7.
9. Niimi, M., N.A. Firth and R.D. Cannon, *Antifungal drug resistance of oral fungi*. Odontology, 2010. **98**(1): p. 15-25.
10. Dent, A.G., T.G. Sutedja and P.V. Zimmerman, *Exhaled breath analysis for lung cancer*. J Thorac Dis, 2013. **5** Suppl 5: p. S540-50.
11. Filipiak, W., R. Beer, A. Sponring, A. Filipiak, C. Ager, A. Schiefecker, S. Lanthaler, R. Helbok, M. Nagl, J. Troppmair and A. Amann, *Breath analysis for in vivo detection of pathogens related to ventilator-associated pneumonia in intensive care patients: a prospective pilot study*. J Breath Res, 2015. **9**(1): p. 016004.
12. Mochalski, P., A. Sponring, J. King, K. Unterkofler, J. Troppmair and A. Amann, *Release and uptake of volatile organic compounds by human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) in vitro*. Cancer Cell Int, 2013. **13**(1): p. 72.
13. de Lacy Costello, B., A. Amann, H. Al-Kateb, C. Flynn, W. Filipiak, T. Khalid, D. Osborne and N.M. Ratcliffe, *A review of the volatiles from the healthy human body*. J Breath Res, 2014. **8**(1): p. 014001.
14. Aydin, M., M.E. Ozen, U. Kirbiyik, B. Evlice, M. Ferguson and I. Uzel, *A new measurement protocol to differentiate sources of halitosis*. Acta Odontol Scand, 2016. **74**(5): p. 380-4.
15. Isbary, G., G. Morfill, H.U. Schmidt, M. Georgi, K. Ramrath, J. Heinlin, S. Karrer, M. Landthaler, T. Shimizu, B. Steffes, W. Bunk, R. Monetti, J.L. Zimmermann, R. Pompl and W. Stolz, *A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients*. Br J Dermatol, 2010. **163**(1): p. 78-82.
16. Heinlin, J., J.L. Zimmermann, F. Zeman, W. Bunk, G. Isbary, M. Landthaler, T. Maisch, R. Monetti, G. Morfill, T. Shimizu, J. Steinbauer, W. Stolz and S. Karrer, *Randomized placebo-controlled human pilot study of cold atmospheric argon plasma on skin graft donor sites*. Wound Repair Regen, 2013. **21**(6): p. 800-7.
17. Isbary, G., J. Heinlin, T. Shimizu, J.L. Zimmermann, G. Morfill, H.U. Schmidt, R. Monetti, B. Steffes, W. Bunk, Y. Li, T. Klaempfl, S. Karrer, M. Landthaler and W. Stolz, *Successful and safe use of 2 min cold atmospheric argon plasma in chronic wounds: results of a randomized controlled trial*. Br J Dermatol, 2012. **167**(2): p. 404-10.

18. Haertel, B., T. von Woedtke, K.D. Weltmann and U. Lindequist, *Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing*. *Biomol Ther (Seoul)*, 2014. **22**(6): p. 477-90.
19. Fricke, K., I. Koban, H. Tresp, L. Jablonowski, K. Schroder, A. Kramer, K.D. Weltmann, T. von Woedtke and T. Kocher, *Atmospheric pressure plasma: a high-performance tool for the efficient removal of biofilms*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e42539.
20. Maisch, T., T. Shimizu, G. Isbary, J. Heinlin, S. Karrer, T.G. Klampfl, Y.F. Li, G. Morfill and J.L. Zimmermann, *Contact-free inactivation of Candida albicans biofilms by cold atmospheric air plasma*. *Appl Environ Microbiol*, 2012. **78**(12): p. 4242-7.
21. Alkawareek, M.Y., S.P. Gorman, W.G. Graham and B.F. Gilmore, *Potential cellular targets and antibacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma*. *Int J Antimicrob Agents*, 2014. **43**(2): p. 154-60.
22. Klebes, M., C. Ulrich, F. Kluschke, A. Patzelt, S. Vandersee, H. Richter, A. Bob, J. von Hutten, J.T. Krediet, A. Kramer, J. Lademann and B. Lange-Asschenfeld, *Combined antibacterial effects of tissue-tolerable plasma and a modern conventional liquid antiseptic on chronic wound treatment*. *J Biophotonics*, 2015. **8**(5): p. 382-91.
23. Arndt, S., P. Unger, E. Wacker, T. Shimizu, J. Heinlin, Y.F. Li, H.M. Thomas, G.E. Morfill, J.L. Zimmermann, A.K. Bosserhoff and S. Karrer, *Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression of key molecules of the wound healing machinery and improves wound healing in vitro and in vivo*. *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e79325.
24. Daeschlein, G., S. Scholz, R. Ahmed, A. Majumdar, T. von Woedtke, H. Haase, M. Niggemeier, E. Kindel, R. Brandenburg, K.D. Weltmann and M. Junger, *Cold plasma is well-tolerated and does not disturb skin barrier or reduce skin moisture*. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2012. **10**(7): p. 509-15.
25. Daeschlein, G., M. Napp, S. Lutze, A. Arnold, S. von Podewils, D. Guembel and M. Junger, *Skin and wound decontamination of multidrug-resistant bacteria by cold atmospheric plasma coagulation*. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2015. **13**(2): p. 143-50.
26. Kvam, E., B. Davis, F. Mondello and A.L. Garner, *Nonthermal atmospheric plasma rapidly disinfects multidrug-resistant microbes by inducing cell surface damage*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012. **56**(4): p. 2028-36.
27. Jewison, T., C. Knox, V. Neveu, Y. Djoumbou, A.C. Guo, J. Lee, P. Liu, R. Mandal, R. Krishnamurthy, I. Sinelnikov, M. Wilson and D.S. Wishart, *YMDB: the Yeast Metabolome Database*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(Database issue): p. D815-20.
28. Lemfack, M.C., J. Nickel, M. Dunkel, R. Preissner and B. Piechulla, *mVOC: a database of microbial volatiles*. *Nucleic Acids Res*, 2014. **42**(Database issue): p. D744-8.
29. Coronado-Castellote, L. and Y. Jimenez-Soriano, *Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis*. *J Clin Exp Dent*, 2013. **5**(5): p. e279-86.
30. Perl, T., M. Junger, W. Vautz, J. Nolte, M. Kuhns, M. Borg-von Zepelin and M. Quintel, *Detection of characteristic metabolites of Aspergillus fumigatus and Candida species using ion mobility spectrometry-metabolic profiling by volatile organic compounds*. *Mycoses*, 2011. **54**(6): p. e828-37.
31. Sardi, J.C., L. Scorzoni, T. Bernardi, A.M. Fusco-Almeida and M.J. Mendes Giannini, *Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options*. *J Med Microbiol*, 2013. **62**(Pt 1): p. 10-24.
32. Pereira-Cenci, T., A.A. Del Bel Cury, W. Crielaard and J.M. Ten Cate, *Development of Candida-associated denture stomatitis: new insights*. *J Appl Oral Sci*, 2008. **16**(2): p. 86-94.
33. Wiegand, C., O. Beier, K. Horn, A. Pfuch, T. Tolke, U.C. Hipler and A. Schimanski, *Antimicrobial impact of cold atmospheric pressure plasma on medical critical yeasts and bacteria cultures*. *Skin Pharmacol Physiol*, 2014. **27**(1): p. 25-35.
34. Isbary, G., T. Shimizu, Y.F. Li, W. Stolz, H.M. Thomas, G.E. Morfill and J.L. Zimmermann, *Cold atmospheric plasma devices for medical issues*. *Expert Rev Med Devices*, 2013. **10**(3): p. 367-77.

35. Spellberg, B., J. Bartlett, R. Wunderink and D.N. Gilbert, *Novel approaches are needed to develop tomorrow's antibacterial therapies*. Am J Respir Crit Care Med, 2015. **191**(2): p. 135-40.
36. Morfill, G.E., M.G. Kong and J.L. Zimmermann, *Focus on Plasma Medicine*. New Journal of Physics, 2009. **11**(11): p. 115011.
37. Rahimi-Verki, N., A. Shapoorzadeh, M. Razzaghi-Abyaneh, S.M. Atyabi, M. Shams-Ghahfarokhi, Z. Jahanshiri and M. Gholami-Shabani, *Cold atmospheric plasma inhibits the growth of Candida albicans by affecting ergosterol biosynthesis and suppresses the fungal virulence factors in vitro*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2016. **13**: p. 66-72.
38. Matthes, R., L. Jablonowski, I. Koban, A. Quade, N.O. Hubner, R. Schlueter, K.D. Weltmann, T. von Woedtke, A. Kramer and T. Kocher, *In vitro treatment of Candida albicans biofilms on denture base material with volume dielectric barrier discharge plasma (VDBD) compared with common chemical antiseptics*. Clin Oral Investig, 2015. **19**(9): p. 2319-26.
39. Coco, B.J., J. Bagg, L.J. Cross, A. Jose, J. Cross and G. Ramage, *Mixed Candida albicans and Candida glabrata populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis*. Oral Microbiol Immunol, 2008. **23**(5): p. 377-83.
40. Klampfl, T.G., G. Isbary, T. Shimizu, Y.F. Li, J.L. Zimmermann, W. Stolz, J. Schlegel, G.E. Morfill and H.U. Schmidt, *Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest*. Appl Environ Microbiol, 2012. **78**(15): p. 5077-82.
41. Mohd Nasir, N., B.K. Lee, S.S. Yap, K.L. Thong and S.L. Yap, *Cold plasma inactivation of chronic wound bacteria*. Arch Biochem Biophys, 2016. **605**: p. 76-85.

7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Isabell Kastner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Etablierung neuer Methoden zur Diagnostik und Therapie der oralen Candidiasis“ 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) 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

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Isabell Kastner hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Saskia Preissner*, **Isabell Kastner***, Eyke Schuette, Stefan Hartwig, Andrea Maria Schmidt-Westhausen, Sebastian Paris und Moritz Hertel, **Adjuvant antifungal therapy using tissue tolerable plasma on oral mucosa and removable dentures in oral candidiasis patients: a randomised double-blinded split-mouth pilot study.**, Mycoses, 2016 *geteilte Erstautorschaft

Beitrag im Einzelnen:

Einarbeitung / Vorbereitung

- Ausführliche Literaturrecherche zum Stand der Forschung in Bezug auf die klinische Anwendung von kaltem Plasma
- Regelmäßige Teilnahme an den Sitzungen der Arbeitsgemeinschaft Plasma der Charité – Abteilung Zahnerhaltung/Oralchirurgie und MKG, sowie Besuch der Berliner Physikalischen Gesellschaft
- Einarbeitung in die Durchführung klinischer Studien und die Handhabung der verwendeten Geräte
- Mitarbeit bei der Formulierung der Fragestellung und des Studienaufbaus

Durchführung und Auswertung

- Mitarbeit bei der Durchführung der klinischen Studie (insbesondere Plasma-Behandlung, Fotodokumentation)
- Mitarbeit am zweiten Teil der Auswertung nach verblindetem Teil der Auswertung, inklusive der grafischen Aufarbeitung und Statistik
- Mitarbeit beim Verfassen des Manuskripts

Publikation 2: Moritz Hertel, Eyke Schuette, **Isabell Kastner**, Stefan Hartwig, Andrea Maria Schmidt-Westhausen, Robert Preissner, Sebastian Paris, Saskia Preissner, **Volatile organic compounds in the breath of oral candidiasis patients: a pilot study**, Clinical Oral Investigations, 2017

Beitrag im Einzelnen:

- Mitarbeit bei der Durchführung der Studie
- Mitarbeit bei der Auswertung, insbesondere des Screenings der detektierten VOCs
- Mitarbeit beim Verfassen des Manuskripts

Publikation 3: Moritz Hertel, Stefan Hartwig, Eyke Schütte, Bernhard Gillissen, Robert Preissner, Andrea Maria Schmidt-Westhausen, Sebastian Paris, **Isabell Kastner**, Saskia Preissner, **Identification of signature volatiles to discriminate Candida albicans, glabrata, krusei and tropicalis using gas chromatography and mass spectrometry.**, Mycoses, 2015

Beitrag im Einzelnen:

- Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche
- Mitarbeit bei der Auswertung der gewonnenen Daten, insbesondere der Chromatogramme
- Mitarbeit bei der Datenbankrecherche mVOC und YeastMetabolom-DB zum Abgleich der Ergebnisse
- Mitarbeit beim Verfassen des Manuskripts

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

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

8. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Publikation 1: Identification of signature volatiles to discriminate *Candida albicans*, *glabrata*, *krusei* and *tropicalis* using gas chromatography and mass spectrometry. Autoren: Moritz Hertel, Stefan Hartwig, Eyke Schütte, Bernhard Gillissen, Robert Preissner, Andrea Maria Schmidt-Westhausen, Sebastian Paris, Isabell Kastner, Saskia Preissner

Zeitschrift: Mycoses

Erscheinungsjahr: 2015

Impact-Faktor: 2,252

<https://doi.org/10.1111/myc.12442>

Publikation 2: Volatile organic compounds in the breath of oral candidiasis patients: a pilot study. Autoren: Moritz Hertel, Eyke Schuette, Isabell Kastner, Stefan Hartwig, Andrea Maria Schmidt-Westhausen, Robert Preissner, Sebastian Paris, Saskia Preissner

Zeitschrift: Clinical Oral Investigations

Erscheinungsjahr: 2017

Impact-Faktor: 2,308

<https://doi.org/10.1007/s00784-017-2147-6>

Publikation 3: Adjuvant antifungal therapy using tissue tolerable plasma on oral mucosa and removable dentures in oral candidiasis patients: a randomised double-blinded split-mouth pilot study. Autoren: Saskia Preissner, Isabell Kastner, Eyke Schuette, Stefan Hartwig, Andrea Maria Schmidt-Westhausen, Sebastian Paris und Moritz Hertel

Zeitschrift: Mycoses

Erscheinungsjahr: 2016

Impact-Faktor: 2,252

<https://doi.org/10.1111/myc.12495>

9. Lebenslauf

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

10. Komplette Publikationsliste

Publikation 1

Saskia Preissner, Isabell Kastner, Eyke Schuette, Stefan Hartwig, Andrea Maria Schmidt-Westhausen, Sebastian Paris und Moritz Hertel

Adjuvant antifungal therapy using tissue tolerable plasma on oral mucosa and removable dentures in oral candidiasis patients: a randomised double-blinded split-mouth pilot study.

Zeitschrift: Mycoses

Erscheinungsjahr: 2016

Impact-Faktor: 2,252

Publikation 2

Moritz Hertel, Eyke Schuette, Isabell Kastner, Stefan Hartwig, Andrea Maria Schmidt-Westhausen, Robert Preissner, Sebastian Paris, Saskia Preissner

Volatile organic compounds in the breath of oral candidiasis patients: a pilot study

Zeitschrift: Clinical Oral Investigations

Erscheinungsjahr: 2017

Impact-Faktor: 2,308

Publikation 3

Moritz Hertel, Stefan Hartwig, Eyke Schütte, Bernhard Gillissen, Robert Preissner, Andrea Maria Schmidt-Westhausen, Sebastian Paris, Isabell Kastner, Saskia Preissner

Identification of signature volatiles to discriminate *Candida albicans*, *glabrata*, *krusei* and *tropicalis* using gas chromatography and mass spectrometry.

Zeitschrift: Mycoses

Erscheinungsjahr: 2015

Impact-Faktor: 2,252

11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Saskia Preißner. Sie ermöglichte mir nicht nur Teil dieses besonderen Forschungsprojekts zu werden, sondern war auch eine außerordentlich gute Betreuerin, die mir mit großem Engagement und fachlicher Kompetenz immer zur Seite gestanden hat.

Ich möchte auch Herrn PD Dr. Moritz Hertel danken, der mich bei der Umsetzung meiner Versuche immer mit Rat und Tat unterstützt hat.

Herrn Dr. Dr. Stefan Hartwig möchte ich dafür danken, dass er mir einen Einblick in die Behandlung seiner Patienten in der MKG ermöglichte und ich die Gelegenheit hatte, das Kaltplasma auch dort zur Behandlung von superinfizierten chronischen Wunden anzuwenden.

Danke auch an unsere tolle „AG Plasma“. Die Nachmittage und Abende mit euch waren nicht nur immer sehr lehrreich, sondern haben mir auch viel Freude bereitet.

Abschließend möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern danken, die immer an mich geglaubt haben, mich motiviert und ermutigt haben und mich in allen Dingen bedingungslos unterstützen.