

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

DISSERTATION

In vitro Untersuchungen zur Anwendung von
gewebeverträglichem Kaltplasma in der Zahnmedizin mit Fokus
auf endodontologische Fragestellungen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sascha André Rudolf Wolfgang Herbst

aus Berlin

Datum der Promotion: 10. März 2017

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract	4
2. Einführung	6
2.1 Infektion des Endodonts	6
2.2 Endodontische Therapie	6
2.3 Prinzip des gewebeverträglichen Kaltplasmas	7
2.4 Anwendung in der Medizin	8
2.5 Zielstellung.....	8
3. Methodik	10
3.1 Entwicklung der in-vitro-Modelle	10
3.2 Bakterielle Besiedelung	11
3.3 Anwendung der antibakteriellen Agenzien	11
3.4 Materialgewinnung zur mikrobiologischen Untersuchung	12
3.5 Auswertung	13
4. Ergebnisse	14
4.1 Infizierte Dentintubuli	14
4.2 Infizierte Dentinoberflächen	15
4.3 Infizierte Knochenproben	15
5. Diskussion	17
5.1 Bewertung der Ergebnisse	17
5.2 Kritische Betrachtung der Versuchsmodelle	18
5.3 Fazit von anderen Autoren	19
5.4 Ausblick	20
6. Literatur	22
7. Eidesstattliche Versicherung	25
8. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	27
9. Lebenslauf	45
10. Publikationsliste	46
11. Danksagung	48

1. Abstract

Deutsche Version

Gewebeverträgliches Kaltplasma (KP) ist in der Dermatologie bereits zur Dekontamination von Wunden mit therapieresistenten Keimen etabliert. Resistente Keime limitieren auch in der Zahnmedizin, speziell in der Endodontologie, den Therapieerfolg. Daher sollte in dieser Untersuchung gezeigt werden, ob die Anwendung von KP als Ergänzung zu bestehenden Therapieansätzen geeignet wäre.

Diese Fragestellung wurde in drei Studien mit in-vitro- und ex-vivo-Versuchen bearbeitet. In der ersten Studie wurde die Wirkung von KP in verschiedenen Tiefen von infizierten Dentintubuli untersucht. Dazu wurden die Dentintubuli mit *Enterococcus faecalis* infiziert und anschließend mit verschiedenen Dekontaminationsmethoden (Kontrollgruppe: Spülung mit 5 mL physiologischer 0,9 % Kochsalzlösung, CHX-Gruppe: 30 s Spülung mit 5 mL einer ultraschallaktivierten 2 % Chlorhexidindigluconatlösung (CHX), KP-Gruppe: 30 s KP-Anwendung und eine Kombinationsgruppe: 30 s Spülung mit einer ultraschallaktivierten 5 mL 2 % Chlorhexidindigluconatlösung und 30 Sekunden KP-Anwendung) behandelt. Die Kombination aus Chlorhexidindigluconat mit KP war signifikant effektiver in der Keimreduktion über alle Schichten betrachtet als die Anwendung in der CHX-Gruppe.

Ziel der zweiten Studie war die Analyse der Dekontaminationswirkung von KP auf Dentinoberflächen, da das Endodont aus diesem Material besteht und eine komplette Entfernung durch mechanische Aufbereitung meist nicht möglich ist. Es wurden zwei Versuche durchgeführt.

Bei dem ex-vivo-Versuch wurden kariöse Läsionen halbiert und die CHX-Gruppe mit 1 % CHX-Gel und die KP-Gruppe für 60 s mit KP behandelt. Die KP-Gruppe wies signifikant weniger Keimzahlen auf als die Kontrollgruppe. Für den in-vitro-Versuch wurde auf den Wurzeloberflächen von 24 Oberkiefereckzähnen ein Areal von 4 mm x 5 mm definiert und mit *Streptococcus mitis* besiedelt. Die Behandlung erfolgte in der Kontrollgruppe (Spülung mit 5 mL 0,9 % NaCl für 30 s), der SRP-Gruppe (Spülung wie Kontrolle, zusätzlich erfolgte ein Scaling (SRP) der Oberfläche mit einer scharfen Kürette) und in der SRP+KP-Gruppe (Vorgehen wie bei SRP-Gruppe, anschließend Applikation des Plasma-Jets für 60 s). Auch hier war die zusätzliche Behandlung mit KP signifikant effektiver als die Anwendungen in den Vergleichsgruppen.

Bei der dritten Studie stand die Dekontaminationswirkung des KP in bakteriell besiedeltem Knochen im Fokus des Interesses, der bei einer apikalen Entzündung vorliegen könnte. Es wurden verschiedene Schichten untersucht, wobei die Keimzahlen in der KP-Gruppe (KP-Anwendung für 60 s) signifikant niedriger waren, als in der Kontrollgruppe (1 % NaCl, 60 s gespült) und in der CHX-Gruppe (Spülung mit 0,2 % CHX für 60 s) über alle Schichten betrachtet.

Kaltplasma wies in allen drei Untersuchungen eine bakterizide Wirkung auf. Somit könnte Kaltplasma als Ergänzung in der endodontischen Therapie eingesetzt werden.

English version

Tissue tolerable cold plasma (CP) is established in dermatology for decontaminating therapy-resistant infected wounds. Resistant germs limit the therapeutic success also in dentistry, especially in endodontics. Hence, this study attempted to show if CP could complement the current therapeutic concepts.

This scientific issue was processed by three studies including in vitro and ex vivo approaches.

In the first study, bactericidal efficacy of CP in different depths of infected dentinal tubules was examined. Dentinal tubules were infected with *Enterococcus faecalis* and treated subsequently with different decontamination methods (control group: rinsing with 5 mL saline 0,9 %; CHX-group: 30 s ultrasonically enhanced irrigation with chlorhexidin gluconate 5 mL; combination group: 30 s ultrasonically enhanced irrigation with chlorhexidin gluconate 5 mL and 30 s CP application). Thereby the combination of CHX and CP was significantly more effective in the overall disinfection than the CHX-group.

The second study analyzed the decontamination effect of CP on dentinal surfaces, because in general dentin coats the endodont and a complete root canal preparation often is not achievable. Two approaches were performed.

In the ex vivo approach caries lesions were bisected and treated in the CHX group with 1 % chlorhexidine gel and in the CP group with 60 s of CP. The CP group showed significant less numbers of germs as the control group. For the in vitro approach, on each surface of the 24 canines, one area of 4 mm x 5 mm was defined and an infection with *Streptococcus mitis* was effected. Then the treatment in the different groups (control group: rinsing with 5 mL 0,9 % saline for 30 s; SRP group: rinsing like in the control group and additionally scaling with a sharp curette; SRP+CP group: performance like in the

SRP-Group, additionally application of CP for 60 s) was implemented. The treatment in the SRP+CP group was significantly more effective.

In the third study, the decontamination effect of CP in infected bone, which could exist during an apical inflammation, was investigated. Different layers were analyzed, whereby the germ number in the CP group (CP application for 60 s) was significantly lower as in the control group (irrigation with 0,9 % saline for 60 s) and in the CHX group (irrigation with 0,2 % CHX for 60 s).

In all studies, CP showed a bactericidal effect, so CP could supplement the current therapeutic concepts.

2. Einführung

2.1 Infektion des Endodonts

Eine Infektion des Endodonts kann allgemein durch die Kommunikation des Dentins mit Biofilmen geschehen, beispielsweise durch eine Caries profunda (1,2).

Bei einem vitalen Zahn resultiert hieraus eine entzündliche Veränderung, die zuerst noch reversible Pulpitis. Bei unbehandeltem progredienten Krankheitsverlauf kann sich eine irreversible Pulpitis entwickeln, die in der weiteren Pathogenese eine Pulpanekrose zur Folge haben kann (3).

Bei persistierender Infektion des Endodonts ist die Entstehung einer Parodontitis apicalis mit Resorption des angrenzenden Knochen möglich (3,4). Besteht eine Parodontitis apicalis über einen längeren Zeitraum ohne Therapie, so ist die Bildung eines bakteriellen Biofilm um den Apex radialis dentis denkbar (5). Diese Läsionen können prinzipiell an allen Verbindungen zwischen Endodont und Parodont entstehen (6). Somit liegt eine bakterielle Kontamination im Dentin, in den Tubuli und abhängig vom Schweregrad der Infektion auch im periradikulären Knochen vor (Abb. 1 a).

2.2 Endodontische Therapie

Als therapeutisches Ziel der endodontischen Behandlung wird die Entfernung der Mikroorganismen aus dem Endodont formuliert (7).

Dieses wird konventionell durch die Kombination von mechanischer Reinigung und chemisch-medikamentöser Desinfektion versucht zu erreichen (8). Die mechanische

Reinigung erfolgt idealerweise durch die Entfernung von vitalem und nekrotischen Gewebe sowie von Biofilmen aus dem Wurzelkanal. Dafür stehen diverse Aufbereitungstechniken zur Verfügung (9).

Etablierte Substanzen für die chemische Desinfektion sind Natriumhypochlorit (NaOCl) und Chlorhexidindigluconat (CHX) (10). Das NaOCl wirkt durch unspezifische Proteolyse auflösend auf Bakterien und organisches Gewebe (11). CHX weist eine positive Ladung auf und kann sich dadurch an die negativ geladene Bakterienoberflächen anlagern. Dies führt zu einer Destabilisierung und Perforation der Zellwand sowie der Zellmembran, wodurch konzentrationsabhängig eine bakterio-statische oder eine bakterizide Wirkung resultiert (12). Sekundäre Effekte sind Interaktionen mit proteolytischen und glykosidischen Enzymen (13).

In einigen Fällen führen die Komplexität und die interindividuellen Unterschiede in der Wurzelkanalanatomie zu einem Therapieversagen, sodass resistente Keime wie z.B. *Enterococcus faecalis* im Kanalsystem verbleiben und durch weiteres Wachstum erneut zu einer entzündlichen Reaktion führen können (14), die als ein Therapieversagen bewertet werden muss.

Daher ist es notwendig, die bestehenden Therapiekonzepte zu ergänzen beziehungsweise neue Ansätze zu entwickeln.

2.3 Prinzip des gewebeverträglichen Kaltplasmas

Der Begriff „Plasma“ bezeichnet den vierten Aggregatzustand. Fügt man einem Gas weiter Energie zu, so resultiert eine Ionisierung der darin befindlichen Atome. Somit wird das Gas elektrisch leitend und der Plasmazustand ist erreicht.

Medizinisch relevante Komponenten des gewebeverträglichen Kaltplasmas sind unter anderem die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies, die UV-Strahlung, das resultierende elektromagnetische Feld sowie die Wärmestrahlung.

Die genannten Komponenten sind sehr wirkungsvoll in der Abtötung von gramnegativen und grampositiven Bakterien. Diese induzieren eine oxidative DNA/RNA-Zerstörung, eine Schädigung der Zellwand und der Zellmembran sowie eine Veränderung der Proteinfaltung in der Zelle mit konsekutivem Funktionsverlust und folgendem Zelluntergang (15). Aufgrund der physikalischen Wirkungsweise ist nicht mit Resistenzen der Mikroorganismen zu rechnen (16).

Des Weiteren bewirken die Komponenten positive Effekte auf Wundheilungsprozesse durch eine Aktivierung von Immunzellen (Induktion von 30 % mehr neutrophilen Granulozyten im Wundgebiet (17)), Freisetzung von β -Defensinen, Förderung der Angiogenese (Förderung der Ausschüttung von z.B. FGF₂ aus Endothelzellen der Gefäße) und Aktivierung von Fibroblasten (TGF- β ₁ und TGF- β ₂) (18).

2.4 Anwendung in der Medizin

In der Dermatologie wird das gewebeverträgliche Kaltplasma bereits erfolgreich in der klinischen Therapie eingesetzt. Ein Beispiel ist die Anwendung an chronischen Wunden. Studien zeigten eine signifikant effektivere Reduktion der Wundkeime unter zusätzlicher Anwendung von KP im Vergleich zu konventionellen Behandlungsprotokollen (19,20).

2.5 Zielstellung

Das Ziel dieser Untersuchungen war, anhand von drei in-vitro-Modellen zu prüfen, ob gewebeverträgliches Kaltplasma das Potenzial besitzen könnte, die bestehenden Therapiekonzepte in der Endodontologie zu ergänzen oder ob sogar ein neuer Therapieansatz denkbar wäre.

Im Endodont befinden sich vielfach auch nach der chemisch-mechanischen Aufbereitung Bakterien in den Dentintubuli, auf Dentinoberflächen und in einigen Fällen auch in periradikulären Knochenläsionen (Abb. 1b) (5). Daher sollte anhand von in-vitro-Modellen untersucht werden, ob kaltes Plasma in diesen Bereichen effektiv Bakterien abtöten könnte. Als Vergleich dienten konventionelle antibakterielle Anwendung.

Untersuchung der infizierten Dentintubuli

Bakterien in den Dentintubuli sind schwer erreichbar für desinfizierende Agenzien. Studien zeigten, dass Bakterien bei einer Infektion des Endodonts bis zu 653 μ m in die Dentintubuli penetrieren konnten (7). Nach Literaturangaben penetrierte passiv ultraschallaktiviertes CHX ca. 209 μ m (21) und NaOCl ca. 300 μ m (22) in die Dentintubuli. Aufgrund dieser Diskrepanz sollte untersucht werden, ob KP eine effektivere Tiefenwirkung aufzeigen könnte.

Der Desinfektionserfolg in den Dentintubuli sollte in drei verschiedenen Eindringtiefen untersucht werden, in jeweils 0-300 μ m, 300-500 μ m und in 500-800 μ m Tiefe.

Untersuchung der infizierten Dentinoberflächen

Hierbei sollte generell untersucht werden, inwiefern bakteriell besiedelte Dentinoberflächen durch gewebeverträgliches Kaltplasma desinfiziert werden können, da Dentin das Material im Endodont ist. Auch nach erfolgter chemisch-mechanischer Aufbereitung bestehen Schlupfwinkel aus Dentin, in denen Bakterien bzw. Biofilme verbleiben (23).

Untersuchung des infizierten Knochens

Die konventionelle endodontische Therapie, bestehend aus mechanischer Aufbereitung und chemischer Desinfektion, bezieht normalerweise nicht das periapikale Gewebe mit ein, im Gegenteil, eine Applikation der konventionellen Agenzien wie NaOCl über den Apex hinaus muss vermieden werden (24). Jedoch befinden sich in einigen Fällen Bakterien im periapikalen Gewebe (23).

Das Ziel bei dieser Untersuchung war, herauszufinden, ob kaltes Plasma eine Keimreduktion in infiziertem Knochen erreichen kann.

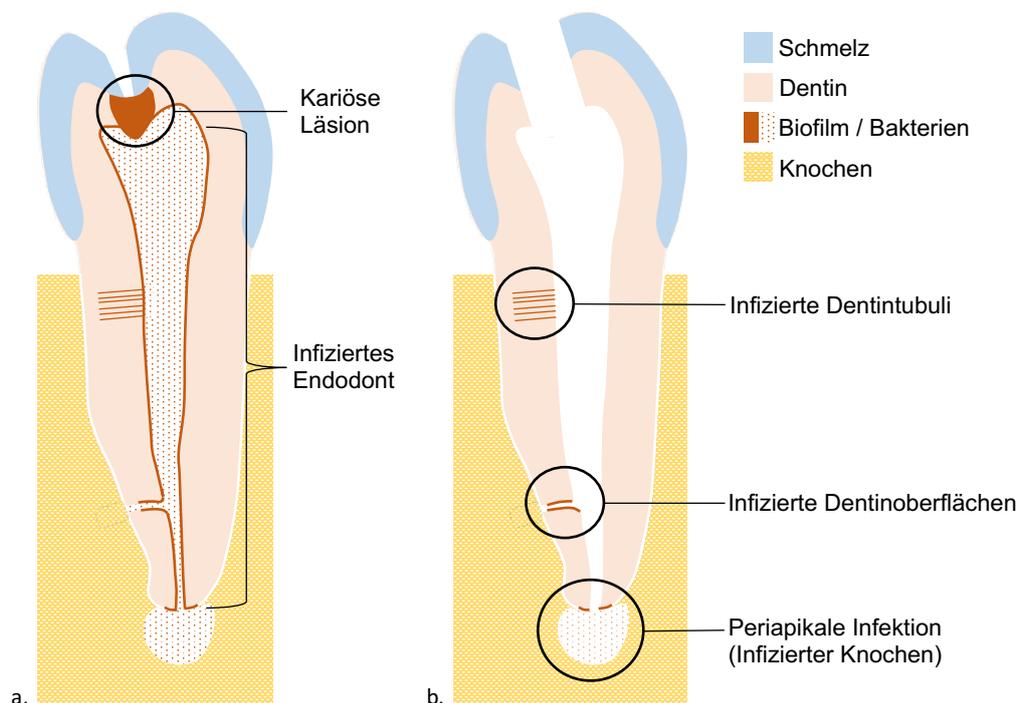


Abb. 1 a Über einen längeren Zeitraum bestehende Infektion des Endodonts durch eine Caries profunda mit konsekutiver Entwicklung einer Parodontitis apicalis.

Abb. 1 b Möglicher Zustand des Endodonts nach chemisch-mechanischer Aufbereitung. Gekennzeichnet sind drei Bereiche, die mit der konventionellen endodontischen Therapie schwierig zu dekontaminieren sind und in denen Bakterien die Therapie überleben können.

3. Methodik

3.1 Entwicklung der in-vitro-Modelle

Zur Bearbeitung der Fragestellung mussten für die drei verschiedenen Bereiche jeweils eigenständige Modelle entwickelt werden, welche in Vorversuchen getestet wurden.

Für die Erstellung von **infizierten Dentintubuli** wurden 32 geeignete menschliche Prämolaren ausgewählt. Diese mussten ein rundes, nicht obliteriertes Lumen, einen geraden Kanalverlauf und durften keine sonstigen unphysiologischen Veränderungen aufweisen. Anschließend erfolgte eine standardisierte Aufbereitung: Die Apices wurden in circa 3 mm Länge abgeschnitten, ebenso wie die Krone, sodass eine exakte Kanallänge von 8 mm resultierte. Eine standardisierte Lumenweite wurde durch Aufbereitung mit einem Gates-Glidden-Bohrer No. I (0,5 mm) gewährleistet. Die nachfolgende Einbettung in Acrylkunststoff (Technovit 4004) erzeugte eine geschlossene Wurzeloberfläche. Mit einem Dentaladhäsiv wurde die apikal und koronal frei liegende Zahnoberfläche versiegelt. Dabei wurde das Wurzelkanallumen nicht mit einbezogen.

Bei den **infizierten Dentinoberflächen** wurden zwei Ansätze definiert, eine in-vitro- und eine ex-vivo-Untersuchung. Für die ex-vivo-Untersuchung wurden von 25 frisch extrahierten Zähnen insgesamt 16 kariöse ICDAS 6 Läsionen ausgewählt, welche ein annähernd symmetrisches Erscheinungsbild aufwiesen. Diese wurden halbiert und die Hälften jeweils einer der beiden Gruppen (s. u.) zugeordnet. Für den in-vitro-Ansatz wurde auf 24 Oberkiefer-Eckzähnen jeweils ein standardisiertes Areal von 4 mm x 5 mm angelegt.

Der in-vitro-Versuch der **infizierten Knochenproben** wurde mit zylindrischen Schweineknöchelblöcken durchgeführt. Dabei betrug der Durchmesser 4 mm und die Länge 3 mm. Zur Vergleichbarkeit mit menschlichem Knochen wurde jeder Versuchsgruppe ein humaner Knochenblock (6 mm x 10 mm x 10 mm) zugeordnet.

Während der Versuchsdurchführung wurden die porcinen Knochenproben in speziell gefrästen Technovit-Blöcken gelagert, sodass 3 Zylinder in einem exakt passenden Slot übereinander angeordnet waren. Daher ergab jeder Knochenzylinder eine Schicht (I 0-3 mm, II 3-6 mm und III 6-9 mm).

Die humanen Knochenblöcke wurden erst nach der Versuchsdurchführung in horizontale Scheiben gesägt, woraus drei Schichten resultierten: I 0-2 mm, II 2-4 mm und III 4-6 mm.

3.2 Bakterielle Besiedelung

Die verwendeten anaeroben Modellkeime wurden vor Versuchsbeginn unter anaeroben Bedingungen angezüchtet. Zur Inkubation wurden die Bakterien in eine sterile Brain-Heart-Infusion (BHI) überführt.

Als Modellkeim für die **infizierten Dentintubuli** wurde *Enterococcus faecalis* gewählt, da dieser in der Literatur als ein Problemkeim bei Therapieversagen beschrieben wurde. Die sterilisierten Proben wurden für sieben Tage in der Bakteriensuspension inkubiert.

Für den in-vitro-Ansatz der **infizierten Dentinoberflächen** wurde *Streptococcus mitis* als geeignet angesehen, wie auch für die in-vitro-Infizierung der **Knochenproben**. Dabei wurden die Dentinoberflächen 48 h und die Knochenproben für 24 h inkubiert.

Nach 24 h wurde bei allen inkubierten Proben 25 % der Suspension entnommen und mit frischer BHI aufgefüllt.

Die für den ex-vivo-Versuch verwendeten kariösen Läsionen waren bereits mit einem Biofilm versehen zum Zeitpunkt der Extraktion. Daher wurden die frisch extrahierten Zähne in steriler BHI gelagert bis zur Versuchsdurchführung, um den Biofilm zu erhalten. Es lag dementsprechend eine Mischflora vor.

3.3 Anwendung der antibakteriellen Agenzien

Nachdem die Besiedelung mit den Bakterien über den jeweils festgelegten Zeitraum erfolgte, wurden die antibakteriellen Agenzien in den definierten Gruppen angewendet. Hierbei lagen individuelle Abläufe bei den einzelnen Modellen vor.

Der KINPen Med[®] wurde in allen Versuchen als Quelle für das KP verwendet.

Infizierte Dentintubuli

Alle Wurzelkanäle wurden zuerst mit 5 mL steriler Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) gespült. Es wurden vier Gruppen zu je acht Wurzelkanälen gebildet:

1. Kontroll-Gruppe: Keine weitere Behandlung erfolgte außer der 5 mL NaCl-Spülung.
2. CHX-Gruppe: 5 mL 2 % CHX wurden durch den Wurzelkanal gespült. Dabei wurde das CHX für 30 s mit Ultraschall aktiviert zur Wirkungssteigerung.
3. KP-Gruppe: Der Plasma-Jet wurde für 60 s im Abstand von 3 mm in den Kanaleingang appliziert.
4. Kombinationsgruppe: Zunächst wurden 5 mL 2 % CHX durch den Wurzelkanal

gespült, welches für 30 s mit Ultraschall aktiviert wurde. Anschließend wurde der Plasma-Jet für 60s im Abstand von 3 mm in den Kanaleingang appliziert.

Infizierte Dentinoberflächen

Bei den infizierten Dentinoberflächen wurde differenziert nach in-vitro- und ex-vivo-Versuch. Dabei wurden verschiedene Agenzien angewendet, acht Dentinoberflächen pro Gruppe:

1. Ex vivo: CHX-Gruppe = Die kariösen Läsionen wurden mit einem CHX-Gel 1 % für 30 s behandelt, welches mit 5 mL NaCl 0,9 % abgespült wurde.
KP-Gruppe = Diese Gruppe wurde zuerst wie die Kontrollgruppe behandelt, anschließend erfolgte eine Applikation des Plasma-Jets für 60 s.
2. In vitro: Kontroll-Gruppe = Die Oberfläche wurde mit 5 mL NaCl-Lösung 0,9 % für 30 s gespült.
SRP-Gruppe = Zusätzlich zur Spülung wie in der Kontrollgruppe erfolgte ein Scaling (SRP) der Oberfläche mit einer scharfen Kürette.
SRP+KP = Zuerst wurde vorgegangen wie in der SRP-Gruppe, anschließend erfolgte die Anwendung des Plasma-Jets für 60 s.

Infizierte Knochenproben

Die infizierten Knochenproben wurden randomisiert in drei Gruppen eingeteilt, wobei jede Gruppe aus acht porcinen und einer humanen Knochenprobe bestand.

1. Kontroll-Gruppe: Die Proben wurden mit einer NaCl-Lösung 0,9 % für 60 s gespült.
2. CHX-Gruppe: Die Proben wurden mit einer CHX-Lösung 0,2 % für 60 s gespült.
3. KP-Gruppe: Die infizierten Knochenzylinder wurden für 60 s mit dem Plasma-Jet behandelt in einem Abstand von 8 mm.

3.4 Materialgewinnung zur mikrobiologischen Untersuchung

Nach der Anwendung der antibakteriellen Agenzien wurde Material von den Proben entnommen, um über mikrobiologische Verfahren die Keimzahl in diesen zu bestimmen. Die Materialgewinnung erfolgte modellspezifisch.

Infizierte Dentintubuli

Gemäß den Überlegungen für das Modell der **infizierten Dentintubuli** wurden drei Schichten mit rotierenden Instrumenten gleichmäßig zirkulär abgetragen:

1. Schicht: 300 µm mit einem Peeso-Reamer No. III (Durchmesser 1,1 mm)
2. Schicht: 500 µm mit einem Peeso-Reamer No. V (Durchmesser 1,5 mm)
3. Schicht: 800 µm mit einem Rosenbohrer 021 (Durchmesser 2,1 mm)

Infizierte Dentinoberflächen

Bei der ex-vivo-Untersuchung wurden die kariösen Läsionen vollständig mit einem sterilen Rosenbohrer 018 exkaviert. Die Materialgewinnung bei der in-vitro-Untersuchung erfolgte mit einer sterilen Skalpellklinge pro Probe, wodurch die oberflächliche Schicht abgetragen wurde.

Infizierte Knochenproben

Für die Materialgewinnung wurden die porcinen Knochenzylinder aus den Slots des Technovit-Blocks entnommen und jeder Knochenzylinder der entsprechenden Schicht wurde separat mit 20 N in vier Durchgängen zermahlen.

Ebenso wurden die drei Scheiben des humanen Knochens mit 20 N in vier Durchgängen zerkleinert.

Alle gewonnenen Probenpartikel der jeweiligen Modelle wurden jeweils in ein Eppendorf-Gefäß mit 1 mL BHI überführt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe erstellt und von einer bestimmten Verdünnung wurden 100 µL auf einer Agar-Platte ausgestrichen.

3.5 Auswertung

Die Auswertung der Agar-Platten erfolgte jeweils mittels Zählung der Kolonie bildenden Einheiten (CFUs) nach 24 h Inkubationszeit unter anaeroben Bedingungen bei 37°C. Aus der Kontroll- und der Versuchsgruppe wurde für die jeweiligen Paare der logarithmische Reduktionsfaktor log RF berechnet: $\log RF = \log (CFU_{\text{Kontrolle}}) - \log (CFU_{\text{Versuchsgruppe}})$ (25). Die statistische Auswertung erfolgte für die Untersuchung der infizierten Dentintubuli, der infizierten Dentinoberflächen und der infizierten Knochenproben mit dem Kruskal-Wallis- und dem Mann-Whitney U Test.

SPSS Statistics 21 wurde verwendet, das Konfidenzniveau wurde auf 95 % festgelegt.

4. Ergebnisse

Einen Überblick über die zusätzliche antibakterielle Wirkung von KP liefert Abb. 2. Nachfolgend werden die einzelnen Versuchsergebnisse aufgeführt.

4.1 Infizierte Dentintubuli

Die Auswertung erfolgte als Vergleich zwischen den jeweiligen Schichten (0-300 µm, 300-500 µm und 500-800 µm), sowie über alle Schichten betrachtet (0-800 µm).

Vergleich über alle Schichten betrachtet (0-800 µm)

Grundsätzlich zeigten alle untersuchten Agenzien signifikant weniger CFUs als die Kontrollgruppe. Hierbei zeigte die Kombination aus CHX und KP den höchsten log RF von 3,56. Die KP-Gruppe wies einen log RF von 3,27 und CHX-Gruppe einen log RF von 2,65 auf. Es bestand nur ein signifikanter Unterschied zwischen der Kombinationsgruppe (CHX und KP) und der CHX-Gruppe.

Vergleich der Einzelschichten

Die untersuchten antibakteriellen Agenzien zeigten in den Schichten 0-300 µm und 500-800 µm signifikant weniger CFUs als die Kontrollgruppe. Der Vergleich zwischen den Einzelschichten ergab folgende Unterschiede:

0-300 µm: Die Kombination aus CHX und KP war in der ersten Schicht signifikant effektiver als die beiden anderen Gruppen.

300-500 µm: Hierbei zeigten die KP- und die CHX-Gruppe ähnliche CFU-Werte, die Werte für die KP-Gruppe waren geringfügig höher. Es resultierten daher keine signifikanten Unterschiede.

500-800µm: In der letzten Schicht war die CHX-Gruppe effektiver als die jeweiligen Vergleichsgruppen, aber nicht signifikant.

Der Vergleich der Schicht-abhängigen logarithmischen Reduktionsfaktoren zeigte, dass nur in der ersten Schicht ein signifikanter Unterschied vorlag. Die Kombination von CHX und KP war in der ersten Schicht signifikant effektiver in der Keimreduktion als die beiden anderen Gruppen. Zwischen den log RF der anderen Schichten lagen keine signifikanten Differenzen vor.

4.2 Infizierte Dentinoberflächen

Bei der Auswertung wurde zwischen dem ex-vivo- und dem in-vitro-Ansatz differenziert:

Ex-vivo-Modell

Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der CHX- und der KP-Gruppe hinsichtlich der CFU-Zahlen. Die durchschnittliche CFU-Anzahl lag bei der CHX-Gruppe bei 4,45 log(CFU/mL) und in der KP-Gruppe bei 2,67 log(CFU/mL). Logarithmische Reduktionsfaktoren per definitionem konnten hierbei nicht errechnet werden, da eine Kontrollgruppe fehlte.

In-vitro-Modell

Zwischen der Kontroll-, der SRP- und der SRP+Plasma-Gruppe bestanden signifikante Unterschiede untereinander. Hierbei konnte die SRP+Plasma-Gruppe alle Keime abtöten, es lag ein medianer CFU-Wert von 0 vor.

Es errechnete sich für die SRP-Gruppe ein log RF von 0,87 und für die SRP+Plasma-Gruppe ein log RF von 3,85.

4.3 Infizierte Knochenproben

Die Auswertung erfolgte bezogen auf die verschiedenen Schichten, erwähnt werden nur signifikante Abweichungen.

Porciner Knochen: Vergleich über alle Schichten betrachtet (0-9 mm)

Hierbei zeigte die Plasma-Gruppe signifikant weniger CFUs als die Kontroll- und die CHX-Gruppe. Allerdings lagen die logarithmischen Reduktionsfaktoren weit unter 1. Für die Plasma-Gruppe resultierte ein log RF von 0,24, für die CHX-Gruppe ein log RF von 0,04.

Porciner Knochen: Vergleich der Einzelschichten

- 0 - 3 mm: Die KP-Gruppe zeigte geringere CFU-Werte, allerdings lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vor.
- 3 - 6 mm: In der mittleren Schicht zeigte die KP-Gruppe signifikant weniger CFU-Werte als die anderen beiden Gruppen.

6 - 9 mm: Ebenfalls wies die KP-Gruppe in der letzten Schicht die geringste Anzahl an koloniebildenden Einheiten auf, wobei nur zur CHX-Gruppe ein signifikanter Unterschied bestand und nicht zur Kontrollgruppe.

Humaner Knochen:

Da pro Gruppe nur eine Probe vorlag, konnte keine statistisch gesicherte Aussage getroffen werden. Aufgrund der Unterschiede in der Probengröße und der Schichtung wäre auch kein Vergleich zwischen den Schichten des humanen und des porcinen Knochens möglich. Jedoch zeigten die ermittelten logarithmischen Reduktionsfaktoren ähnliche Werte wie die der porcinen Knochenproben.

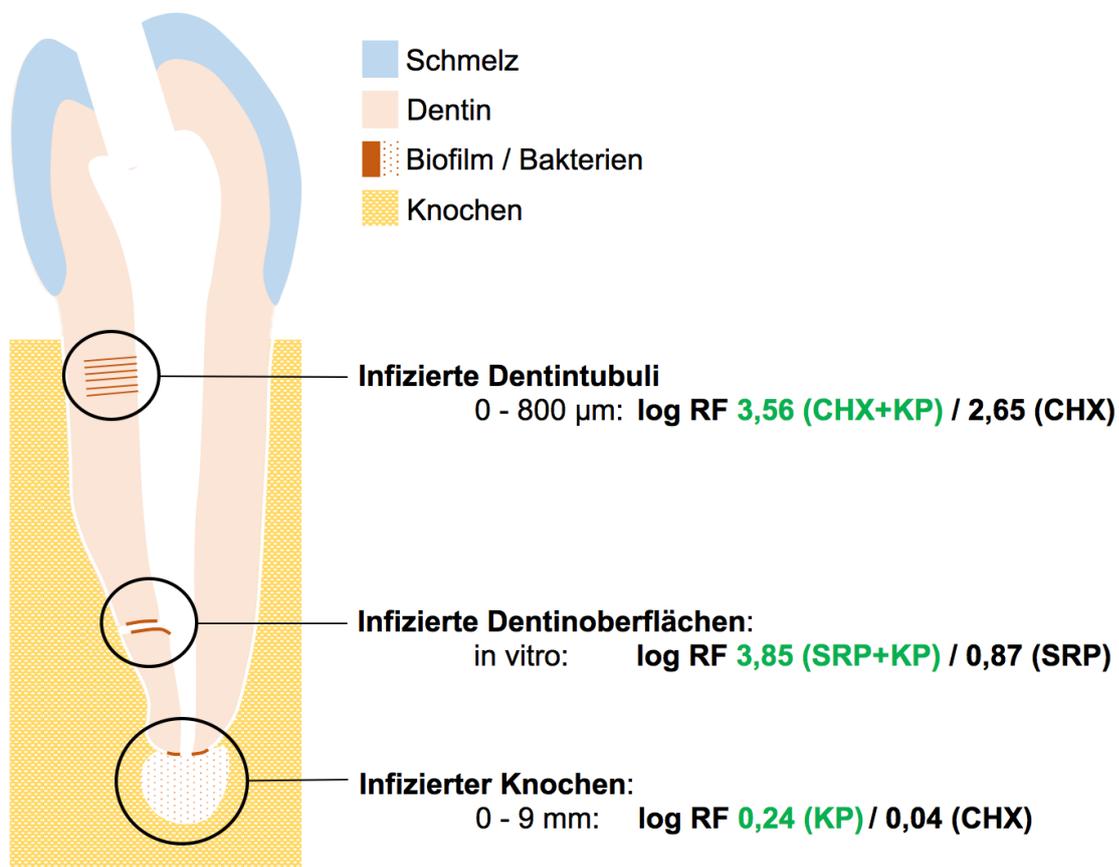


Abb. 2 zeigt als Übersicht die logarithmischen Reduktionsfaktoren (log RF) der effektivsten Gruppen (grün) und daneben die log RF der entsprechenden Vergleichsgruppe (schwarz).

5. Diskussion

5.1 Bewertung der Ergebnisse

Gewebeverträgliches Kaltplasma demonstrierte in allen drei in-vitro-Modellen eine bakterizide Wirkung.

Im Modell 1 der infizierten Dentintubuli wies die Kombination aus CHX und KP die höchste Dekontaminationswirkung auf. Dabei zeigte sich, dass der zusätzliche Effekt des KP durch eine effektivere Keimreduktion in der ersten Schicht bedingt ist. In der ersten Schicht wurde eine 43-fach höhere Bakterienbesiedelung im Vergleich zur zweiten Schicht festgestellt. Eine Studie mit extrahierten Zähnen, die eine chronische apikale Entzündung aufwiesen und nicht behandelt wurden, zeigte, dass die Bakterien nur zu 300 µm in die Dentintubuli eingedrungen waren (26). Daher ist ein bakterizider Effekt in der ersten Schicht 0-300 µm als besonders wichtig zu bewerten.

Betrachtet man die CFU-Anzahl in der letzten Schicht 500-800 µm, so fällt auf, dass die alleinige Wirkung von CHX geringere CFU-Werte aufwies als die Kombination aus CHX und KP. Zu erwarten wäre jedoch, dass beide Gruppen ähnliche Werte zeigen würden wie in der mittleren Schicht, da die Anwendung des CHX in beiden Gruppen gleich erfolgte. Eine Interaktion von CHX und KP dürfte auszuschließen sein, da beide Agenzien unterschiedliche Wirkmechanismen aufweisen, die unabhängig voneinander ablaufen. Diese Ergebnisse sind wahrscheinlich auf die Schwächen des in-vitro-Modells zurückzuführen, welche unter 6.3 diskutiert werden.

Die Betrachtung über alle Schichten (0-800 µm) zeigte, dass die Kombination aus CHX und KP die effektivste bakterizide Methode war.

Ebenfalls zeigte das Modell 2 der infizierten Dentinoberflächen, dass KP im Vergleich zu der jeweiligen Vergleichsgruppe infizierte Dentinoberflächen effektiver dekontaminieren kann. Dieses Modell könnte auf die Situation übertragen werden, in der Bereiche im Wurzelkanal nicht effektiv mechanisch aufbereitet wurden, wie es durch die komplexe interindividuelle Anatomie bedingt sein könnte. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Anwendung von CHX und kaltem Plasma auf Mischinfektionen eine signifikant effektivere Wirkung aufwies als die alleinige Anwendung von CHX. Das durchgeführte SRP des In-vitro-Versuchs lässt sich auch prinzipiell auf die alleinige, unvollständige mechanische Aufbereitung, d.h. ohne die gewünschte Entfernung des Biofilms, übertragen. Auch hierbei war die Kombination mit dem kalten Plasma dem alleinigen SRP überlegen.

Basierend auf diesen Untersuchungen lässt sich konstatieren, dass kaltes Plasma in-vitro die chemisch-mechanische Aufbereitung des Endodonts unterstützen kann.

Ein weiteres Problem stellt die periapikale Entzündung dar, die durch die konventionelle Therapie nicht direkt behandelt wird. Durch das Ausbreitungsverhalten des kalten Plasmas wäre es denkbar, dass sich dieses auf den periapikalen Bereich auswirken könnte, je nachdem wie die Läsion beschaffen ist. Das Modell 3 der infizierten Knochenproben verdeutlichte, dass die Dekontamination von Knochen komplex ist. Konnten in Modell 1 und 2 logarithmische Reduktionsfaktoren im Bereich von 1,78 bis 3,5 erzielt werden, so lagen diese bei Modell 3 zwischen 0,04 und 0,24. Da die direkte Wirkung auf den Knochen nicht die Hauptintention bei der Wurzelkanalaufbereitung ist, wäre bereits eine geringe Keimreduktion im periapikalen Bereich als ein positiver Nebeneffekt zu bewerten.

5.2 Kritische Betrachtung der Versuchsmodelle

Generell besteht die Problematik, dass in-vitro-Modelle nur eine begrenzte Aussagekraft in Bezug auf die Situation in-vivo haben. Die durchgeführten Untersuchungen sollten daher Möglichkeiten des gewebeverträglichen Kaltplasmas für die Anwendung in der Endodontie abschätzen.

Unter natürlichen Bedingungen weisen unbehandelte Wurzelkanäle variable Anatomien des Endodonts auf (27). Aufgrund dieser Tatsache wurden bei dieser Untersuchung die Wurzelkanäle standardisiert aufbereitet, sodass eine kontinuierliche Aufbereitung von einer ISO 50 Größe resultierte. Die Grundlage für dieses Modell bildete das von *Haapasalo et al.* eingeführte in-vitro-Modell (8), welches aber für diesen Versuch modifiziert wurde.

Zusätzlich wurden die Dentintubuli durch die Anwendung von 17 % EDTA-Lösung geöffnet, sodass eine Infektion der Tubuli begünstigt wird. Eine solche Situation liegt unter natürlichen Bedingungen höchstwahrscheinlich nicht vor, sodass hierbei eine untypische Infektion der Dentintubuli erreicht wurde. Daraus ergaben sich Limitationen in der Aussagekraft dieses Modells.

Durch die damit verbundene verbesserte Zugänglichkeit der dreidimensionalen Strukturen des Endodonts in diesem Modell könnte die Desinfektionswirkung einer wässrigen Lösung positiv beeinflusst werden, welche unter realen Bedingungen diese Ergebnisse möglicherweise nicht erzielen würde. Denn die endodontische Aufbereitung

des Kanals richtet sich nach der ursprünglichen Anatomie und verläuft daher konisch verengend in apikaler Richtung und weist somit kein einheitlich weites Lumen auf. In dieser Untersuchung konnte eine Dekontaminationswirkung von CHX in den Dentintubuli bis in eine Tiefe von 800 µm verzeichnet werden. Die Studie von *Vadhana et al.* stellte hingegen eine Eindringtiefe von nur 300 µm fest (21).

Trotz standardisierter Aufbereitung und engen Kriterien für die Auswahl der verwendeten humanen Prämolaren, konnte eine Sklerose der Dentintubuli nicht ausgeschlossen werden. Wahrscheinlich lag dadurch eine unterschiedliche Infektion der Tubuli und eine abweichende Dynamik der antibakteriellen Agenzien vor. Dies könnte eine Erklärung für die schwankenden Werte sein.

Für die Modelle der infizierten Dentinoberflächen und des infizierten Knochens wurden Modellkeime verwendet, die keine typischen Pathogene sind. Die Verwendung von nicht-pathogenen Modellkeimen für endodontische Fragestellungen ist insofern vertretbar, da die Wirkung von KP an verschiedenen Keimen nachgewiesen wurde. Die Übersichtsarbeit von *Scholtz et al.* konnte die Wirkung von Plasma gegenüber Bakterien, Pilzen, Viren und Biomolekülen zeigen (28). Dies ist auf die unspezifische Wirkung des KP zurückzuführen, die u.a. durch reaktive Ionen und UV-Strahlung bedingt ist (15).

Der ex-vivo-Versuch des Modells der infizierten Dentinoberflächen wies den Nachteil auf, dass eine negativ-Kontrollgruppe fehlte. Somit konnte keine Aussage bezüglich des logarithmischen Reduktionsfaktors getroffen werden. Dies ist durch den ex-vivo-Ansatz bedingt und eine weitere Gruppe wäre nicht realisierbar gewesen.

Bemerkenswert ist ebenfalls in Modell 3 der fehlende signifikante Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der CHX-Gruppe. Möglicherweise sind die ähnlichen CFU-Werte in beiden Gruppen durch ein Ausspülen bedingt und weniger durch die unterschiedlichen oder ähnlichen bakteriziden Eigenschaften in Knochengewebe.

5.3 Fazit von anderen Autoren

Die durchgeführten Untersuchungen ergänzen die Studien von anderen Autoren. Es wurde u.a. die bakterizide Effektivität von KP gegenüber *Enterococcus faecalis* in in-vitro-Biofilmen (29), in Kunststoffblock-Modellen (30) und in verschiedenen Abschnitten des Wurzelkanals (koronales, mittleres und apikales Drittel) (31) gezeigt.

Nach Meinung der Autoren ist KP als eine vielversprechende Ergänzung in der endodontischen Therapie anzusehen.

5.4 Ausblick

Die hier untersuchte bakterizide Wirkung des kalten Plasmas ist nicht die einzige vielversprechende Anwendungsmöglichkeit.

Kaltes Plasma kann zum Beispiel die Oberflächeneigenschaften von Dentin verändern. Es wurde gezeigt, dass der Kontaktwinkel nach Behandlung mit kaltem Plasma reduziert werden konnte, wodurch die Hydrophilie zunahm (32). Eine weitere Untersuchung stellte fest, dass durch die vorherige Anwendung von kaltem Plasma der Haftverbund zwischen Dentin und einem Dentaladhäsiv zunahm (33). Möglicherweise könnte die Vorbehandlung eines Wurzelkanals mit kaltem Plasma die Qualität von Wurzelfüllungen verbessern. Insbesondere wenn nicht alle Keime abgetötet werden können ist eine dichte Wurzelkanalfüllung wichtig (34).

Neben der klassischen endodontischen Behandlung mit einer anorganischen Wurzelfüllung besteht der neue Ansatz der regenerativen Endodontie. Dabei wird versucht, im desinfizierten Pulpencavum neues pulpaähnliches Gewebe zu generieren. Bei traumatisierten unreifen bleibenden Zähnen wurde der Erfolg dieses Ansatzes in vielen Fällen nachgewiesen (35). Die Anwendung an bleibenden Zähnen ist bis zum heutigen Zeitpunkt Gegenstand von experimentellen Ansätzen (36). Ein besonders wichtiges Kriterium für den Therapieerfolg bei der regenerativen Endodontie ist die Keimfreiheit des Endodonts. Somit werden an die Dekontaminationsmethoden besonders hohe Ansprüche gestellt. Zusätzlich zu den klassischen Spüllösungen werden weitere Methoden angewendet, wofür der Laser ein Beispiel wäre (37).

Gegenüber allen bisher erwähnten Dekontaminationsmethoden besitzt KP den Vorteil, dass umliegende Wirtszellen positiv, im Sinne einer Wundheilung, beeinflusst werden. Unter anderem werden Stromazellen zur Proliferation angeregt und die Angiogenese gefördert (18). Dies sind gewünschte Effekte bei der regenerativen Endodontie. Momentan werden Wachstumsfaktoren in das Endodont appliziert, um diese Effekte zu erzielen (38). Möglicherweise könnte das KP neben der desinfizierenden Wirkung aufgrund seiner stimulierenden und induzierenden Wirkung auf Gewebe eine Anwendung in der regenerativen Endodontie finden. Hierfür gibt es allerdings noch keine Untersuchungen.

Interessant zu untersuchen wäre außerdem, ob die Eigenschaften und damit der adhäsive Haftverbund in kariös verändertem Dentin durch die Applikation von KP verbessert werden könnte. Dadurch könnte Karies substanzschonender behandelt werden.

Wie in der Einleitung beschrieben, induziert kaltes Plasma eine verbesserte Wundheilung. Daher wäre es denkbar, dass eine periradikuläre Entzündung beschleunigt abheilen könnte.

Auch die Eigenschaften von anorganischen Substraten können modifiziert werden. So konnte der Haftverbund zwischen einer Feldspatkeramik und einem Befestigungskomposit verbessert werden (39). Infolgedessen könnte die Lebensdauer von indirekten Restaurationen verlängert werden.

Zusätzlich verzögerte eine Vorbehandlung mit kaltem Plasma die frühe Adhärenz von *Candida albicans* auf Heißpolymerisaten, welche die Basis für die meisten Dentalprothesen bilden (40). Möglicherweise könnte so die Inzidenz der Prothesenstomatitis gesenkt werden.

Die aufgeführten Beispiele zeigen, dass die Anwendung von kaltem Plasma nicht nur auf einen Bereich in der Zahnmedizin beschränkt ist. Wie in der Einführung erwähnt, wird KP bereits erfolgreich in der Dermatologie angewendet. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass KP in der Malignom-Therapie eingesetzt werden könnte (41). Durch die reaktiven Spezies konnten entartete Zellen von oralen Plattenepithelkarzinomen selektiv abgetötet werden (42).

Daher ist das Prinzip einer Plasmabehandlung in einem interdisziplinären Kontext mit der gesamten Medizin zu verstehen.

Einige Felder in der Plasmazahnmedizin wurden bereits untersucht, doch es gibt viele offene Fragestellungen, die weitere Anwendungsmöglichkeiten offenbaren könnten.

Weitere klinische Studien müssen allerdings auch zeigen, ob diese Ergebnisse eine Praxisrelevanz besitzen und den hohen apparativen Aufwand rechtfertigen.

6. Literatur

1. Rocas, I.N., Lima, K.C., Assuncao, I.V., Gomes, P.N., Bracks, I.V. and Siqueira, J.F., Jr. (2015) Advanced Caries Microbiota in Teeth with Irreversible Pulpitis. *Journal of endodontics*, **41**, 1450-1455.
2. Chavez de Paz, L.E. (2007) Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *Journal of endodontics*, **33**, 652-662.
3. Zero, D.T., Zandona, A.F., Vail, M.M. and Spolnik, K.J. (2011) Dental caries and pulpal disease. *Dental clinics of North America*, **55**, 29-46.
4. Wang, C.Y. and Stashenko, P. (1991) Kinetics of bone-resorbing activity in developing periapical lesions. *Journal of dental research*, **70**, 1362-1366.
5. Ricucci, D. and Siqueira, J.F., Jr. (2010) Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *Journal of endodontics*, **36**, 1277-1288.
6. Sunitha, V.R., Emmadi, P., Namasivayam, A., Thyegarajan, R. and Rajaraman, V. (2008) The periodontal - endodontic continuum: A review. *Journal of conservative dentistry : JCD*, **11**, 54-62.
7. Parmar, D., Hauman, C.H., Leichter, J.W., McNaughton, A. and Tompkins, G.R. (2011) Bacterial localization and viability assessment in human ex vivo dentinal tubules by fluorescence confocal laser scanning microscopy. *International endodontic journal*, **44**, 644-651.
8. Haapasalo, M. and Orstavik, D. (1987) In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *Journal of dental research*, **66**, 1375-1379.
9. Kishen, A., Peters, O.A., Zehnder, M., Diogenes, A.R. and Nair, M.K. (2016) Advances in endodontics: Potential applications in clinical practice. *Journal of conservative dentistry : JCD*, **19**, 199-206.
10. Rocas, I.N., Provenzano, J.C., Neves, M.A. and Siqueira, J.F., Jr. (2016) Disinfecting Effects of Rotary Instrumentation with Either 2.5% Sodium Hypochlorite or 2% Chlorhexidine as the Main Irrigant: A Randomized Clinical Study. *Journal of endodontics*, **42**, 943-947.
11. Estrela, C., Estrela, C.R., Barbin, E.L., Spano, J.C., Marchesan, M.A. and Pecora, J.D. (2002) Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian dental journal*, **13**, 113-117.
12. Basrani, B. and Lemonie, C. (2005) Chlorhexidine gluconate. *Australian endodontic journal : the journal of the Australian Society of Endodontology Inc*, **31**, 48-52.
13. McBain, A.J., Bartolo, R.G., Catrenich, C.E., Charbonneau, D., Ledder, R.G. and Gilbert, P. (2003) Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of in vitro oral bacterial ecosystems. *Applied and environmental microbiology*, **69**, 4770-4776.
14. Peciuliene, V., Reynaud, A.H., Balciuniene, I. and Haapasalo, M. (2001) Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *International endodontic journal*, **34**, 429-434.
15. Lackmann, J.W. and Bandow, J.E. (2014) Inactivation of microbes and macromolecules by atmospheric-pressure plasma jets. *Applied microbiology and biotechnology*, **98**, 6205-6213.
16. Heinlin, J., Morfill, G., Landthaler, M., Stolz, W., Isbary, G., Zimmermann, J.L., Shimizu, T. and Karrer, S. (2010) Plasma medicine: possible applications in dermatology. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*, **8**, 968-976.

17. Arndt, S., Unger, P., Wacker, E., Shimizu, T., Heinlin, J., Li, Y.F., Thomas, H.M., Morfill, G.E., Zimmermann, J.L., Bosserhoff, A.K. *et al.* (2013) 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*, **8**, e79325.
18. Karrer, S. and Arndt, S. (2015) [Plasma medicine in dermatology : Mechanisms of action and clinical applications]. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*.
19. Isbary, G., Morfill, G., Schmidt, H.U., Georgi, M., Ramrath, K., Heinlin, J., Karrer, S., Landthaler, M., Shimizu, T., Steffes, B. *et al.* (2010) A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. *The British journal of dermatology*, **163**, 78-82.
20. Isbary, G., Heinlin, J., Shimizu, T., Zimmermann, J.L., Morfill, G., Schmidt, H.U., Monetti, R., Steffes, B., Bunk, W., Li, Y. *et al.* (2012) Successful and safe use of 2 min cold atmospheric argon plasma in chronic wounds: results of a randomized controlled trial. *The British journal of dermatology*, **167**, 404-410.
21. Vadhana, S., Latha, J. and Velmurugan, N. (2015) Evaluation of penetration depth of 2% chlorhexidine digluconate into root dentinal tubules using confocal laser scanning microscope. *Restorative dentistry & endodontics*, **40**, 149-154.
22. Zou, L., Shen, Y., Li, W. and Haapasalo, M. (2010) Penetration of sodium hypochlorite into dentin. *Journal of endodontics*, **36**, 793-796.
23. Jhajharia, K., Parolia, A., Shetty, K.V. and Mehta, L.K. (2015) Biofilm in endodontics: A review. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, **5**, 1-12.
24. Ben Rejeb, H. and Douki, N. (2015) [Accidental injection sodium hypochlorite during endodontic therapy. Better understand to better manage]. *Odontostomatologie tropicale = Tropical dental journal*, **38**, 50-56.
25. Schmidt-Malan, S.M., Karau, M.J., Cede, J., Greenwood-Quaintance, K.E., Brinkman, C.L., Mandrekar, J.N. and Patel, R. (2015) Antibiofilm Activity of Low-Amperage Continuous and Intermittent Direct Electrical Current. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **59**, 4610-4615.
26. Siqueira, J.F., Jr., Rocas, I.N. and Lopes, H.P. (2002) Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, **93**, 174-178.
27. Vertucci, F.J. (1984) Root canal anatomy of the human permanent teeth. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*, **58**, 589-599.
28. Scholtz, V., Pazlarova, J., Souskova, H., Khun, J. and Julak, J. (2015) Nonthermal plasma--A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnol Adv*, **33**, 1108-1119.
29. Li, Y., Sun, K., Ye, G., Liang, Y., Pan, H., Wang, G., Zhao, Y., Pan, J., Zhang, J. and Fang, J. (2015) Evaluation of Cold Plasma Treatment and Safety in Disinfecting 3-week Root Canal *Enterococcus faecalis* Biofilm In Vitro. *Journal of endodontics*, **41**, 1325-1330.
30. Jablonowski, L., Koban, I., Berg, M., Kindel, E., Duske, K., Schroeder, K., Weltmann, K. and Kocher, T. (2013) Elimination of *E. faecalis* by a new non-thermal atmospheric pressure plasma handheld device for endodontic treatment. A preliminary investigation. *Plasma Process and Polymers*, **10**, 499-505.
31. Ureyen Kaya, B., Kececi, A.D., Guldaz, H.E., Cetin, E.S., Ozturk, T., Oksuz, L. and Bozduman, F. (2014) Efficacy of endodontic applications of ozone and low-

- temperature atmospheric pressure plasma on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Letters in applied microbiology*, **58**, 8-15.
32. Chen, M., Zhang, Y., Sky Driver, M., Caruso, A.N., Yu, Q. and Wang, Y. (2013) Surface modification of several dental substrates by non-thermal, atmospheric plasma brush. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*, **29**, 871-880.
 33. Dong, X., Ritts, A.C., Staller, C., Yu, Q., Chen, M. and Wang, Y. (2013) Evaluation of plasma treatment effects on improving adhesive-dentin bonding by using the same tooth controls and varying cross-sectional surface areas. *European journal of oral sciences*, **121**, 355-362.
 34. Peters, L.B., Wesselink, P.R. and Moorer, W.R. (1995) The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. *International endodontic journal*, **28**, 95-99.
 35. Thibodeau, B. and Trope, M. (2007) Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatric dentistry*, **29**, 47-50.
 36. Saoud, T.M., Huang, G.T., Gibbs, J.L., Sigurdsson, A. and Lin, L.M. (2015) Management of Teeth with Persistent Apical Periodontitis after Root Canal Treatment Using Regenerative Endodontic Therapy. *Journal of endodontics*, **41**, 1743-1748.
 37. Yang, J., Yuan, G. and Chen, Z. (2016) Pulp Regeneration: Current Approaches and Future Challenges. *Front Physiol*, **7**, 58.
 38. Dissanayaka, W.L., Hargreaves, K.M., Jin, L., Samaranayake, L.P. and Zhang, C. (2015) The interplay of dental pulp stem cells and endothelial cells in an injectable peptide hydrogel on angiogenesis and pulp regeneration in vivo. *Tissue engineering. Part A*, **21**, 550-563.
 39. Han, G.J., Chung, S.N., Chun, B.H., Kim, C.K., Oh, K.H. and Cho, B.H. (2012) Effect of the applied power of atmospheric pressure plasma on the adhesion of composite resin to dental ceramic. *The journal of adhesive dentistry*, **14**, 461-469.
 40. Pan, H., Wang, G., Pan, J., Ye, G., Sun, K., Zhang, J. and Wang, J. (2015) Cold plasma-induced surface modification of heat-polymerized acrylic resin and prevention of early adherence of *Candida albicans*. *Dental materials journal*, **34**, 529-536.
 41. Kim, S.J. and Chung, T.H. (2016) Cold atmospheric plasma jet-generated RONS and their selective effects on normal and carcinoma cells. *Scientific reports*, **6**, 20332.
 42. Lee, J.H., Om, J.Y., Kim, Y.H., Kim, K.M., Choi, E.H. and Kim, K.N. (2016) Selective Killing Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma with NO Induced Dysfunction of Epidermal Growth Factor Receptor in Oral Squamous Cell Carcinoma. *PloS one*, **11**, e0150279.

7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sascha André Rudolf Wolfgang Herbst, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „In vitro Untersuchungen zur Anwendung von gewebeverträglichem Kaltplasma in der Zahnmedizin mit Fokus auf endodontologische Fragestellungen“ 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

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Sascha André Rudolf Wolfgang Herbst hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: **Sascha R. Herbst** #, Moritz Hertel #, Husam Ballout, Philipp Pierdzioch, Klaus-Dieter Weltmann, Henrik C. Wirtz, Shady Abu-Sirhan, Eckehard Kostka, Sebastian Paris und Saskia Preissner, **Bactericidal Efficacy of Cold Plasma at Different Depths of Infected Root Canals In Vitro**, The Open Dentistry Journal, 9/2015

Beitrag im Einzelnen: # geteilte Erstautorenschaft

Mitarbeit bei der Formulierung der Fragestellung, der Entwicklung des Experimental Design, der Literaturrecherche, der Durchführung der Vorversuche, der Durchführung der Hauptversuche, Mitarbeit bei der Auswertung der Ergebnisse, der Rasterelektronenmikroskopie und der Verfassung des Papers.

Publikation 2: 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, Clinical Oral Investigations, 1/2016

Beitrag im Einzelnen:

Mitarbeit bei der Entwicklung des Experimental Design, der Literaturrecherche, der Durchführung der Vor- und Hauptversuche, der Verfassung des Papers

Publikation 3: Shady Abu-Sirhan, Moritz Hertel, Saskia Preissner, Henrik Carl Wirtz, **Sascha Rudolf Herbst**, Philipp Pierdzioch, Jan D. Raguse, Stefan Hartwig, **Bactericidal efficacy of cold plasma in processed bone. A new approach for adjuvant therapy of medication-related osteonecrosis of the jaw?**, Clinical Plasma Medicine, 12/2015

Beitrag im Einzelnen:

Mitarbeit bei der Entwicklung des Experimental Design, der Literaturrecherche, der Durchführung der Vor- und Hauptversuche, der Verfassung des Papers.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden

8. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

„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 und Saskia Preissner

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

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

„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 und Saskia Preissner

Clinical Oral Investigations, 2016,

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

„Bactericidal efficacy of cold plasma in processed bone. A new approach for adjuvant therapy of medication-related osteonecrosis of the jaw?“

Shady Abu-Sirhan, Moritz Hertel, Saskia Preissner, Henrik Carl Wirtz, Sascha Rudolf Herbst, Philipp Pierdzioch, Jan D. Raguse, Stefan Hartwig

Clinical Plasma Medicine, 2015, 2212-8166

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cpme.2015.12.001>

9. Lebenslauf

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

10. Publikationsliste

Publikationen

„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 und Saskia Preissner

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

„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 und Saskia Preissner

Clinical Oral Investigations, 2016, DOI 10.1007/s00784-016-1723-5

„Bactericidal efficacy of cold plasma in processed bone. A new approach for adjuvant therapy of medication-related osteonecrosis of the jaw?“

Shady Abu-Sirhan, Moritz Hertel, Saskia Preissner, Henrik Carl Wirtz, Sascha Rudolf Herbst, Philipp Pierdzioch, Jan D. Raguse, Stefan Hartwig

Clinical Plasma Medicine, 2015, 2212-8166

„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 und Moritz Hertel

Journal of Biophotonics, 2016, No. 6, 637–644 (2016)

Kongressbeiträge

„Einfluss von Kaltplasma auf die Keimzahlen infizierter Wurzelkanäle“

Sascha Herbst, Husam Ballout, Eckehard Kostka, Saskia Preissner

Posterpräsentation im Rahmen der 2. Gemeinschaftstagung der Deutschen

Gesellschaft für Zahnerhaltung und der Deutschen Gesellschaft für Endodontologie

und zahnärztliche Traumatologie mit der Deutschen Gesellschaft für

Präventivzahnmedizin und der Deutschen Gesellschaft für Restaurative und

Regenerative Zahnerhaltung am 14. November 2015

11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Priv.-Doz. Dr. Saskia Preissner für die Überlassung dieses interessanten Themas. Die Zusammenarbeit hat mir neben reichlichen Erkenntnissen viel Freude bereitet.

Mein Dank gilt natürlich auch unserer Plasma-Arbeitsgruppe, durch die das ganze Projekt lebte.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Herbert Renz für die Anfertigung der REM-Bilder.

Frau Carola Schweynoch und Herrn Rainer Toll danke ich für die Hilfe und freundliche Unterstützung im Labor.