

Aus der Klinik für Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

***Ex vivo* Studie zum Vergleich dreier kalter
atmosphärischer Plasmaquellen zur Biofilmentfernung auf
mikrostrukturierten Titanoberflächen**

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

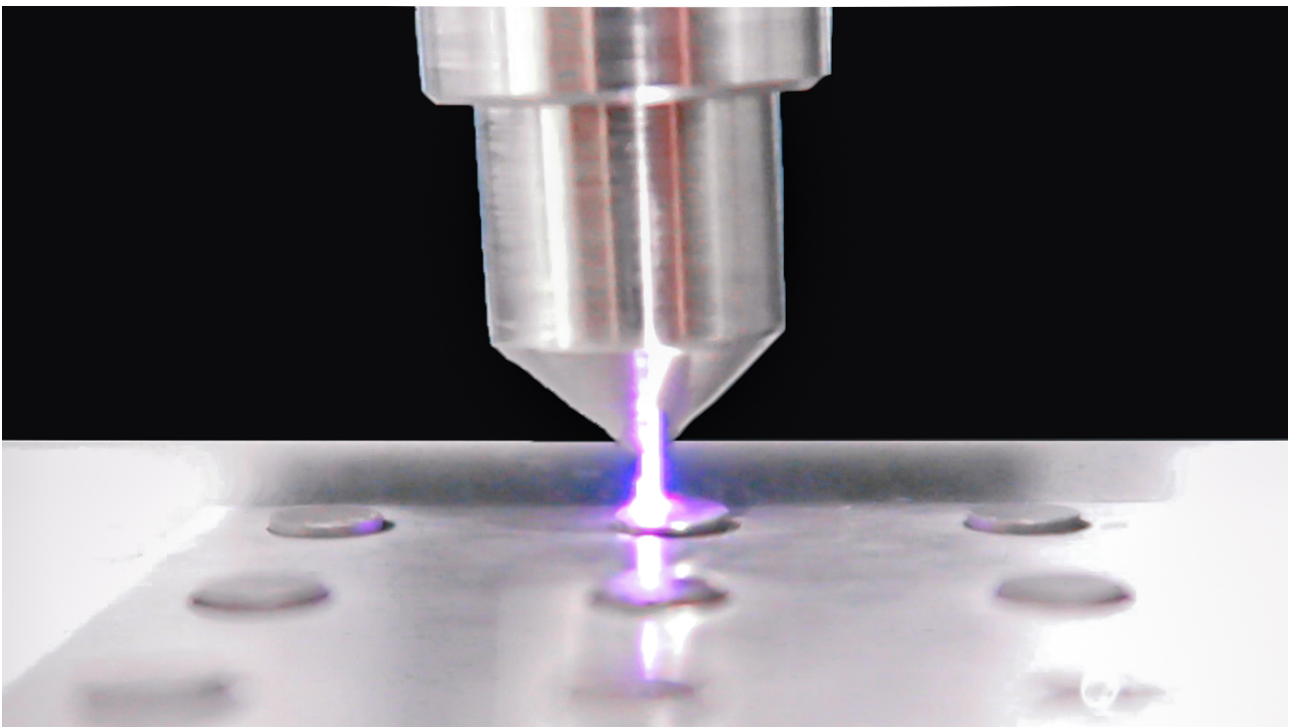
vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ann Cathrin Pöhlmann

aus Hamburg

Datum der Promotion: 21.06.2020



Meiner Familie gewidmet,
insb. Dr. med. Michaela Pöhlmann

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungen	7
1. Abstract	10
1.1 Deutsche Fassung	10
1.2 English version	12
2. Einleitung	13
2.1 Definition und Pathogenese von Periimplantitis	14
2.2 Traditionelle Therapiemaßnahmen zur Implantat - Säuberung	16
2.3 Begriffsdefinition und physikalische Grundlagen von Plasma	17
2.4 Systeme der Plasmagenerierung	18
2.5 Biomedizinische Anwendungsfelder und Grundlagen der Plasmawirkung	23
2.6 Plasmawirkung auf Mikroorganismen und Biofilme	24
2.7 Plasmawirkung auf titanen Implantatoberflächen	27
2.8 Plasmawirkung auf Wundheilung	28
3. Material und Methodik	31
3.1 In vivo Biofilmentwicklung	31
3.2 Anti - Biofilm Behandlung	34
3.2.1 Plasma Behandlung, mechano - antimikrobielles Verfahren	34
3.2.2 Absprühen mit Luft - Wasser - Gemisch	36
3.3 Mikrobiologie	36
3.4 Fluoreszenzmikroskopie (live/dead staining)	37
3.5 Rasterelektronenmikroskopie (REM)	38
4. Ergebnisse	39

4.1 Mikrobiologie	39
4.2 Fluoreszenzmikroskopie (live/dead staining)	41
4.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)	44
4.4 Gegenüberstellung der drei Plasmaquellarten	47
5. Diskussion	50
5.1 Diskussion der Ergebnisse	50
5.2 Kritische Betrachtung der Versuchsmodelle und Untersuchungsmethoden	56
5.3 Fazit anderer Autoren	59
5.4 Perspektiven	59
6. Schlussfolgerung	64
7. Literatur	65
Eidesstattliche Versicherung	75
Lebenslauf	77
Publikationsliste	78
Danksagung	79

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1	Direktes Plasma - System PlasmaDerm® (Cinogy, Duderstadt, Deutschland)
Abbildung 2	Indirektes Plasma - Jet-System kINPen® MED (neoplas tools, Greifswald, Deutschland)
Abbildung 3	Indirektes mikrowellenbetriebenes Plasma - Jet - System des IOM Leipzig
Abbildung 4	Exemplarische Bestrahlung von Titanprobenkörpern mit Mikrowellen - betriebenem Plasma - Jet - System
Abbildung 5	Indirektes mikrowellenangeregtes Plasma - Jet - System des IOM Leipzig
Abbildung 6	Oberkiefer Alginatabdrücke in Abformlöffeln
Abbildung 7	<i>Obere Reihe:</i> Individuelle Oberkiefer Superhartgipsmodelle, <i>Untere Reihe:</i> Oberkiefer Alginatabdrücke in Abformlöffeln
Abbildung 8	Tiefziehfolien auf Oberkiefer Superhartgipsmodellen
Abbildung 9	Miniplastschiene mit durch Abdrucksilikon befestigten Titanplättchen auf Oberkiefer Superhartgipsmodell
Abbildung 10	Exemplarische Bestrahlung von Titanprobenkörpern mit Mikrowellen - betriebenem - Plasma - Jet - System
Abbildung 11	Beispielhafter, standardisierter Kontaktinokulationschritt eines Titanprüfkörpers auf Blutagarplatte
Abbildung 12 a - e	Bakterienwachstum auf Rodac - Platten nach anti - Biofilm Behandlung
Abbildung 13 a - j	Ausschnittsvergrößerung Bakterienwachstum auf Rodac - Platten
Abbildung 14 a - e	Auswahl FM - Analyse von drei Titanprüfkörpern
Abbildung 15 a - e	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Biofilmproben (je 2000fache Vergrößerung)
Abbildung 16 a - c	Bakterienwachstum CAP I - III
Abbildung 17 a - c	FM - Analyse CAP I - III

Abbildung 18 a - c	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Biofilmproben (2000fache Vergrößerung) CAP I - III
Tabelle 1	Ergebnisse der mikrobiologischen Kultur, Fluoreszenzmikroskopie und REM Analyse

Abkürzungen

<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
ALP	alkalische Phosphatase-Aktivität
APP	atmospheric pressure plasma (atmosphärisches Plasma)
Ar	Argon
<i>B. cenocepacia</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BOP	bleeding on probing (dt. Blutung auf Sondieren)
CAP	cold atmospheric pressure plasma (dt. kaltes atmosphärisches Plasma)
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CHX	Chlorhexidine-bis-Gluconat
COX 2	Cyclooxygenase 2
DBD	dielectric barriere discharge (dt. dielektrische Glimmentladung)
DNA	Desoxyribonucleic acid (dt. Desoxyribonukleinsäure)
Dt.	zu deutsch
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (dt. Ethylendiamintetraessigsäure)
Eng.	zu englisch
Er:YAG - Laser	Erbium doped yttrium aluminium garnet - Laser
FM	Fluoreszenzmikroskopie
GBR	guided bone regeneration (dt. gesteuerte Knochenregeneration)
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
H	Wasserstoff
He	Helium
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMDS	1,1,1,3,3,3-Hexamethyl-disilazane

IL-1β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IOM-Institut Leipzig	Leibniz Institut für Oberflächenmodifizierung Leipzig, Deutschland
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MMP1	Matrix Metalloproteinase 1
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
N	Stickstoff
NaOCI	Natriumhypochlorid
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCNS	Proliferating cell nuclear antigen (dt. proliferierendes zelluläres nukleäres Antigen)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PUSH-Score	Pressure Ulcer Scale for Healing (dt. Druckulzera Skala für Heilung)
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RODAC	eng. <i>replicate organism detection and counting imprinting technique</i>
ROS	reactive oxygen species (dt. reaktive Sauerstoffspezies)
RONS	reactive oxygen and nitrogen species (dt. reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies)
RNA	Ribonucleic acid (dt. Ribonukleinsäure)
RNS	reactive nitrogen species (dt. reaktive Stickstoffspezies)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>S. sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
sL*min⁻¹	Standardliter /min
ST	Sondierungstiefe

TNFα	tumor necrosis factor α (dt. Tumornekrosefaktor α)
TTP	tissue tolerable plasma (gewebeverträgliches Kaltplasma)
U	Stromspannung (V)
UV	Ultraviolett

1. Abstract

1.1 Deutsche Fassung

ZIELSTELLUNG

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war es, drei verschiedene kalte atmosphärische Plasmaquellen auf die Entfernung von 72-h-oralem Biofilm auf Titanoberflächen zu testen. Es wurde angenommen, dass kaltes atmosphärisches Plasma die Biofilmbedeckung signifikant reduzieren kann und sich die Plasmaquellen in ihrer Effektivität signifikant unterscheiden.

MATERIAL UND METHODIK

In vivo Biofilm wurde auf sandgestrahlten und säuregeätzten Titanplättchen (n=40) entwickelt, die angebracht auf Minioplastschienen für 72h von acht Freiwilligen getragen wurden. Die Probenkörper wurden randomisiert in fünf Gruppen unterteilt: CAP I (i) erhielt indirekte Plasmaapplikation, CAP II (ii) erhielt direkte Plasmaapplikation, CAP III (iii) erhielt Mikrowellen betriebene gepulste Plasmaapplikation (je 90 s). Die CHX Gruppe (iv) wurde mit einer Kürette gereinigt und mit Chlorhexidin abgespült. Die Biofilme der Kontrollgruppe (v) erhielten keine Behandlung. Nach der Behandlung wurden alle Probenkörper für 10 s mit einem dentalen Luft/Wasser Spray abgesprüht (2 bar). Die Vitalität der Mikroorganismen wurde mittels Kultivierung auf Agar-Platten für 24h und 48h festgestellt. Das Vorhandensein von Biofilm und dessen Quantität auf den Titanprobenkörpern wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie (FM) über live/dead staining (FM) untersucht. Die Qualität des Biofilms wurde exemplarisch durch Rasterelektronenmikroskopie analysiert (REM).

ERGEBNISSE

Alle behandelten Proben zeigten ein reduziertes Wachstum auf den Agar-Platten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die FM Analyse zeigte eine signifikant niedrigere Biofilmbedeckung in allen behandelten Proben im Vergleich zur negativen Kontrollgruppe (T-test, $p < 0.05$). Unter den Plasmabehandlungsgruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen CAP II und CAP III ($p = 0.032$). Die Analyse mittels REM zeigte einen desintegrierten Biofilm in allen Testgruppen.

SCHLUSSFOLGERUNG

Kaltes atmosphärisches Plasma reduziert und desintegriert oralen Biofilm. Adjuvante Applikation von CAP könnte zu einer effektiveren antimikrobiellen Therapie von Periimplantitis führen.

1.2 English version

OBJECTIVES

The aim of the present experimental study was to test three different plasma sources on their removal capability of 72-h-oral biofilms on titanium surfaces. It was hypothesized that the application of cold atmospheric plasma lowers biofilm coverage significantly and that the plasma sources differ significantly in efficiency.

MATERIAL AND METHODS

In vivo biofilms were formed on sand blasted and acid etched titanium discs (n=40) mounted on splints worn for 72h by eight volunteers. Specimens were randomly divided into five groups: CAP I (i) received indirect plasma application, CAP II (ii) received direct plasma application, CAP III (iii) received microwave driven pulsed plasma application (90 s each). CHX group (iv) was cleaned with a curette and rinsed with chlorhexidine. Biofilms of a control group (v) received no treatment. After treatment, all specimens were rinsed for 10 s using a dental air/water spray (2 bar). Vitality of microorganisms was detected by cultivation on agar plates for 24h and 48h. The presence of biofilms and their quantity on the titanium samples was investigated by fluorescence microscopy (FM) using live/dead staining. Biofilm quality was exemplarily analyzed by scanning electron microscopy (SEM).

RESULTS

All treated samples showed a reduced growth on agar plates when compared to the control group. FM analysis showed significantly lowered biofilm coverage in all treatment groups compared to the negative control group (T-test, $p < 0.05$). Within the plasma treatment groups, there was a significant difference between CAP II and CAP III ($p = 0.032$). Microstructural analysis showed disintegrated biofilms in all test groups.

CONCLUSION

Cold atmospheric plasma reduces and disintegrates oral biofilms. Adjuvant application of CAP could lead to more effective antimicrobial therapies of periimplantitis.

2. Einleitung

Plasma ist ein ionisiertes Gas, der sogenannte vierte Aggregatzustand [1, 2]. Es besteht zu verschiedenen Anteilen aus Elektronen, neutralen und ionisierten Atomen, sowie neutralen oder geladenen Molekülen [1]. Der durch Plasmabehandlung ausgelöste vielfältige 'Effekt-Cocktail' auf biologisches Material oder Gewebe beruht auf dessen geladenen Partikeln, chemisch reaktiven Spezies, z.B. reaktiven Sauerstoffspezies (eng.: reactive oxygen species (ROS)), reaktiven Stickstoffspezies (eng.: reactive nitrogen species (RNS)), Hitze und UV-Strahlung [1, 3-5].

Das neu entstandene Gebiet der Plasmamedizin, eine Kombination aus Plasmaphysik, Biowissenschaften und Medizin, erfährt eine rasante Entwicklung. Es stellt aufgrund seiner Vielfältigkeit ein aussichtsreiches Therapiekonzept zur Bakterieninaktivierung und Biofilmbeseitigung sowie Bearbeitung von Oberflächen dar [5-7]. Neben mikrobiziden und viruziden Effekten ist in der klinischen Plasmaanwendung auch eine Stimulierung von körpereigenen Heilungsmechanismen möglich [1]. Diese Effekte haben nicht nur unabhängige Funktion, sondern sind darüber hinaus in der Lage, synergistisch zu wirken. Daraus ergibt sich die Möglichkeit eines einzigartig optimierten Therapieansatzes.

Weltweit steigt die Zahl der inserierten dentalen Implantate und damit auch deren epidemiologische Bedeutung als Therapie zum Ersatz fehlender Zähne in verschiedensten klinischen Situationen [8]. Allein in Deutschland werden jährlich 1,3 Millionen Implantate (Stand 2016) mit stark steigender Tendenz gesetzt [9]. Häufig sind Implantate die einzige Möglichkeit zur festsitzenden Versorgung von Freiersituationen und zahnlosen Kiefern. Darüber hinaus können sie zum Ersatz einzelner Zähne ohne zusätzlichen Verlust von Zahnhartsubstanz oder zur Retentionserhöhung komplizierter prothetischer Versorgungen eingesetzt werden [10]. Das komplexe Konstrukt der Mundhöhle als Grenzfläche der äußeren und inneren Körperoberfläche, Ort der Nahrungsaufnahme, des Immunsystems, sowie Habitat verschiedenster Bakterien stellt einen hohen Anspruch an dentale Implantate dar.

Periimplantäre Entzündungen gehören zu den häufigsten Komplikationen nach Insertion dentaler Implantate. Sie befallen das umgebende Hart- wie Weichgewebe und können zum Verlust des Implantats führen [8]. Bis zu 56% der inserierten

Implantate entwickeln eine Periimplantitis [11]. Traditionelle therapeutische Ansätze zielen auf die mechanische und/oder antibiotische Desintegration von Biofilmen auf infizierten Implantatoberflächen ab. Außer der maximalinvasiven Explantation besteht zur Zeit keine zuverlässige Therapie periimplantärer Erkrankungen [8, 9, 12, 13]. Die Größe der dabei entstehenden Knochendefekte macht die erneute Implantation häufig unmöglich. Darüber hinaus besteht durch den vielfältigen Einsatz von Antibiotika in der Periimplantitistherapie die Gefahr von weiter steigenden Antibiotikaresistenzen [14].

Im Rahmen dieser *ex vivo* Studie sollte der Effekt dreier unterschiedlicher kalter, atmosphärischer Plasmaquellen (eng. cold atmospheric pressure plasma, CAP) auf die Biofilme infizierter Titanoberflächen untersucht werden. Es wurde angenommen, dass CAP-Quellen die Kapazität besitzen, eine Biofilmbedeckung signifikant zu reduzieren und Biofilm vollständig zu desintegrieren.

2.1 Definition und Pathogenese von Periimplantitis

Periimplantäre Entzündungen werden nach ihrem klinischen Phänotyp, analog zu Gingivitis oder Parodontitis des Parodontiums natürlicher Zähne, als periimplantäre Mukositis oder Periimplantitis kategorisiert [15-17]. Der Übergang zwischen beiden ist oft fließend und mit klinisch - diagnostischen Mitteln nicht klar abzugrenzen [18].

Periimplantäre Mukositis beschreibt den bakteriell bedingten, reversiblen, entzündlichen Prozess des periimplantären Weichgewebes mit Rötung, Schwellung, sowie Blutung auf Sondieren (eng. bleeding on probing, BOP). Periimplantitis dagegen ist als progressive, irreversible Erkrankung des periimplantären Hart- und Weichgewebes mit Knochenresorption, verringerter Osseointegration, sowie erhöhter Taschen- und Pusbildung definiert [9, 12, 16, 17, 19].

Ätiologischer Faktor für die Entstehung einer periimplantären Entzündungen ist die Bildung oraler Biofilme auf Oberflächen dentaler Implantate und Suprakonstruktionen (Metalle und Legierungen, Keramiken, Polymere) [9, 19]. Diese werden an der Grenzfläche von harter Oberfläche und biologischer Flüssigkeit von mikrobiellen Gemeinschaften gebildet. Sie bestehen neben Mikroorganismen aus Exopolysaccharidmatrix, Proteinen und Nukleinsäuren. Die Entwicklung und Reifung oraler Biofilme läuft in verschiedenen Phasen ab [20, 21]. Innerhalb weniger Minuten bildet

sich die sogenannte Pellikelschicht aus adsorbierten Salivationsproteinen, Glykoproteinen und Muzin. In den nächsten Minuten bis einigen Stunden heften sich auf der Pellikeloberfläche Bakterien an, teilen sich und rekrutieren weitere planktonische Zellen. So entsteht ein mehrschichtiger Biofilm durch bakterielles Wachstum und Co-Adhärenz weiterer Bakterien [21]. Die Extrazellulärmatrix der Plaque reift als Netzwerk aus wasserlöslichen- und unlöslichen Glukanen, die von bakteriellen Glykosyltransferasen synthetisiert werden. Der entstandene etablierte und reife orale Biofilm ist eine dreidimensionale strukturierte Gemeinschaft vieler verschiedener mikrobieller Spezies [21].

Die ausgezeichnete Biokompatibilität von Titan als Implantatmaterial fördert die Adsorption von Osteoblasten und Fibroblasten, jedoch genauso von biomolekulären Pellikeln und damit der Akkumulation von Mikroorganismen auf selbigen Oberflächen [20, 22].

Lokale Faktoren, die eine Biofilmmakkumulation begünstigen, wie z.B. verbliebene Zementreste im periimplantären Sulkus ('Zementitis') oder das Fehlen einer keratinisierten Mukosa, können neben systemischen Risikofaktoren wie Rauchen, systemischen Erkrankungen (z.B. Diabetes mellitus, kardiovaskuläre Erkrankungen, Immunsuppression), parodontalen Vorerkrankungen oder dem Geschlecht, Auslöser beziehungsweise Unterhalter des ursächlichen Pathomechanismus sein [8, 9, 17, 19]. Darüber hinaus können verschiedene iatrogene Faktoren (z.B. Implantatfehllage, insuffiziente prothetische Versorgung) eine periimplantäre Infektion begünstigen [12].

Die Immunantwort auf die involvierten Pathogene ist grundsätzlich vergleichbar mit der inflammatorischen Reaktion an natürlichen Zähnen, begrenzt auf das suprakrestale Weichgewebsinterface oder übergreifend auf das knöcherne Implantatlager [11]. Ohne Therapie kann die durch Periimplantitis resultierende Knochendegeneration bis zum Implantatverlust führen. Darüber hinaus werden systemische Auswirkungen der periimplantären Entzündung über die Blutbahn auf das Herz-Kreislauf-System diskutiert [8, 9, 23, 24].

2.2 Traditionelle Therapiemaßnahmen zur Implantat - Säuberung

Konservative, chirurgische (resektive oder regenerative) Maßnahmen zur Therapie periimplantärer Entzündungen zielen auf die Destruktion oraler Biofilmbedeckung auf Implantatoberflächen ab [8, 9].

Zu den konservativen (nicht-chirurgischen) Maßnahmen zählen die mechanische Reinigung, Glättung und Politur von Implantatoberflächen mit Handküretten verschiedener Materialien (z.B. Teflon, Carbon, Plastik oder Titan), häufig in Kombination mit antimikrobiellen Substanzen (z.B. Chlorhexidingluconat, CHX) [8, 9, 25, 26]. Darüber hinaus kommen Ultraschallsysteme oder abrasives Air-Polishing mittels Glycinpulver zur Anwendung [8, 9, 27]. Die mikrostrukturierte Oberflächentextur der Implantate stellt dabei einen erschwerenden Faktor dar [25]. Weiterhin kann die mechanische Behandlung zum Aufrauen oder sogar Verlust der oberflächlichen Mikrotextur führen [8, 28]. Diese ist jedoch mitentscheidend für den Erfolg der Osseointegration von Implantaten [28]. Zudem war nach Anwendung von Air Polishing auf Implantatoberflächen die Zellantwort vitaler Zellen im Vergleich mit solchen auf sterilen Oberflächen reduziert [29].

Eine oberflächenschonendere Alternative ist die Dekontamination mittels Lasertherapie (z.B. erbium - doped yttrium aluminium garnet - Laser (Er: YAG - Laser), photodynamischer Diodenlaser) [8, 9]. Eine *in vivo* Studie zeigte jedoch den Wiederanstieg klinischer Periimplantitisparameter (eng. bleeding on probing, BOP, dt. Bluten auf Sondieren) 12 Monate post-Er:YAG-Laser-Monotherapie [27, 30]. Obwohl Air - Polishing- sowie Er - YAG - Lasertherapie initial klinische Periimplantitisparameter (BOP- und ST-Reduktion) herabsenken konnten, führten letztendlich beide Therapieformen nicht zu einer Reduktion der Keimbelastung [31].

Der adjuvante Einsatz von lokal oder systemisch eingesetzten Antibiotika (z.B. Minocyclin, Doxycyclin, adjuvante one - shot Gabe) kann die Effektivität von konservativen und chirurgischen Therapievarianten zwar in einigen Fällen erhöhen, ist jedoch als Monotherapie keine Option [8, 32]. Zudem zeigen sich Antibiotika häufig ineffektiv. Es besteht die Gefahr einer weiteren Zunahme von Antibiotikaresistenzen bei falscher oder ungenügender Anwendung [9, 14].

Die chirurgische Therapie besteht aus resektiven (Eliminierung von periimplantären Läsionen, Lappenoperationen, Ostektomie, Osteoplastik, Implantoplastik) und regenerativen (Defektauffüllung, Membranen, GBR (eng. guided bone regeneration), Knochenersatzmaterial) Verfahren und ist vor allem bei schwereren Fällen von Periimplantitis die effektivere Option [8, 9, 33]. Nachteilig erweist sich bei allen chirurgischen Therapieansätzen die erhöhte postoperative Rezessionsrate der Mukosa, vor allem in ästhetisch wichtigen Bereichen [8, 9].

Gegenwärtig existiert kein optimales Therapiekonzept für Periimplantitis. Aktuelle Empfehlungen legen die Dekontamination exponierter Implantatoberflächen durch Kombination mechanischer (Biofilmreduktion) und chemischer (Reduktion und Inaktivierung des Biofilms) Behandlung in den Fokus der Therapie [8, 9, 33]. Bisher stellt jedoch nur die maximalinvasive Explantation ein zuverlässiges Therapiemittel dar [13]. Die Größe der dabei entstehenden Knochendefekte erlaubt dabei aber häufig keine erneute Implantation [13].

2.3 Begriffsdefinition und physikalische Grundlagen von Plasma

Definitionsgemäß handelt es sich bei Plasma um ein partiell oder vollständig ionisiertes Gas. Neben fest, flüssig und gasförmig stellt es den sogenannten vierten Aggregatzustand dar. Der heute verwendete Begriff 'Plasma' wurde erstmals 1928 vom US - Amerikaner Irving Langmuir verwandt [1, 2].

Ein Plasma setzt sich zu variierenden Anteilen aus Elektronen, neutralen und ionisierten Atomen, sowie neutralen oder geladenen Molekülen zusammen. Diese werden nach ihrer Temperatur, dem herrschenden Druck, ihrer emittierten Strahlung (z.B. UVB) und der Fähigkeit zur Induktion elektromagnetischer Felder unterteilt. Plasma wird entsprechend der Druckverhältnisse seiner Herstellung klassifiziert in Niedrig-, atmosphärisches oder Hochdruckplasma. Diese können weiter in thermische bzw. heiße Plasmen und nicht-thermische bzw. kalte Plasmen unterteilt werden.

Plasma entsteht, wenn ein Gas durch Energiezufuhr in Form von Wärme oder starken elektrischen Feldern in einen höherenergetischen Aggregatzustand überführt wird [2]. Kommt es hierbei zu einer weitgehenden bis vollständigen Ionisation, resultiert heißes

Plasma (> 40 bis mehrere tausend $^{\circ}\text{C}$). Findet nur eine partielle Ionisierung ($< 0,1\%$) statt, entsteht kaltes Plasma ($30 - 40\text{ }^{\circ}\text{C}$) [1]. In heißem Plasma haben Elektronen und Ionen die gleiche Energie und stehen damit in einem thermodynamischen Gleichgewicht. Kaltes Plasma hingegen ist durch ein Ungleichgewicht an höherer Energie von Elektronen zu kalt bleibenden Ionen und Neutronen charakterisiert, wodurch dessen größere Reaktivität resultiert [4, 5].

Das verwendete Generierungsmedium kann Umgebungsluft, ein künstliches Gasgemisch (z.B. Ar / O_2), oder reines Gas (z.B. Ar, He, Ne, N_2) sein [1]. Dessen chemische Zusammensetzung ist ausschlaggebend für die Reaktionen, die das entstehende Plasma in Materie auslöst [1]. Weiteren Einfluss haben Expositionsdauer und physikalische Gegebenheiten der verwendeten Plasmaquelle (z.B. direkte versus indirekte Plasmaquellen).

2.4 Systeme der Plasmagenerierung

Zur biomedizinischen Anwendung wurden verschiedene Systeme zur Generierung von nicht - thermischem Plasma unter Atmosphärendruck (CAP) entwickelt [1]. Man unterscheidet nach Art der physischen Anwendung direkte und indirekte Plasmaquellen. Die am häufigsten genutzte Methode zur Generierung von CAP ist die Ionisation eines neutralen Gases durch Applikation eines starken elektromagnetischen Feldes [34].

Das in Deutschland zu therapeutischen Zwecken am Menschen zugelassene System PlasmaDerm[®] (Cinogy, Duderstadt, Deutschland) gehört zur Gruppe der direkten Plasmaquellen. Deren Prinzip beruht auf der Erzeugung von artifiziellem Plasma, das in der Raumluft zwischen einer Hochspannungselektrode und einer geerdeten Elektrode erzeugt wird (dielectric barriere discharge, DBD, zu deutsch: dielektrische Glimmentladung). Eine Steuerungseinheit und ein Handstück beinhalten alle zugehörigen technischen Komponenten (Abbildung 1). Es existiert darüber hinaus ein kabelloser Prototyp, dessen Handstück alle nötigen Elemente beinhaltet. Dieser steht allerdings noch nicht kommerziell zur Verfügung [3].

Zu den indirekten Plasmaquellen zählt der ebenfalls zur therapeutischen Anwendung zugelassene kINPen[®] MED (neoplas tools, Greifswald, Deutschland). Das zu den

sogenannten Plasma - Jets zählende System generiert Plasma zwischen zwei Elektroden und leitet es über ein Carrier - Gas fort. Im Fall des kINPen® MED findet Argongas Verwendung. Dieses wird aus einem externen Gasbehältnis über einen Druckminderer zugeführt und anschließend mit ca. 4,3 sL*min⁻¹ (Standardliter /min) durch eine Kapillare (innerer Durchmesser 1,6 mm) geleitet. Mithilfe eines angeschlossenen Hochfrequenzgenerators wird währenddessen ein hochfrequenter Wechselstrom ($U = 2 - 6 \text{ kV}$, $f = 1,1 \text{ MHz}$) appliziert [35]. Das so angeregte Gas expandiert in die Umgebungsluft am Ende der kapillaren Düsenöffnung und erscheint dort als Plasmajet [36]. Das so erzeugte atmosphärisches Kaltplasma hat eine Energie von unter 60 J /cm² * min [35]. Eine Temperatur von 40°C dabei nicht überschritten. Eine Steuerungseinheit und ein stiftgroßes Handstück beinhalten die technischen Komponenten (Abbildung 2) [37]. Der kINPen® MED wurde konzipiert, um punktförmige Behandlungen mit kleinem Durchmesser durchzuführen. Die Distanz zwischen der bestrahlten Oberfläche und der Düsenöffnung sollte 7 - 10 mm betragen. Diesen Abstand erhält man bei direktem Kontakt der Objekt Oberfläche mit dem Plasma. Für die Behandlung größerer Areale, muss der kINPen® MED in einer bestimmten Art über die Oberfläche bewegt werden [36].

Speziell für den zahnmedizinischen Gebrauch wird zur Zeit der kINPen® DENT (neoplas tools, Greifswald, Deutschland) vom Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. in enger Kooperation mit der Universitätsmedizin Greifswald und der Charité - Universitätsmedizin Berlin entwickelt [38].

Ein weiteres indirektes Plasma-System basiert auf nicht - thermaler gepulster Mikrowellenanregung (2,45 GHz) von Helium in einem Elektrodenkoaxialsystem (detailliert beschrieben von Lehmann et al. [39]). Die technischen Komponenten wurden im IOM - Institut Leipzig entwickelt und sind im Gegensatz zu den vorangegangenen beschriebenen Systemen nur dort stationär untergebracht (Leibniz Institut für Oberflächenmodifikation Leipzig, Deutschland). Helium fungiert als Carriergas, während Stickstoff als peripheres Abschirmgas eingesetzt wird. Die innere Elektrode wird durch ein 0,3 mm dickes Stahlröhrchen repräsentiert, das als Innenleiter fungiert. In diesem Röhrchen werden die Prozessgase zugeleitet. Die zweite Elektrode wird vom Stahlkörper der Quelle mit einem Durchmesser von 3,4 mm gebildet. Der Mikrowellengenerator (2,45 GHz) dient zur Anregung der Quelle.

Impulsenergie, Impulsstärke und mittlere Energieleistung sind adjustierbar. Über einen Massenflussregler ist es möglich, definierte Flussraten der Prozessgase einzustellen. Um reproduzierbare Zeit-, Distanz- und Scanparameter einstellen zu können ist die Plasmaquelle auf einem computergesteuerten 3 - Achsen Tischsystem angebracht. (Abbildungen 3 - 5) [39, 40]. Untersuchungen von Gastemperatur, Hitzefluss, UV- und Ozonemission sowie Patienten Ableitstrom zeigten, dass ein großes Potential für die dentale, therapeutische Anwendung am Menschen bei niedrigen Gastemperaturen bis zu 34 °C besteht [40].

Neben den beschriebenen Varianten wurden Hybridsysteme entwickelt, die direkte und indirekte Quellen vereinen [3, 37].

[39] Lehmann A, Rueppell A, Schindler A, Zylla I M, Seifert H J, Nothdurft F, Hannig, M, Rupf S. Modification of Enamel and Dentin Surfaces by Non-Thermal Atmospheric Plasma. Plasma Process Polym 2013; 10(3): 262–70.



Abbildung 1: Direktes Plasma - System PlasmaDerm® (Cinogy, Duderstadt, Deutschland).
1 = Steuerungseinheit, 2 = CAP - Applikatoransatz, 3 = Handstück.

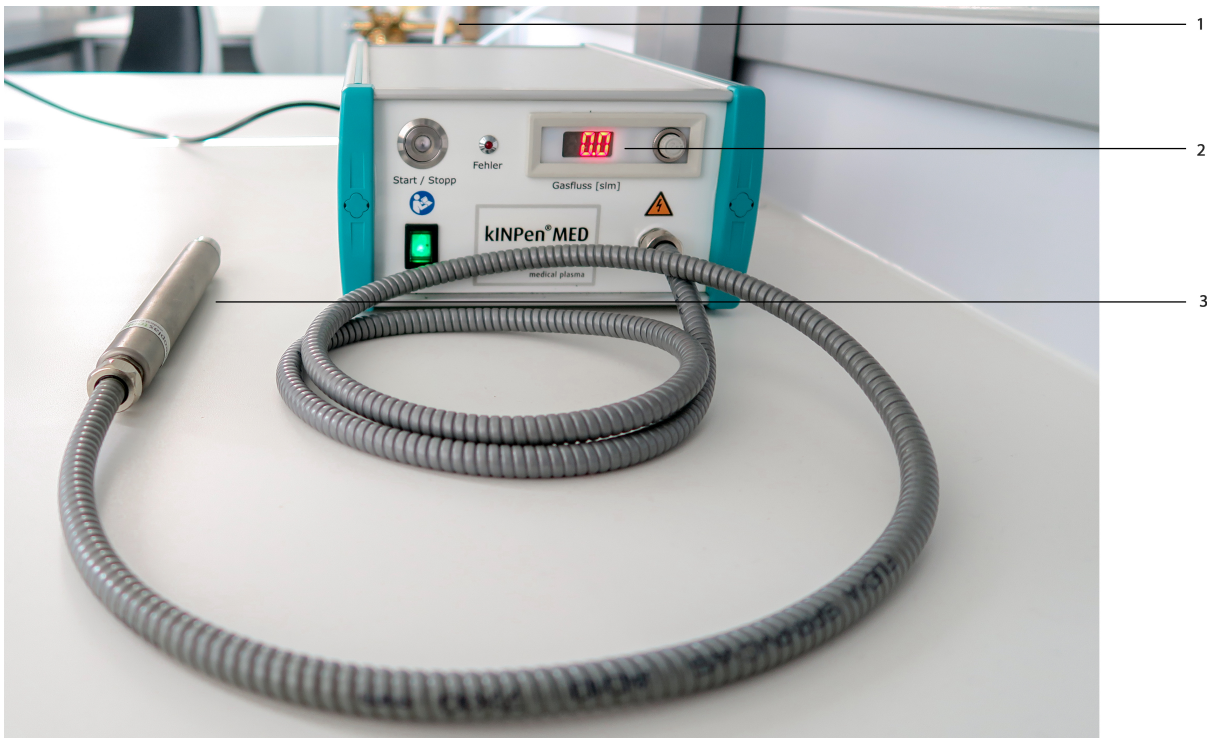


Abbildung 2: Indirektes Plasma - Jet-System kINPen® MED (neoplas tools, Greifswald, Deutschland). 1 = im Hintergrund: externer Druckminderer zur Einspeisung von Argon, 2 = Steuerungseinheit mit Anzeige des Argon-Gasflusses in $\text{sL} \cdot \text{min}^{-1}$, 3 = Handstück zur Applikation des CAP.

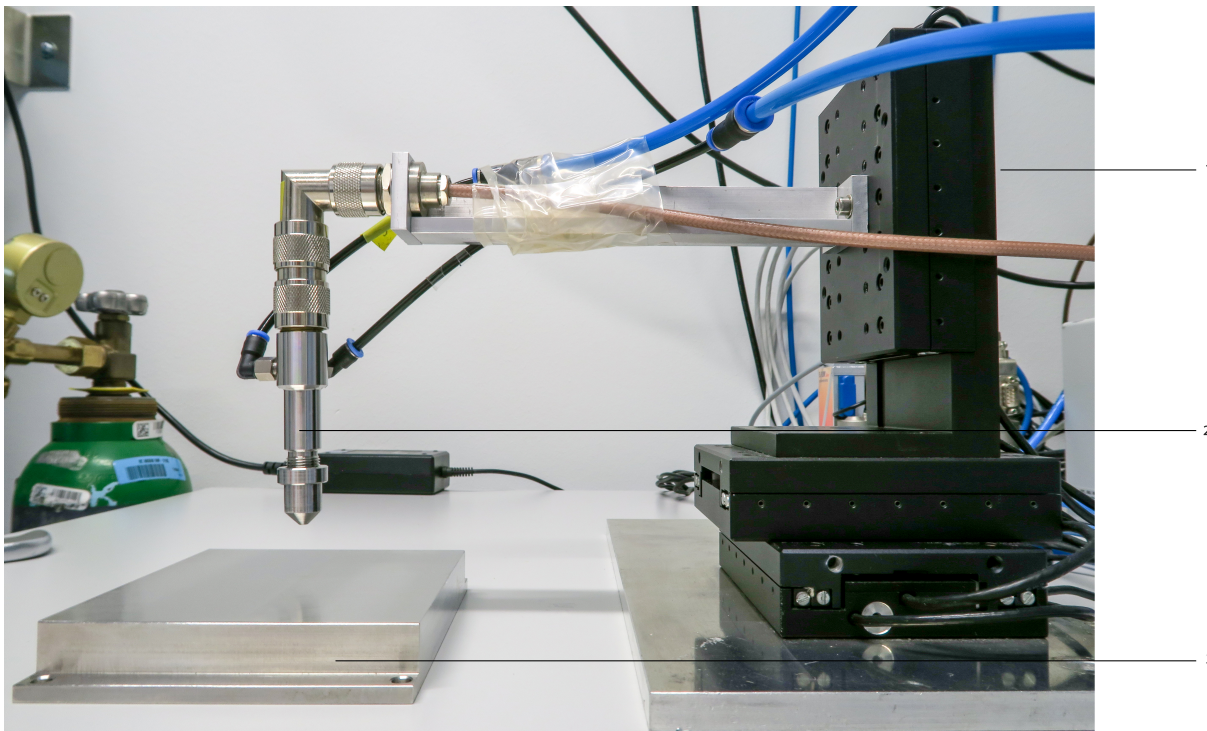


Abbildung 3: Indirektes mikrowellenbetriebenes Plasma - Jet - System des IOM Leipzig. 1 = stationäre Steuerungseinheit und Mechanik für Bewegung des Plasma - Jet, 2 = CAP - Plasma - Jet, 3 = Proben-tisch.

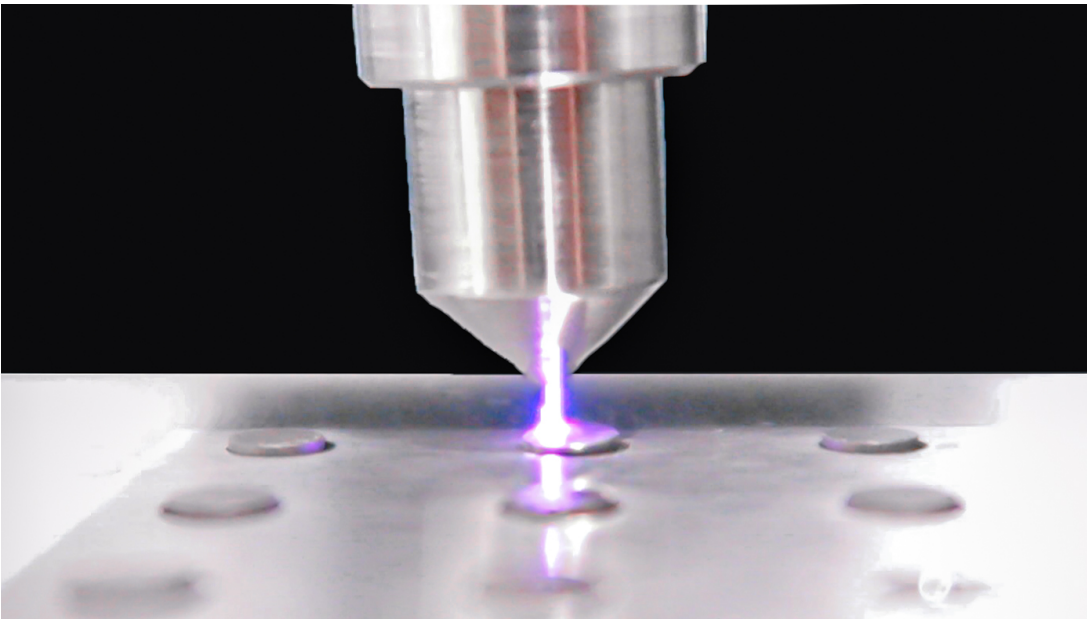


Abbildung 4: Exemplarische Bestrahlung von Titanprobenkörpern mit Mikrowellen - betriebenen Plasma - Jet - System.



Abbildung 5: Indirektes mikrowellenangeregtes Plasma - Jet - System des IOM Leipzig.
1 = Monitor und Steuerungseinheit des Mikrowellengenerators.

2.5 Biomedizinische Anwendungsfelder und Grundlagen der Plasmawirkung

Die komplexe Zusammensetzung von Plasma ermöglicht bei dessen Anwendung die Auslösung eines vielfältigen 'Wirkungscocktails'. Diesem zugrunde liegt generell die Induktion bzw. Emission von Ionen und Elektronen, angeregten chemischen Spezies (reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS)), Photonen (sichtbares Licht und UV-Strahlung) sowie Wärmestrahlung [1, 5]. Die endgültig spezifische biologische Wirkung des erzeugten Plasmas wird durch die Adjustierung der Plasmaquelleigenschaften, sowie der Art- und Expositionsdauer des genutzten Gases (bzw. Gasgemisches) beeinflusst [37, 41].

Kaltes sowie heißes Plasma finden technisch - industrielle Anwendung von der Bearbeitung bis zur Dekontamination von Biomaterialien (Schweißen, Löten, Beschichten, Oberflächenmodifikationen). Dazu zählen zum Beispiel die Sterilisierung von medizinischen Instrumenten und Implantaten [1, 42-45].

Das klinisch - therapeutische Anwendungsspektrum erstreckt sich über seit längerem etablierte Verfahren wie Koagulation, Ablation und Vaporisation von Geweben [46, 47] bis hin zu neueren Methoden wie der antimikrobiellen Therapie, Wundheilungsstimulation und Tumorthherapie. Basis der klinischen Plasmaanwendung ist die Interaktion von dessen biologisch wirksamen Komponenten mit organischer Materie durch unabhängige oder synergistisch wirksame Effekte. Letztere werden insbesondere für Mikrobiozidie und Stimulation der Wundheilung genutzt [48-52].

Nach aktuellem Wissensstand beruht die Wirkung von Plasma vor allem auf der Freisetzung verschiedener ROS und RNS sowie der Emission von UV - Strahlung [1]. Zu den reaktiven Spezies zählen unter anderem das Hydroxyl - Radikal ($\cdot\text{OH}$), Hydroxid - Anion (OH^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Singulett - Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), das Superoxid - Anion (O_2^-), Ozon (O_3), Stickstoffmonoxid ($\cdot\text{NO}$) und das Peroxinitrit - Anion (ONOO^-) [3, 53].

In der antimikrobiellen und onkologischen Therapie wird der Umstand genutzt, dass Plasma dosisabhängig Schäden an isolierter und zellulärer DNA erzeugen kann (chemische Veränderung von Nukleinbasen und Desoxyribose, Thymin -Dimerisierung, Einzel- und Doppelstrangbrüche, DNA - Protein - Crosslinks) [1, 3, 54, 55]. Dies ist in den Zellen des Patienten jedoch nicht erwünscht [3].

Im Fokus der therapeutischen Anwendung *in vivo* steht deshalb atmosphärisches kaltes Plasma (eng. cold atmospheric plasma (CAP), bzw. atmospheric pressure plasma (APP); *Synonym*: gewebeverträgliches Kaltplasma (tissue tolerable plasma, TTP)). *In vitro* zeigte sich keine toxische Wirkung nach Behandlung mit CAP [56]. Seine noninvasive Natur, ohne die bekannten negativen Effekte auf mammale Gewebe innerhalb der therapeutischen Breite bzw. Dosis, gestattet eine Anwendung *in vivo* [2, 49, 56-63]. Klinisch zeigten sich ferner keine unerwünschten Wirkungen bzw. vereinzelt lediglich vorübergehende Rötungen und subjektiv tolerables Wärmeempfinden nach der Bestrahlung mit CAP [64].

2.6 Plasmawirkung auf Mikroorganismen und Biofilme

Die Anwendung von CAP führt zur Inaktivierung einer großen Variationsbreite humanpathogener Mikroorganismen (Bakterien, Sporen, Pilze), Viren und sogar multiresistenter Erreger [48, 50, 52, 64-80]. Trotz differierender Empfindlichkeiten, sind keine Resistenzen gegenüber kaltem Plasma, auch nicht nach mehrfacher Anwendung, bekannt [52, 77, 78, 81, 82, 83].

Generell gilt eine Abhängigkeit der antimikrobiellen Effektivität von der Art des genutzten Gases (bzw. Gasgemisches), der Expositionszeit und -zyklen, oder dem Expositionsmodus, der Flussrate, der Eindringtiefe und damit der angewandten Gesamtdosis (UV-Strahlung, ROS, RNS) von CAP [41, 65, 71, 74, 80, 84-86]. Darüber hinaus haben Umgebungsfaktoren wie pH - Wert und relative Gasfeuchtigkeit einen signifikanten Einfluss auf das Sterilisationsvermögen von CAP [87-90]. Divergierende Ergebnisse legen nahe, dass intrinsische Bakterienparameter wie Zellwandaufbau, einhergehend mit Grampositivität oder -negativität, initiales Inokulum sowie die Wachstumsphase den bakteriziden Effekt von CAP signifikant beeinflussen [52, 84, 87, 89-94].

Der antibakterielle Wirkmechanismus von CAP, bestehend aus biologischen und physikalischen Komponenten, kann über zwei Grundmechanismen zur Inaktivierung von Bakterien führen. Dies sind zum einen direkte Interaktionen mit der Zellwand, zum anderen Schädigung von intrazellulären Komponenten [74, 90, 95].

Reaktive korpuskuläre Plasmabestandteile, insbesondere ROS, lösen Schäden an der DNA (oxidative DNA - Schädigung, Strangbrüche), der RNA (Strangbrüche), intrazellulären Proteinen (oxidative Proteinschädigung, Entfaltung bzw. Verlust der Proteinstruktur und -funktion, Aminosäurenmodifikation), Mitochondrien sowie physikalische Schäden an Zellwänden (Ätzung) und -membranen (lokale elektrostatische Disruption, Lipidperoxidation) aus [41, 52, 68, 71, 96-100]. Mittlerweile liegen divergierende Ergebnisse vor, ob auch die UV - Strahlung DNA - Schädigung bewirken kann, beziehungsweise ob diese Schädigung zu einer Bakterieninaktivierung führt (Nukleinbasenmodifikation, Thymin - dimerformation) [90, 97, 99-101]. Nachgewiesenermaßen sind die Effekte von Photonen und Partikeln des Plasmas jedoch unabhängiger wie auch synergistischer Natur [101, 102].

Die Schlüsselrolle der Bakterizidie von CAP spielen die ROS und ihr intrazellulärer Konzentrationsanstieg [103]. *In vitro* konnte dies an *E. coli*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes* und verschiedenen multiresistenten Bakterien (*S. aureus* (MRSA), *P. aeruginosa*) nachgewiesen werden [41, 74, 103]. Die zur Inaktivierung führenden Mechanismen variieren dabei in unterschiedlichen Bakterienstämmen. In *E. coli* konnte nachgewiesen werden, dass diese von ROS durch Zellwanddestruktionen oder Schäden an low - level DNA inaktiviert werden. *S. aureus* Inaktivierung hingegen findet vor allem durch intrazelluläre Schäden bei einer deutlich höheren intrazellulären ROS - Konzentration statt [74]. Darüber hinaus leiten die Ergebnisse mehrerer Studien zu der Annahme, dass ROS in der Lage sind, einen bakteriell programmierten Zelltod zu induzieren oder zu triggern [95, 104]. In diesem Zusammenhang konnte eine Apoptose durch von intrazellulären ROS ausgelöstem oxidativen Stress in den oben genannten Bakterien beobachtet werden [95, 97, 105, 106]. *E.coli* durchlief im Anschluss einer Plasmabestrahlung folgende Phasen des Zelltodes: Inaktivierung von Transportsystemen, Depolarisation der zytoplasmatischen Membran und final die Permeabilisierung der Zelle [52].

Grundsätzlich besteht die Annahme, dass das Ausmaß Gen - regulierter antioxidativer Schutz- (z.B. Katalasen und Superoxiddismutasen (katG, katE, sodA, sodB)) sowie zellulärer Reparaturmechanismen (z.B. SOS-Response) maßgeblich an einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber CAP beteiligt sind [103, 106]. *E. coli* - Mutanten, denen bestimmte Gene zur antioxidativen Verteidigung fehlten (OxyR und SoxS), reagierten *in vitro* deutlich susceptibler auf Plasma als der Wildtyp [103]. Darüber

hinaus wurde in *E. coli* eine signifikante Induktion des SOS - Mechanismus (ca. 20 involvierte Gene) als Folge plasmatischer Exposition beobachtet. Außerdem wurden weitere Gene der oxidativen Stress - Antwort hochreguliert [102]. Jüngste Ergebnisse beschreiben das Potential von Plasma zur Reduktion von durch Quorum - sensing (eng. quorum - sensing (QS)) kontrollierten Virulenzfaktoren in *P. aeruginosa* [107]. Weiterhin konnte die Bestrahlung von für QS ausschlaggebenden Biomolekülen zu einer Abmilderung der QS - abhängigen Virulenz in *P. aeruginosa* führen [108].

Neben den dargestellten Effekten auf Mikroorganismen im Einzelnen besitzt CAP die Fähigkeit, komplexe Biofilme zu zerstören. *In vitro* konnte dies unter anderem an *A. actinomycetemcomitans*, *B. cenocepacia*, *E. coli*, *E. faecalis*, *MRSA*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes* - Monospezies - Biofilmen nachgewiesen werden [7, 94, 108-114]. Für einen *in vitro* Monospezies - *P. aeruginosa* Biofilm wurde zudem beschrieben, dass Plasma zu einer höheren antimikrobiellen Reduktion führt als 0,1 % CHX [115].

Artifizielle Multispezies-Biofilme (*S. aureus* oder *P. aeruginosa* gemischt mit *E. faecalis*, *K. pneumoniae*) konnten *in vitro* mit RNS - begünstigendem Plasma vollständig zerstört werden [114]. Ferner ist eine Inaktivierung und signifikante Proteinmengenreduktion oraler *ex vivo* Multispezies-Biofilme durch Plasmabehandlung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen belegt. Für eine vollständige Entfernung der Biofilme von Titanoberflächen war jedoch der zusätzliche Einsatz von Luft - Wasser - Spray notwendig [116]. In einer weiteren Studie konnte CAP - Behandlung von *ex vivo* Multispezies - Biofilmen auf Zahnoberflächen eine Proteinmengenreduktion und Säuberung der Zahnoberfläche in vergleichbarer Qualität wie mechanische Behandlung erreichen [117].

Nach der Entfernung oraler *ex vivo* Biofilme durch eine Kombination von CAP und mechanischem Debridement wurde eine Osteoblastenkultivierung auf entsprechend behandelten Titanplättchen möglich [118]. Die CAP-Behandlung bakteriell infizierter Wundflächen zeigte in mehreren Tiermodellen die Teil - Inhibition von Bakterienkolonisationen bis hin zur gänzlichen Eradikation verschiedener Bakterienspezies [94, 119]. Dabei ist vermutlich die Dicke des Biofilms und die Tiefe der darin befindlichen Bakterien für die Effektivität der Plasmaanwendung entscheidend [94]. Der Vergleich von CAP - behandelten chronischen Hautwunden und venösen Ulzera zu

unbehandelten Kontrollen konnte in klinischen Humanstudien eine signifikante, speziesunabhängige Reduktion der bakteriellen Kontamination belegen [49, 59, 62].

2.7 Plasmawirkung auf titanen Implantatoberflächen

Plasma ist in der Lage (in Kombination mit Luft - Wasser - Spray) eine vollständige Entfernung von *ex vivo* Biofilmen auf mikrorauen Titanoberflächen zu erreichen [116]. Außerdem konnte eine expositionszeitunabhängige, signifikante Reduktion der Kolonisation artifizierender *S. mitis* Biofilme auf mikrorauen Titanplättchen beobachtet werden [120]. Ferner wurde *in vitro* eine Reduktion der initialen Adhärenz von artifiziellem *S. sanguinis* auf CAP - behandelten Titan- und Titanalloyoberflächen im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen beschrieben [7].

Plasma besitzt das Potential, die Biokompatibilität von Titanoberflächen und dessen Zell - Material - Interaktion zu verbessern [121]. Es konnten Anzeichen einer verbesserten initialen Zelladhäsion (gut entwickelte Vinkulin - Lokalisierung, erhöhte alkalische Phosphatase - Aktivität (ALP), Zellproliferation, Zellausbreitung) gegenüber unbehandelten Proben beobachtet werden [7, 122]. Darüber hinaus zeigten *in vitro* Studien eine Optimierung der Benetzbarkeit (Hydrophyliesteigerung) sowie Anheftung und Wachstum von Fibroblasten und Osteoblasten an Titanoberflächen nach CAP - Behandlung [76, 123-128]. Weiter wurde *in vitro* eine gesteigerte Differenzierung von Osteoblasten, sowie verbesserte Osseointegration von Titanimplantaten und günstigen Effekten der Knochenneubildung auf rauen Titanplättchen nach zuvor erfolgter CAP Behandlung beobachtet [128-130]. Eine Studie am Hundemodell zeigte eine signifikant vergrößerte Kontaktfläche zwischen Titanimplantat und Knochen sechs Wochen post - Plasmaapplikation im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen [131]. In Kombination mit desinfizierenden Agenzien (NaOCl, H₂O₂, EDTA, Octenidine) konnte CAP *in vitro* zu einer signifikant größeren Reduktion von Bakterienkolonien in artifizierender *S. mutans* Monospezies Biofilmen sowie *ex vivo* Multispezies Biofilmen führen als alleinige CAP Anwendung [132].

In einer klinischen 6 - Jahres follow - up Studie wurde in der Umgebung von vor der Implantation mit Plasma behandelten, maxillären Prämolarenabutments ein signifikant geringerer Knochenverlust beobachtet als um unbehandelte Kontrollen [133]. In einer

weiteren klinischen Studie konnte im Weichgewebe um vor der Implantation mit Plasma bestrahlten Implantatabutments eine erhöhte Zelladhäsion sowie eine verbesserte Kollagenfaserstruktur gefunden werden [134].

2.8 Plasmawirkung auf Wundheilung

Die stimulierende Wirkung von Plasma auf Wundheilungsprozesse wurde in verschiedenen Tiermodellen untersucht. *In vitro* konnte im Mausmodell eine Stimulation der Keratinozyten- und Fibroblastenmigration, sowie eine plasmabasierte Induktion des Epithel - zu - Mesenchym - Übergangs an Ratten beobachtet werden [135, 136]. Auf molekularer Ebene wurden darüber hinaus eine Aktivierung des MMP-9/uPA Systems, der TCF8/ZEB1 Expression, dem Anstieg von Slug, der Herunterregulation des junctionalen Gap Proteins Connexin 43 und E - cadherin sowie verschiedenen Integrinen und eine Aktin - Reorganisation beschrieben. Vermutliche Faktoren der optimierten Wundheilung [135, 136].

In vivo ist an Mäusen eine verbesserte und signifikant beschleunigte Wundheilung im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollen sowie der Einfluss von Plasmabestrahlung auf die Expression von mit Heilung assoziierten Genen beschrieben [136-139]. Histologische Untersuchungen zeigten kleinere Entzündungs- und größere Reepithelialisierungs- sowie Neovaskularisations - Scores im Vergleich zur spontanen Heilung [119].

Ferner wurde im *in vivo* Rattenmodell eine signifikant höhere Heilungs- und Verschlussrate an bakteriell infizierten Hautwunden [94] und außerdem eine verkürzte Wundheilungszeit im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollen detektiert [140, 141]. Des Weiteren verlangsamte sich die Wundheilung nach Absetzen der Plasmaanwendung in zuvor behandelten Tieren [94].

Klinische Humanstudien zur Beeinflussung der Wundheilung durch Plasmatherapie wurden an unterschiedlich großen Patientengruppen vor allem im dermatologischen Bereich durchgeführt.

In vitro konnte an humanen Fibroblasten die induzierende Wirkung von Plasma auf die Expression wesentlicher Gene der Wundheilungsantwort wie IL-6, IL-8, MCP-1, TGF- α 1, TGF- α 2 und ein fördernder Effekt auf die Kollagen - Typ - I- sowie alpha - SMA -

Produktion nachgewiesen werden [137, 142]. Ebenso *in vitro* konnte an humanen periodontalen Ligamentzellen beobachtet werden, dass CAP - Behandlung Marker der periodontalen Wundheilung regulieren konnte. Die Expression von TNF α , COX2, IL-1 β , IL-6, IL-8, COL1 α , MMP1 sowie Proliferationsmarker Ki67 und proliferierendem zellulären nukleären Antigen (PCNA) wurde signifikant gesteigert, während apoptotische Marker wie Apaf1 und p53 herunterreguliert wurden. Weiterhin wurden eine allgemein höhere Wundheilungsrate und verbesserten Zellvitalität nach Plasmabehandlung beschrieben [143]

Ex vivo wurde nach CAP - Anwendung eine signifikante Veränderung der atomaren kutanen Lipidbarrierenzusammensetzung sowie eine Absenkung des pH - Wertes im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen gefunden [144]. Mögliche Auswirkungen wurden jedoch bisher nicht weitergehend untersucht.

Auch *in vivo* konnte nachgewiesen werden, dass durch CAP - Behandlung von Hautkeratinozyten, Fibroblasten und endothelialen Zellen über autokrine und parakrine Mechanismen Angiogenese - verknüpfte Moleküle aktiviert werden [142]. An infektionsfreien Hautwunden nach Spendertransplantatentnahme zeigte sich *in vivo* auf plasmabestrahlten Arealen eine signifikant bessere Heilung sowie gesteigerte Reepithelialisierung mit weniger Fibrinschichten und reduzierter Krustenbildung im Vergleich zu unbestrahlten Anteilen [61]. Weiter konnte in einer Fallstudie an vier Patienten mit Wundheilungsstörungen nach Spendertransplantatentnahme innerhalb von zehn Wochen additiver Plasmaanwendung zur regulären Wundversorgungsroutine ein vollständiger Verschluss der Hautwunde ohne unerwünschte Nebenwirkungen wie Entzündungen oder Infektionen erreicht werden [145].

Während eine Studie zur Größenreduktion von Beinvenenulzera keinen signifikanten Unterschied der Läsionsausdehnung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen zeigen konnte [62], wurden in plasmabehandelten Druckulzera ein signifikant besserer PUSH - Score (eng. pressure ulcer scale for healing) und Exsudation sowie geringere Bakterienkolonisation nachgewiesen [146].

In verschiedenen klinischen Studien wurde außerdem eine mit CAP - Behandlung assoziierte Erhöhung der Gewebeversorgung durch Sauerstoff und Hochregulierung des kutanen Blutflusses sowie der Mikrozirkulation beobachtet [147, 148]. Eine mehrfache Anwendung von Plasma konnte diese Effekte noch zusätzlich verstärken [149]. In einer Studie mit sechs Patienten mit Wundheilungsstörungen nach komplizierten Operationen im cranio - maxillo - fazialen Bereich konnte mit adjuvanter

Plasmabestrahlung zur regulären Wundversorgung ein kompletter Wundverschluss nach durchschnittlich 15,5 Wochen erreicht werden [150].

3. Material und Methodik

3.1 *In vivo* Biofilmentwicklung

Für die intraorale Biofilmentwicklung wurden insgesamt 40 Titanplättchen (n= 40, Dentsply Implants, Mannheim, Deutschland) verwendet, die von acht gesunden Probanden (4 männlich, 4 weiblich, Durchschnittsalter: 26,8 Jahre) auf individuell hergestellten maxillären Minioplastschienen getragen wurden. Von jedem Freiwilligen wurden Oberkiefer Alginatabdrücke (HS - Alginat Color, Krom - Alginat Plus Henry Schein Dental Deutschland GmbH, Langen, Deutschland) genommen und individuelle Superhartgips - Modelle hergestellt (Abbildung 6 und 7). Über diese wurden 1 mm dicke Tiefziehfolien unter Vakuum tiefgezogen (Erkodur 1 mm Tiefziehfolien und -platten, Erkodent Erich Kopp GmbH, Pfalzgrafenweiler, Deutschland; Vakuumtiefziehgerät Erkoform - 3d+, Erkodent Erich Kopp GmbH, Pfalzgrafenweiler, Deutschland) und anschließend auf eine Ausdehnung des Prämolaren- und Molarenbereiches eingekürzt (Abbildung 8).

Auf jeder Schiene wurden je 5 mikrorauhe Titanplättchen (sandgestrahlt und säuregeätzt, Titan - Grad 2, Friadent Mannheim, Deutschland, Durchmesser: 5 mm, Höhe: 1 mm, durchschnittliche Rauhtiefe (Ra): 1,96 μm , durchschnittliche maximale Profilhöhe: 21,35 μm (Umfang: Rt): 15.5 - 31.1 μm , Vickershärte: 150, Elastizitätsgrenze: 470 N /mm² , E-Modul: 110 GPa) mittels Silikon Abdruckmaterial (President light body, Coltene, Schweiz) auf deren Bukkalfläche für die intraorale Biofilmentwicklung fixiert [50] (Abbildung 9).

Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin (Voting EA4/090/017) genehmigt sowie eine schriftliche Einverständniserklärung jedes Teilnehmers eingeholt.

Während der 72 - stündigen Expositionszeit blieben die Probanden bei ihren normalen Trink- und Essgewohnheiten. Es wurden jedoch Produkte vermieden, die die Biofilmproduktion behindern könnten, wie zum Beispiel Tee und Rotwein. Darüber hinaus wurden weder mechanische Putzmaßnahmen, noch chemische Mittel zur Plaquekontrolle (z.B. Zahnpasta, Mundspülung) angewandt. Die Splints wurden nur während der Mahlzeiten oder des Trinkens herausgenommen und währenddessen in

einer feuchten Kammer (H₂O - getränkter Zellulosezellstoff in luftdichtem Kunststoffgefäß) gelagert.

Nach Abschluss der 72 - stündigen Biofilmentwicklung wurden die Titanplättchen ebenso in einer dieser feuchten Kammern verwahrt und bis zur weiteren Verarbeitung kühl (ca. 7 °C) gelagert. Am Folgetag fand die Überführung der Probenkörper von der Charité Campus Benjamin Franklin Institut für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde Berlin in das Fraunhofer - Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI Leipzig statt.



Abbildung 6: Oberkiefer Alginatabdrücke in Abformlöffeln.

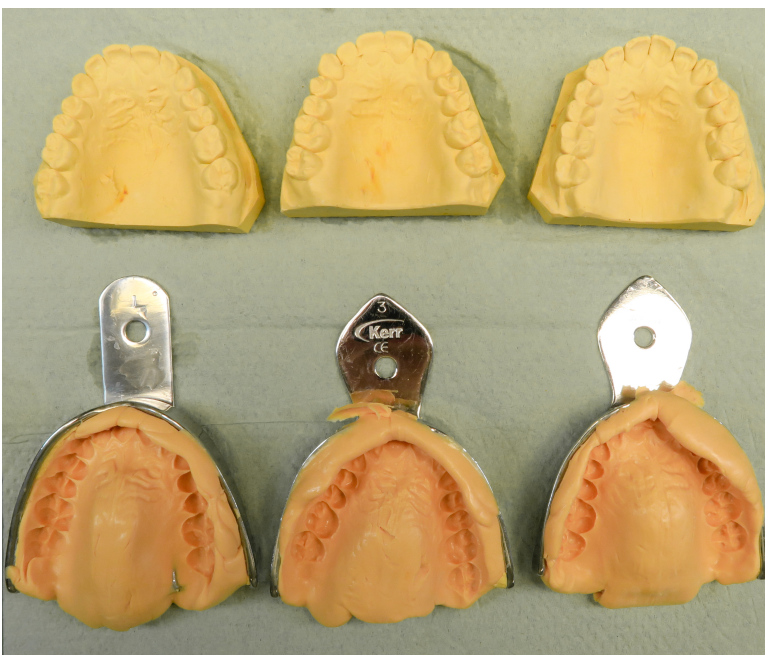


Abbildung 7: *Obere Reihe:* Individuelle Oberkiefer Superhartgipsmodelle, *Untere Reihe:* Oberkiefer Alginatabdrücke in Abformlöffeln.

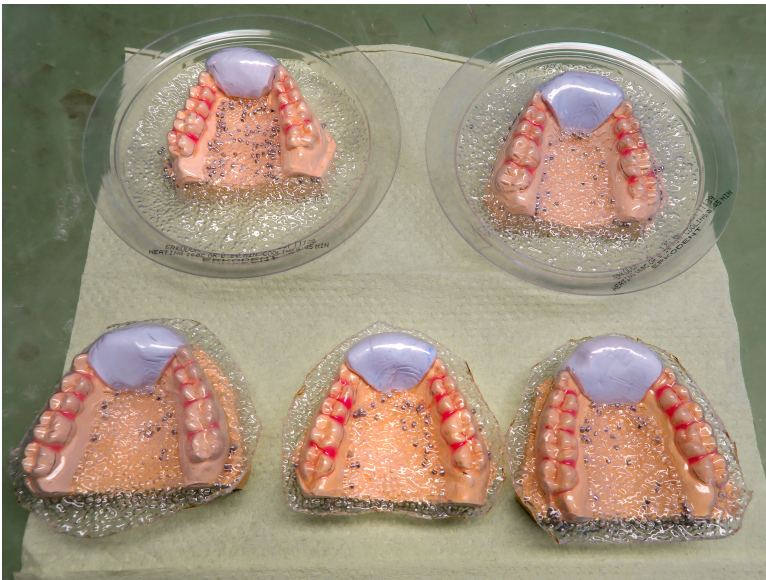


Abbildung 8: Tiefziehfolien auf Oberkiefer Superhartgipsmodellen.



Abbildung 9: Miniplastschiene mit durch Abdrucksilikon befestigten Titanplättchen auf Oberkiefer Superhartgipsmodell.

3.2 Anti - Biofilm Behandlung

Die Titanplättchen (n = 40) mit 72 h *in situ* Biofilm wurden *ex vivo* 10 s mit steriler Kochsalzlösung (0,9 %) abgespült. Anschließend wurden die fünf Titanplättchen jedes Probanden randomisiert in fünf verschiedene Gruppen von je acht Prüfkörpern unterteilt.

Jede Behandlungssequenz bestand aus zwei Schritten: (i) das Plasma- oder mechano- antimikrobielle Verfahren und (ii) das Absprühen mit Luft - Wasser - Gemisch.

3.2.1 Plasma Behandlung, mechano - antimikrobielles Verfahren

Indirektes kaltes atmosphärisches Plasma (CAP I) wurde für 90 s mit einem unter konstanter Bewegung stehenden Plasma Jet (kINPen® MED, neoplas tools GmbH, Greifswald, Deutschland [25, 26]), gespeist mit $4.3 \text{ sL} \cdot \text{min}^{-1}$ Argon, senkrecht und mit ca. 3 mm Abstand zur Oberfläche der Testkörper (n = 8) appliziert (Abbildung 2).

Direktes Plasma (CAP II) wurde mittels PlasmaDerm FLEX 9060 (Cinogy, Duderstadt, Deutschland) generiert. Die Zeitdauer der Spannungsimpulse betrug $10 \mu\text{s}$ bei Amplituden von bis zu 10 kV und einer Folgefrequenz von 300 Hz. Die durchschnittliche Eingangsleistung wurde laut Herstellerangaben auf 450 mW definiert. Mit einem durch die Oberfläche der Elektrode gesicherten, konstanten, mit Umgebungsluft gefüllten Spalt von 2 mm wurde das Plasma für 90 s auf die Oberfläche der Prüfkörper (n = 8) appliziert (Abbildung 1).

Mikrowellen - betriebener gepulster Plasma Jet (CAP III) detailliert beschrieben von Lehmann et al. [39]. Das Plasma wurde mit den folgenden Parametern generiert: He Flussrate $2.0 \text{ sL} \cdot \text{min}^{-1}$, N₂ Flussrate $0.3 \text{ sL} \cdot \text{min}^{-1}$, Pulsstärke 200 W, Pulslänge $5 \mu\text{s}$, Pulsfolgefrequenz 4.9 kHz, resultierend in einer durchschnittlichen Eingangsleistung von 5 W. Es wurde mit einem 3 - Achsen linearen Bewegungssystem (Steinmeyer MC-G047) für eine gewundene Bewegung mit einer Scangeschwindigkeit von 8 mm /s, einem Linienabstand von 0.1 mm und einem Arbeitsabstand des Plasma Jets von

3 mm zur Testkörperoberfläche (n = 8) 90 s Plasma auf jeden Prüfkörper appliziert (Abbildung 10).

Mechano - antimikrobielles Verfahren (Positivkontrolle, CHX - Gruppe): Die Testkörper (n = 8) wurden mechanisch mit einer Plastikkürette (Hu - Friedy, Frankfurt am Main, Deutschland) für 10 s gereinigt und anschließend für 90 s in 2 mL 0,2 % Chlorhexidin (CHX, Chlorhexamed forte, GSK, Berlin, Deutschland) platziert.

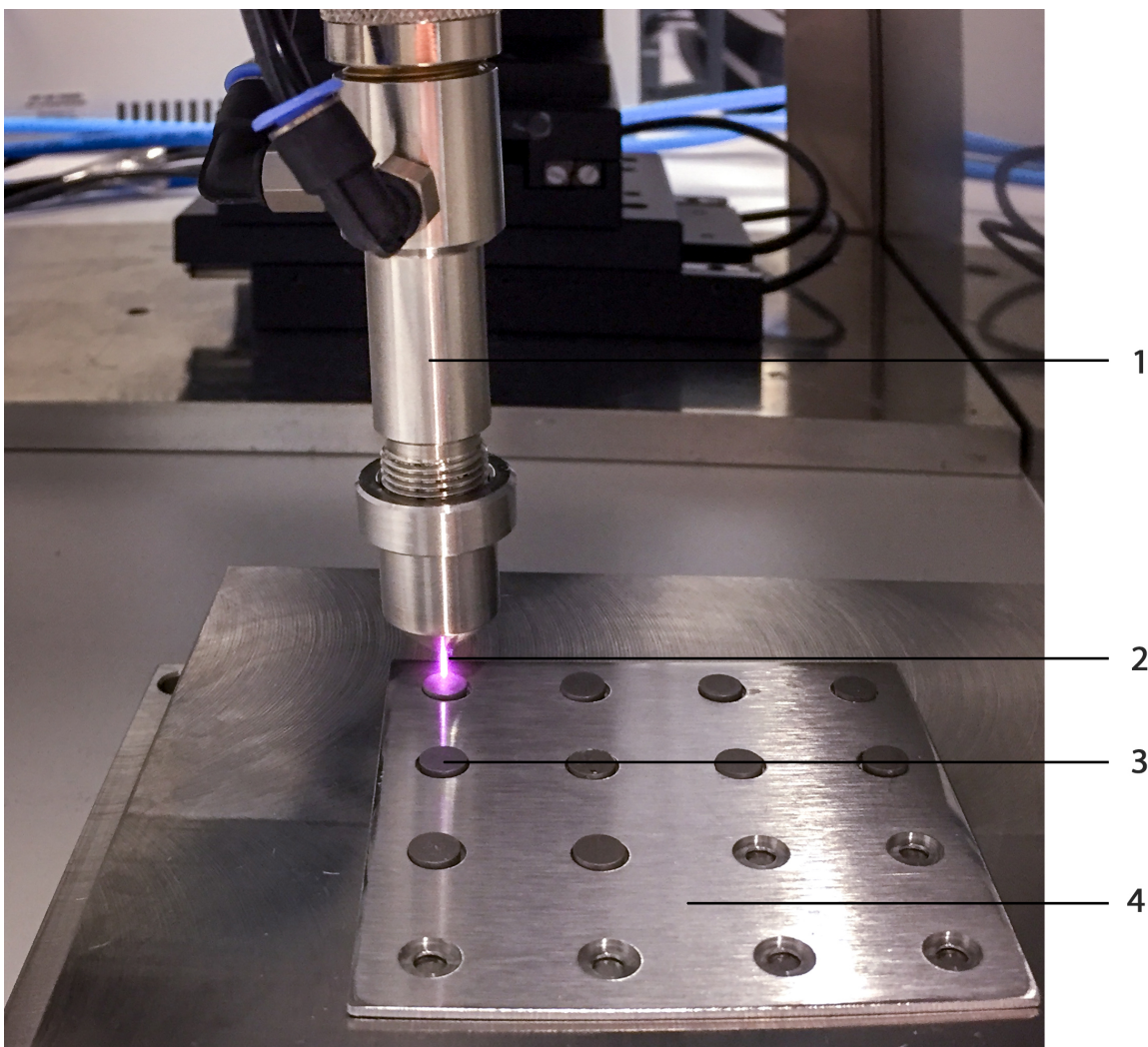


Abbildung 10: Exemplarische Bestrahlung von Titanprobenkörpern mit Mikrowellen - betriebenem - Plasma - Jet - System. 1 = Stahlkörper, 2 = Austritt von CAP als Plasma - Jet, 3 = Titanprüfkörper, 4 = Probenkörperhalter.

3.2.2 Absprühen mit Luft - Wasser - Gemisch

Nach der Behandlung mit kaltem atmosphärischen Plasma oder mechano - antimikrobiellem Verfahren oder keiner Behandlung (*Negativkontrolle*, n = 8) wurden die Prüfkörper mit Luft - Wasser - Gemisch aus einer dentalen Luft - Wasser - Sprayeinheit (U 3000 EX, Ultradent, Brunenthal, Deutschland) für 10 s und einem Abstand von 10 mm abgesprüht. Der Eingangswasserdruck betrug 2 bar.

3.3 Mikrobiologie

Alle Titanplättchen (n = 40) wurden zweimal für 5 s auf universalem Brain Heart Infusion (BHI, Sigma - Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) Blutagar auf Rodac - Platten (Durchmesser: 50 mm, Merck, Darmstadt, Deutschland, *Rodac: replicate organism detection and counting imprinting technique*) einer Kontaktinokulation unterzogen (Abbildung 11). Acht weitere, frische Testkörper ohne Biofilm wurden als Kontrollen verwendet. Nach der Inokulation wurden die Blutagarplatten bei 37 °C (5 % CO₂) inkubiert. Nach 24h und 48h Inkubation folgte jeweils deren Auswertung.

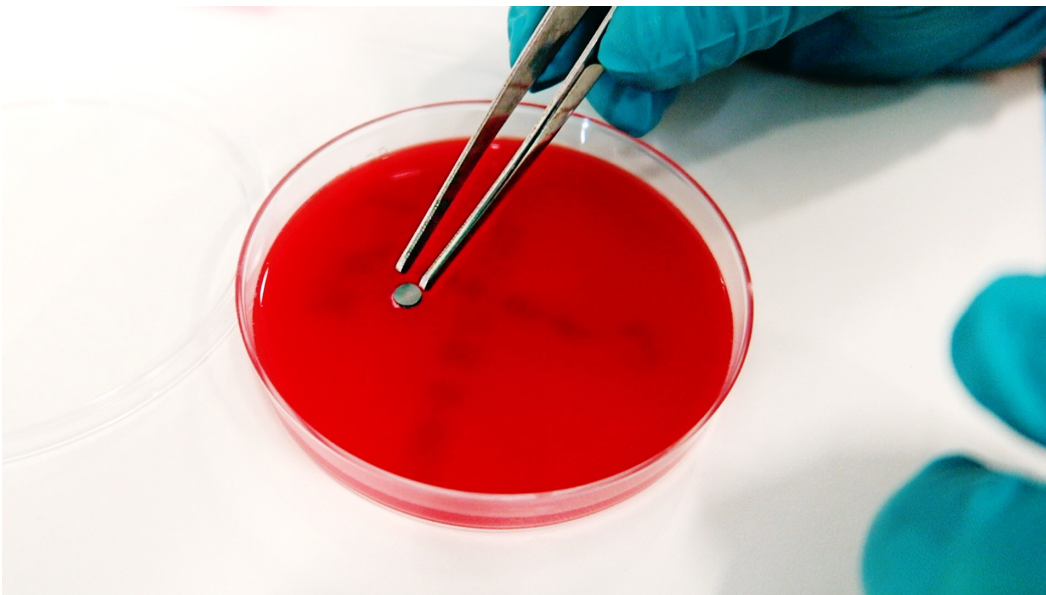


Abbildung 11: Beispielhafter, standardisierter Kontaktinokulationsschritt eines Titanprüfkörpers auf Blutagarplatte.

3.4 Fluoreszenzmikroskopie (live/dead staining)

Die Existenz und die Menge an Biofilm auf den Titanplättchen (n = 40) wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie durch live/dead staining (Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit L7012, Molecular Probes, Carlsbad, USA) untersucht. Acht weitere Prüfkörper ohne Biofilm dienten als Kontrolle.

Zum Ansetzen der live/dead staining Lösung wurden 1 µl SYTO 9 und 1 µl Propidiumiodid in 1 ml NaCl - Lösung verdünnt und anschließend für 60 min in einem dunklen Behältnis auf Eis gelagert. Die Titanprobenkörper wurden in 24 - Well Platten platziert und 10 µl der Reagenzmischung pro Well hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min unter Lichtausschluss. Daraufhin wurden die Probenkörper vorsichtig auf einen Fixieröl - benetzten Glasträger mit Abdeckungsplatte aufgebracht. SYTO 9 ist ein grün fluoreszierender DNA - Farbstoff, der vitale als auch avitale Zellen, unabhängig vom Zustand ihrer Membran, penetriert. Der rot fluoreszierende DNA - Farbstoff Propidiumiodid penetriert dagegen nur avitale Zellen mit einer erhöhten Membranpermeabilität und überlagert in diesen Zellen die Wirkung des SYTO 9 green. Gram-negative sowie -positive Bakterien mit intakter Zellwand können somit grün, zerstörte Bakterien rot fluoreszierend dargestellt werden.

Die Biofilmanalyse fand mittels Auflicht - Fluoreszenzmikroskop (Leitz DMR, Leica, Wetzlar, Deutschland), ausgestattet mit einer Digitalkamera (AxioCam MRm Rev. 3, Carl Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland) und entsprechenden Filtereinstellungen der Bildverarbeitungssoftware ZEN 2.3 (Carl Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland) statt.

Die Biofilmbedeckung der Probenkörper wurde mit zwei Aufnahmen der Titankörperoberfläche in zwei zufällig ausgewählten Arealen jedes Titanplättchens erfasst. Rot- und Grünton - Aufnahmen wurden separat vorgenommen. Die Intensitätsmittelwerte der Rot - und Grünfluoreszenz wurden in 0-255 Grauskala berechnet. Entsprechend wurden die Gesamtfluoreszenz sowie der prozentuale Anteil von Arealen ohne Fluoreszenz durch Rot/Grün Überlagerung ermittelt.

3.5 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Qualität des Biofilms wurde exemplarisch an einem zufällig ausgewählten Probenkörper jeder Untergruppe mittels Rasterelektronenmikroskopie analysiert. Ein Titanplättchen ohne Biofilm diente als Kontrolle. Die Titanprüfkörper wurden für 50 min in Glutaraldehyd (2,5 % phosphatgepufferte Salzlösung (PBS); PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) fixiert und anschließend 4 mal für 10 min mit PBS abgespült. Darauf folgend wurden die Probenkörper mit einer ansteigenden Serie von Ethanol (50 - 90 % je 10 min; 96 % 2 x 10 min) dehydriert.

Abschließend wurden die Testkörper in 1,1,1,3,3,3-Hexamethyl-disilazane (HMDS, Acros Organics, Geel, Belgien) getrocknet. HMDS wurde bei Raumtemperatur unter einem sauberen Labortisch verdampft. Alle Probenkörper wurden auf REM - Probenhaltern (Plano, Wetzlar, Deutschland) montiert und mit Platin bedampft. Die REM - Analyse fand mit einem FEI XL30 ESEM FEG (FEI Company, Eindhoven, Niederlande) bei Vergrößerungen von 1.000 zu 10.000fach statt. Die Titanoberfläche jeder Untergruppe wurde in dreifacher Ausführung auf Überreste von Biofilm oder Bakterien sowie auf durch Plasma ausgelöste strukturelle Veränderungen überprüft.

4. Ergebnisse

4.1 Mikrobiologie

In allen Testgruppen zeigte sich ein reduziertes Bakterienwachstum auf den Rodac-Platten (Abb. 12 a - d, 15 a-j) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 12e, 13a, 13b). Auf einem Kontaktpräparat der CAP I - Gruppe und zwei Präparaten der CAP III - Gruppe (Abb. 12c, 13g) waren keine Bakterienkolonien mehr zu detektieren. In der CAP II - Gruppe und der CHX - Gruppe konnten in keinem Präparat eine vollständige Entfernung gefunden werden.

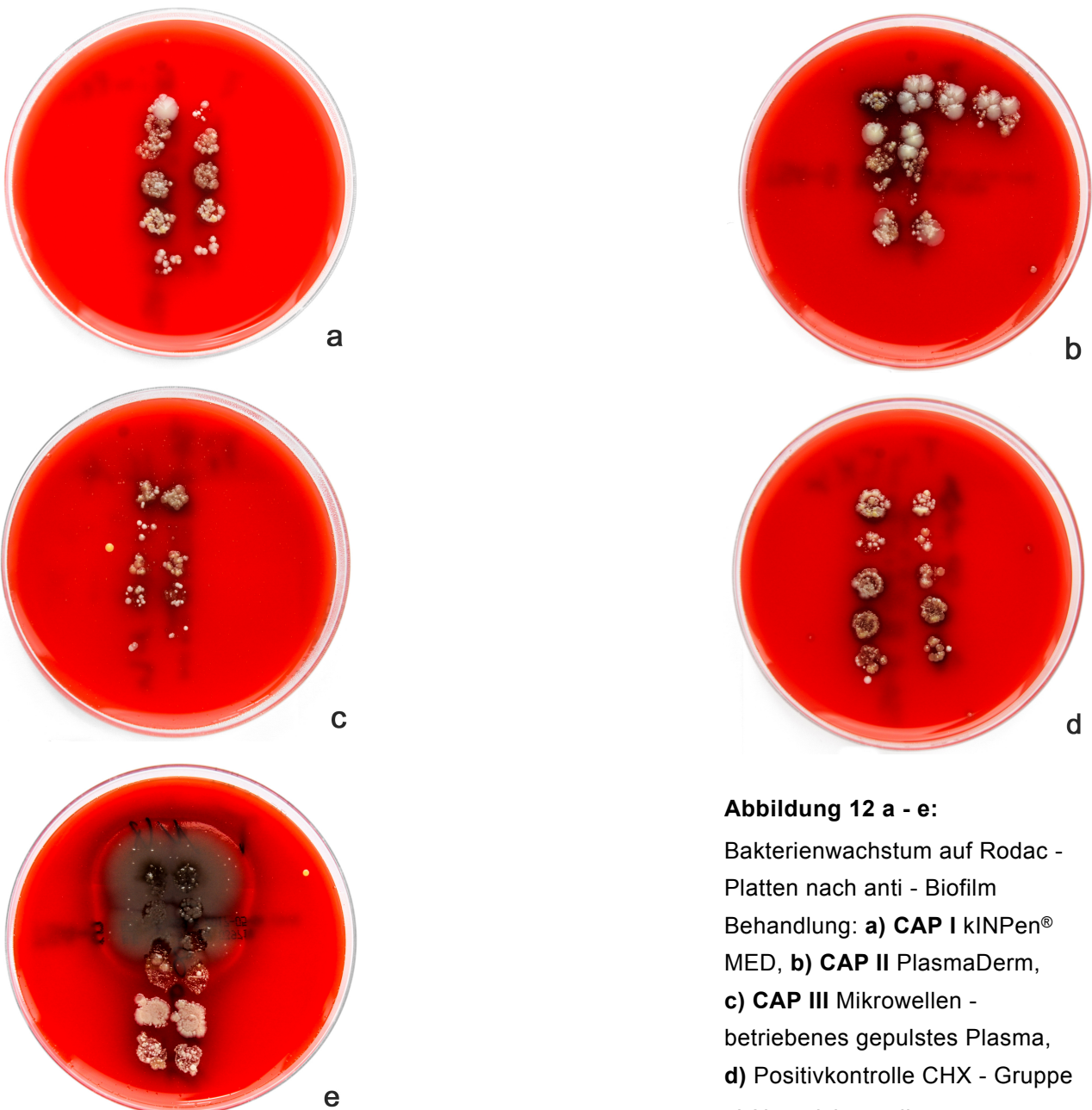


Abbildung 12 a - e:

Bakterienwachstum auf Rodac -
Platten nach anti - Biofilm
Behandlung: **a)** CAP I KINPen®
MED, **b)** CAP II PlasmaDerm,
c) CAP III Mikrowellen -
betriebenes gepulstes Plasma,
d) Positivkontrolle CHX - Gruppe
e) Negativkontrolle

Exemplarische Ausschnittsvergrößerung der Rodac - Platten

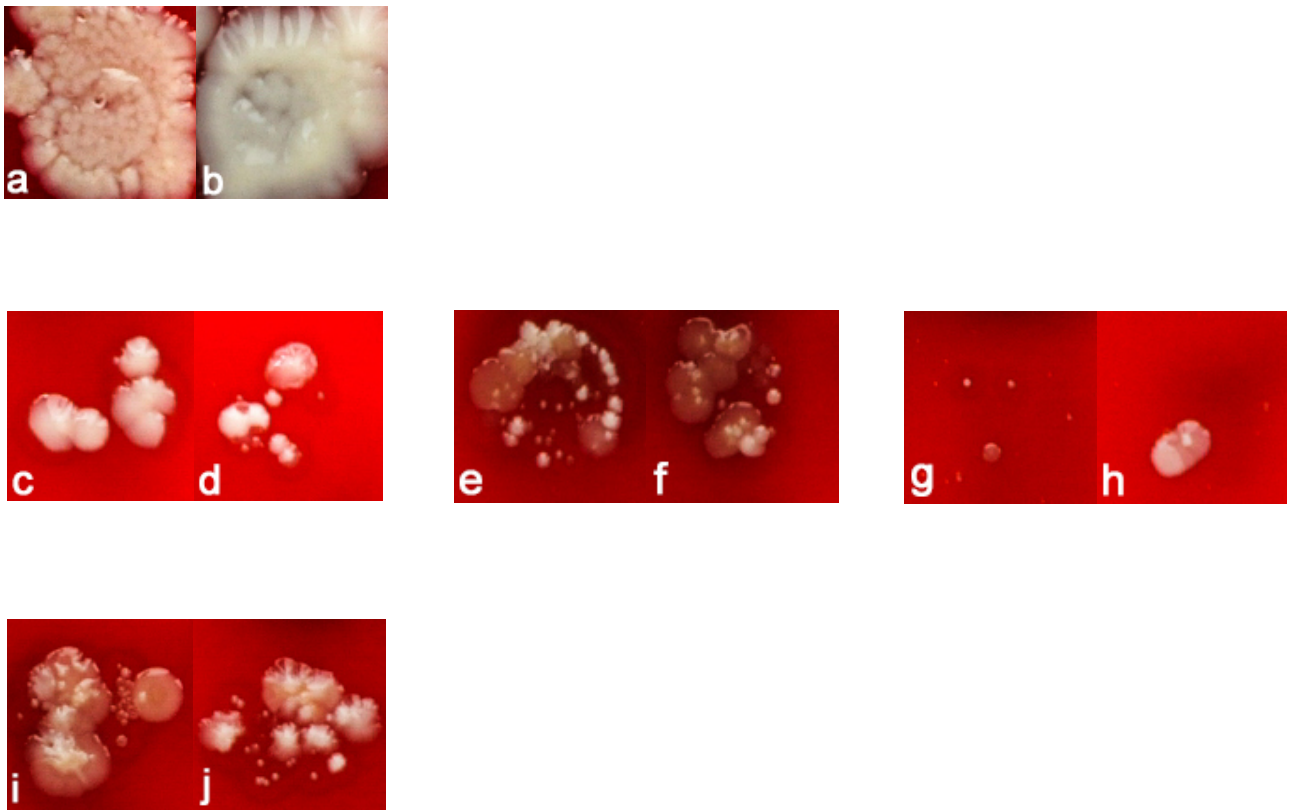


Abbildung 13 a - j: Ausschnittsvergrößerung Bakterienwachstum auf Rodac - Platten.

a) b) Negativkontrolle: keine Behandlung, nach anti-Biofilm Behandlung: **c) d) CAP I** kINPen® MED, **e) f) CAP II** PlasmaDerm, **g) h) CAP III** Mikrowellen - betriebenes gepulstes Plasma, [zu 15g die weißen Punkte in der Vergrößerung sind Luftblasen im verwendeten Blutagar und kein Bakterienwachstum], **i) j)** Positivkontrolle CHX - Gruppe.

4.2 Fluoreszenzmikroskopie (live/dead staining)

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse (Abbildungen 14a - e) zeigte eine signifikant reduzierte Biofilmbedeckung aller Testgruppen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 14a), (Tabelle 1).

Auf den Titanplättchen der Negativkontrolle, ohne anti - Biofilm Behandlung, fand sich mit großer Dominanz grüne Fluoreszenz vitaler Zellen und ein dichter, mehrschichtiger Bakterienrasen.

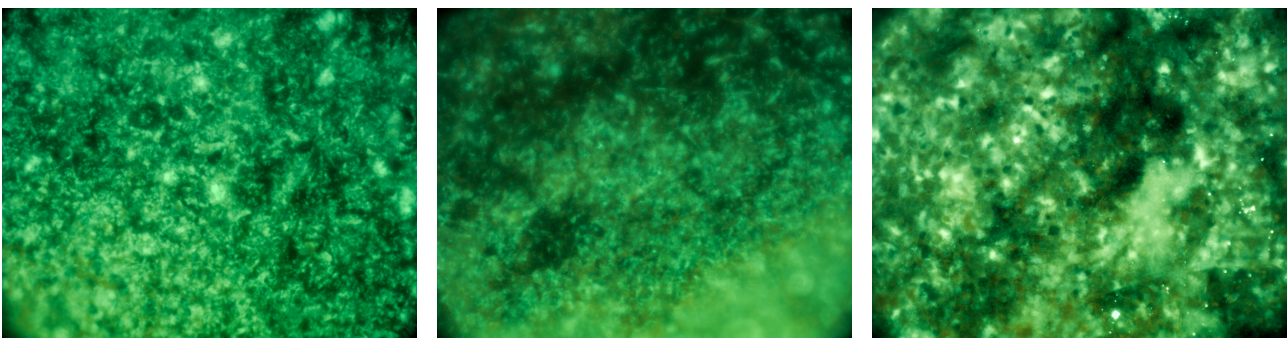


Abbildung 14a: Auswahl FM - Analyse von drei Titanprüfkörpern der Negativkontrolle ohne anti - Biofilm Behandlung.

Die Probenkörper, die mit CAP I behandelt wurden, zeigten eine geringere Biofilmbedeckung als die unbehandelte Kontrolle. Es fanden sich sowohl vitale als auch avitale Bakterien. Im Vergleich mit der Negativkontrolle war der Biofilm desintegrierter, es verblieben Biofilminseln.

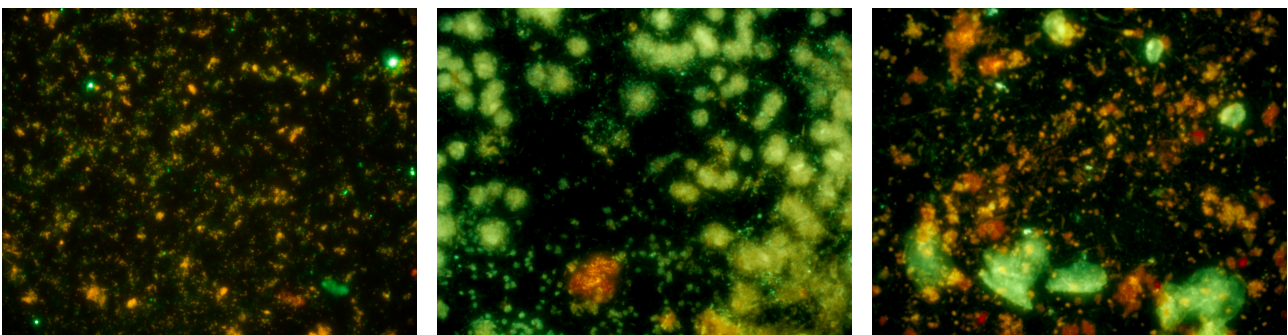


Abbildung 14b: Auswahl FM - Analyse von drei Titanprüfkörpern nach CAP I Behandlung.

Die Titanprüfkörper, die mit CAP II behandelt wurden, zeigten eine reduzierte Oberflächenbedeckung mit Biofilm im Vergleich zur Negativkontrolle. Es wurde mehrschichtige rote und grüne Fluoreszenz detektiert.

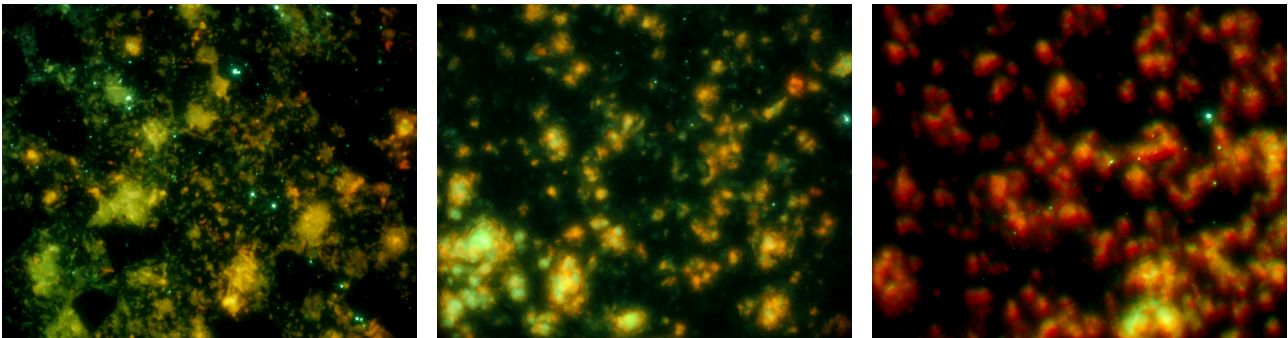


Abbildung 14c: Auswahl FM - Analyse von drei Titanprüfkörpern nach CAP II Behandlung.

Die mit CAP III behandelten Prüfkörper zeigten eine signifikant geringere Biofilmbedeckung als die Prüfkörper mit CAP II Behandlung sowie der Negativkontrolle. Es konnten Areale ohne Biofilmbedeckung detektiert werden und es dominierte rote Fluoreszenz avitaler Zellen.

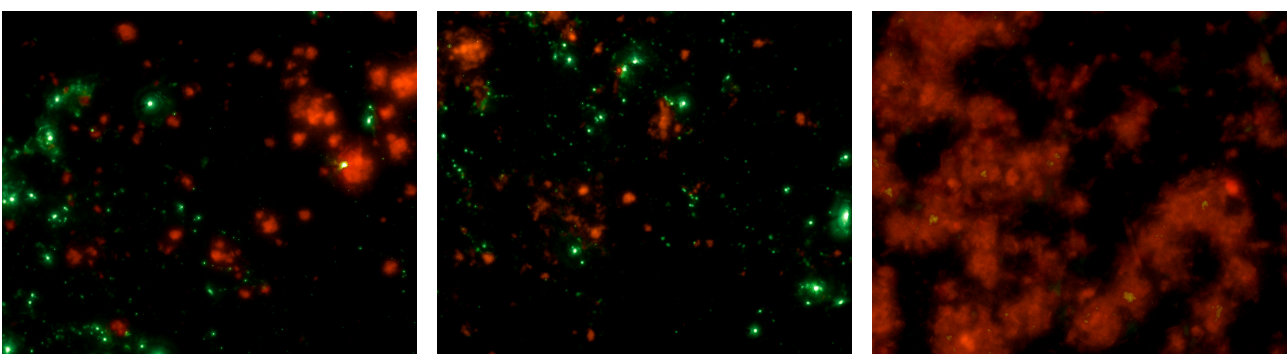


Abbildung 14d: Auswahl FM - Analyse von drei Titanprüfkörpern nach CAP II Behandlung.

Auf den Prüfkörpern der mit CHX und Kürette behandelten Positivkontrolle waren vorwiegend vitale Mikroorganismen zu finden. Die Bereiche, die mit einem Kürettenszug mechanisch bearbeitet wurden, waren von einem umgebenden dichten Bakterienrasen deutlich abzugrenzen. Bereiche ohne einen Biofilm waren nicht zu detektieren.

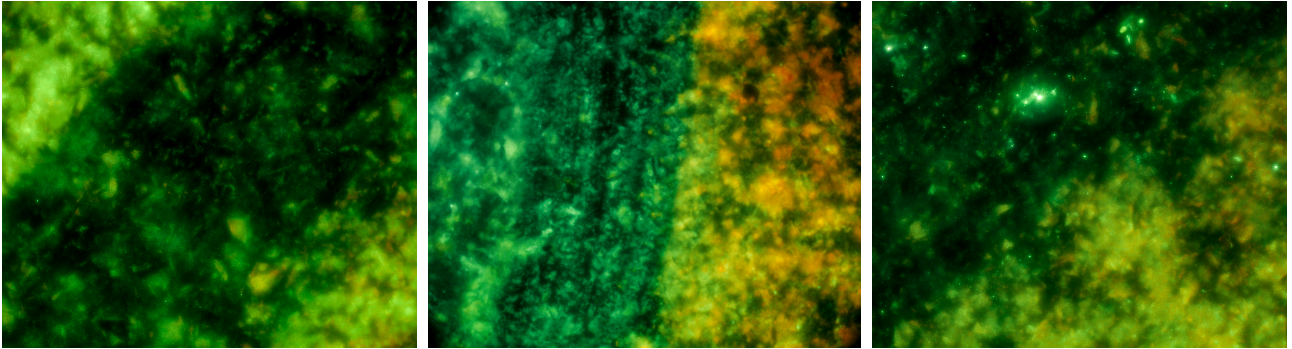


Abbildung 14e: Auswahl FM - Analyse von drei Titanprüfkörpern nach mechanischer Bearbeitung mit einer Kunststoffkürette und CHX - Behandlung.

4.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die rasterelektronenmikroskopische Analyse zeigte einen stark desintegrierten Biofilm in allen Testgruppen (Abbildungen 15b - e) im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 15a).

Die Biofilmproben der Negativkontrolle (Abbildung 15a) zeigten eine adhäsiv an die Oberfläche geheftete, mehrlagige bakterielle Bedeckung. Biofilme (Pfeile) bedeckten mehr als 50 % der Oberfläche und wurden dominiert von kokkoiden Mikroorganismen.

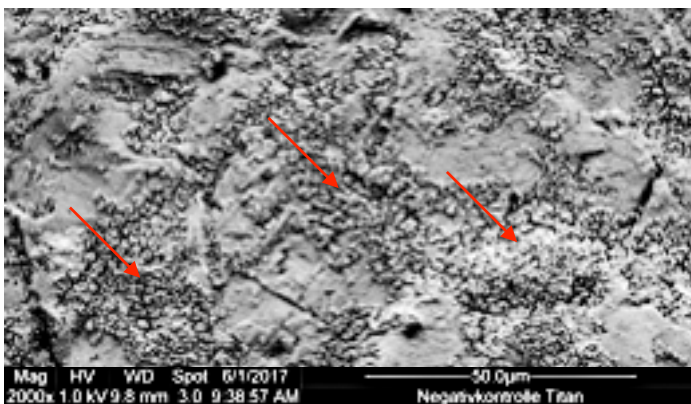


Abbildung 15a: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Biofilmproben (2000fache Vergrößerung) der Negativkontrolle. Biofilme (Pfeile) bedeckten mehr als 50 % der Oberfläche und werden dominiert von kokkoiden Mikroorganismen.

Auf den Titanprüfkörpern der mit CAP I - III bestrahlten Testgruppen (Abbildungen 15 b - d) konnte eine deutliche Reduktion und Strukturveränderung der Biofilmbedeckung detektiert werden. Der Biofilm war in allen Testgruppen deutlich reduziert im Vergleich zur Negativkontrolle. Es wurde eine unvollständige Biofilmentfernung mit Verbleib von Biofilminseln gefunden, diese zeigten kokkoide Mikroorganismen. In der Testgruppe CAP III zeigten die verbliebenen Biofilminseln eine inhomogene Oberflächenstruktur (Abbildung 15d).

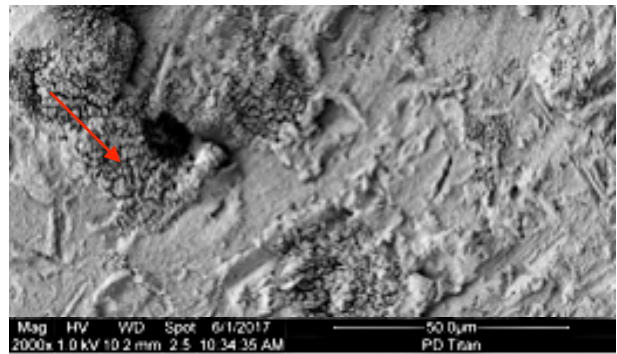
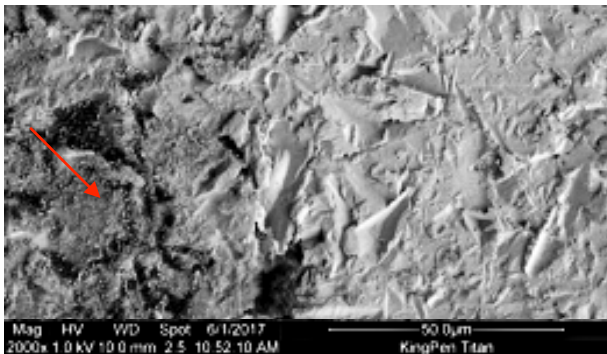


Abbildung 15b und c: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Biofilmprouben (je 2000fache Vergrößerung), **b) CAP I** kINPen® MED, **c) CAP II** PlasmaDerm. Im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 15a) ist die Biofilmbedeckung reduziert. Die verbliebenen Biofilme zeigen kokkoide Mikroorganismen.

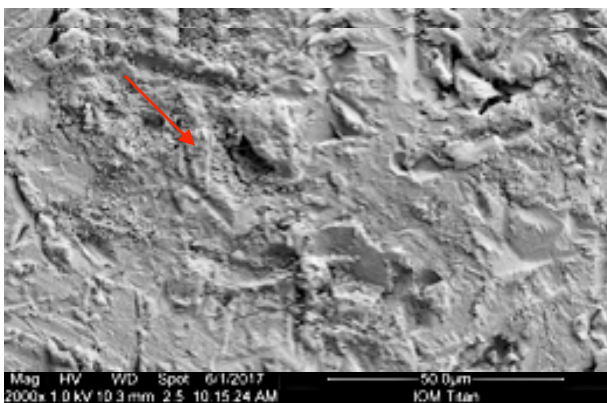


Abbildung 15d: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Biofilmprouben (2000fache Vergrößerung), **CAP III** Mikrowellen - betriebenes gepulstes Plasma. Im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 15a) ist die Biofilmbedeckung reduziert und verbliebenen Biofilme zeigen eine inhomogene Oberflächenstruktur.

Die Prüfkörper der Positivkontrolle, die mit CHX und Kürette behandelt wurden, zeigten eine kaum reduzierte Biofilmbedeckung im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 15e). Es zeigte sich eine unvollständige Biofilmentfernung, einzelne Mikroorganismen und -kolonien sowie Impressionen von Mikroorganismen.

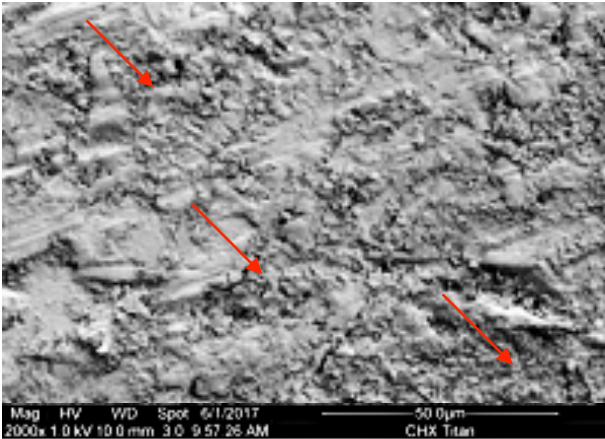


Abbildung 15e: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Biofilmprouben (2000fache Vergrößerung), Positivkontrolle CHX - Gruppe. Im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 15a) ist die Biofilmbedeckung kaum reduziert.

4.4 Gegenüberstellung der drei Plasmaquellarten

Unter den Testgruppen konnte zwischen CAP II und CAP III ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0.032$). Die mikrobiologische und fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigten ein reduziertes Bakterienwachstum und geringere Biofilmbedeckung in allen mit CAP behandelten Testgruppen als in der Kontrolle. Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung bestätigte diese Ergebnisse anhand eines umfangreich desintegrierten Biofilms in allen Testgruppen.

Mikrobiologie nach Plasmabehandlung



Abbildung 16a:
Bakterienwachstum CAP I

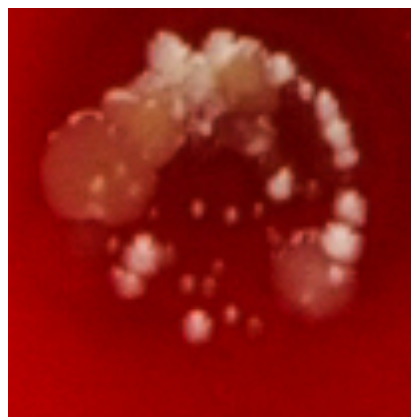


Abbildung 16b:
Bakterienwachstum CAP II

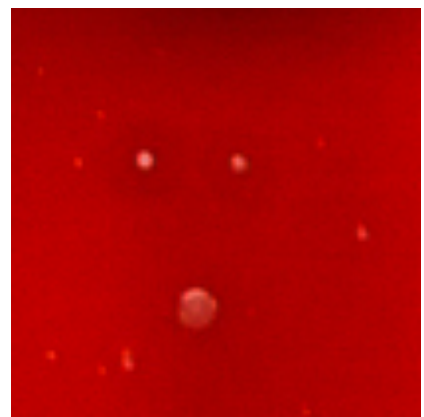


Abbildung 16c:
Bakterienwachstum CAP III
(die weißen Punkte sind
Luftblasen im verwendeten
Blutagar, kein
Bakterienwachstum)

Fluoreszenzmikroskopische Analyse nach Plasmabehandlung

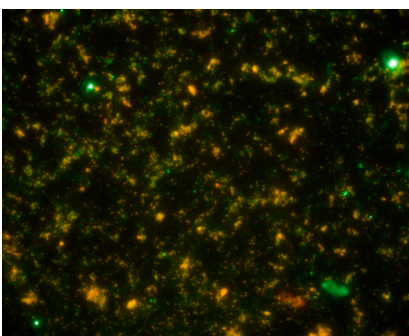


Abbildung 17a: FM Analyse CAP I

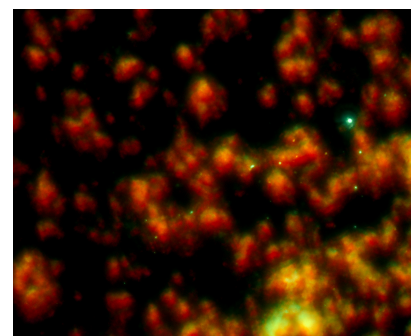


Abb. 17b: FM Analyse CAP II

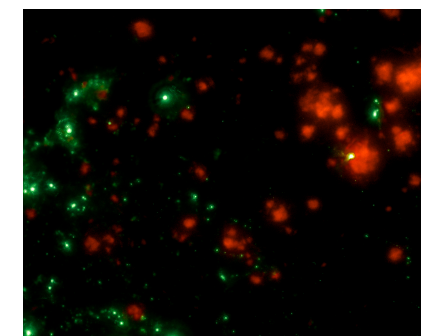


Abb. 17c: FM Analyse CAP III

Rasterelektronenmikroskopie nach Plasmabehandlung

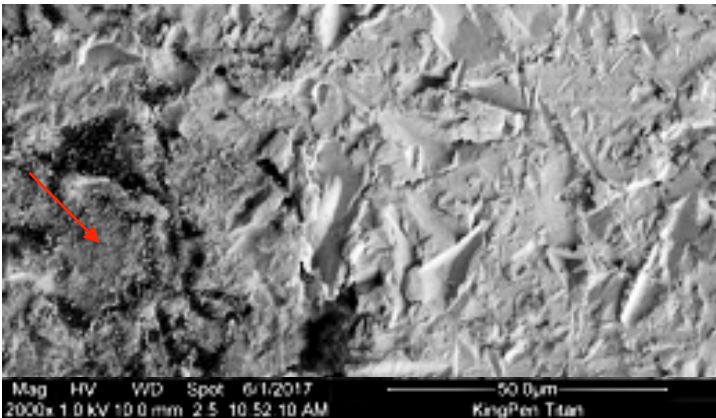


Abbildung 18a: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Biofilmprouben (2000fache Vergrößerung), **CAP I** kINPen® MED (roter Pfeil zeigt auf Biofilm).

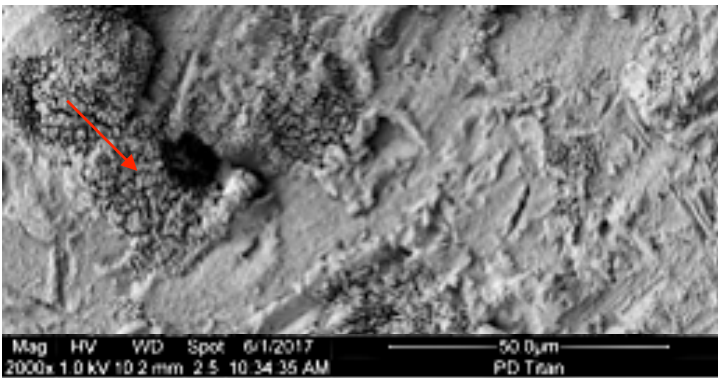


Abbildung 18b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Biofilmprouben (2000fache Vergrößerung), **CAP II** PlasmaDerm (roter Pfeil zeigt auf Biofilm).

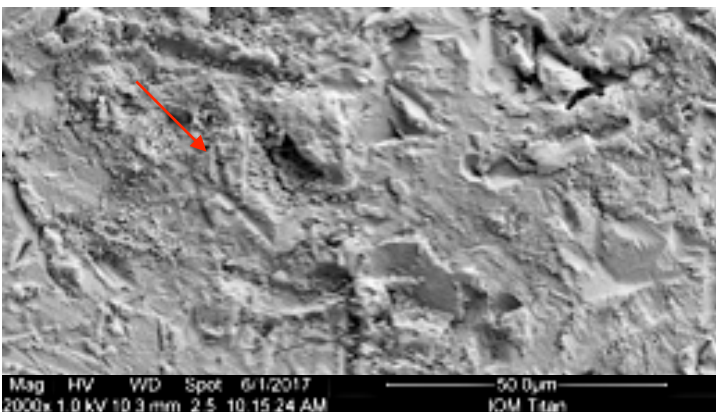


Abbildung 18c: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Biofilmprouben (2000fache Vergrößerung), von oben nach unten **CAP III** Mikrowellen-betriebenes gepulstes Plasma (roter Pfeil zeigt auf Biofilm).

Zusammenstellung der Ergebnisse

In Tabelle 1 (siehe unten) sind die Ergebnisse der mikrobiologischen Kultur, der fluoreszenzmikroskopischen sowie der REM - Analyse zusammengestellt.

Alle Testgruppen zeigten ein signifikant reduziertes Wachstum von Bakterienkolonien in der mikrobiologischen Analyse im Vergleich zur Negativkontrolle.

Die mittlere Biofilmbedeckung auf den Titanprüfkörpern war in allen Testgruppen signifikant geringer als in der Kontrolle (T - test, $p < 0.05$). Die mittlere Bedeckung der Negativkontrolle wurde als 100% gesetzt. Den niedrigsten Wert zeigte die Anwendung von CAP III mit 69,49 % Biofilmbedeckung.

In der REM-Analyse zeigte sich in allen Testgruppen ein desintegrierter Biofilm.

Im Vergleich der Testgruppen konnte nur zwischen CAP II und CAP III ein signifikanter Unterschied in der mittleren Biofilmbedeckung festgestellt werden (T - test, $p = 0.032$).

	mikrobiologische Kultur		Fluoreszenzmikroskopie	REM
	Kolonien			desintegrierter Biofilm
	komplett	reduziert	mittlere Bedeckung (%)	ja/nein
CAP I		X	72.77	ja
CAP II		X	86.83	ja
CAP III		X	69.49	ja
CHX		X	70.40	ja
Negativkontrolle	X		100.00	nein

Tabelle 1: Ergebnisse der mikrobiologischen Kultur, Fluoreszenzmikroskopie und REM Analyse.

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, drei verschiedene kalte atmosphärische Plasmaquellen auf die Entfernung von *in vivo* gebildetem oralem Multispezies - Biofilm auf infizierten Titanoberflächen zu vergleichen. Es wurde angenommen, dass eine Bestrahlung mit Plasma zu einer signifikant kleineren Biofilmbedeckung im Sinne einer effektiveren Desintegration und Inaktivierung von *ex vivo* Multispezies - Biofilmen führt und sich die Plasmaquellen in ihrer Effektivität signifikant unterscheiden.

Es wurde gezeigt, dass (i) die Bestrahlung mit allen drei generierten kalten Plasmen (indirektes Plasma kINPen® MED, direktes Plasma PlasmaDerm FLEX 9060, Mikrowellen - betriebenes gepulstes indirektes Plasma) zu einer signifikanten Reduktion der Bedeckung und Vitalität von 72h *in vivo* entwickeltem Biofilm auf Titanoberflächen führte (T - test, $p < 0.05$). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass (ii) die Effektivität der Desintegration von Biofilmen mit allen drei Plasmaquellen ein vergleichbares Ausmaß wie das mechanische Debridement in Kombination mit 0,2% Chlorhexidin - Behandlung hatte. (iii) Die experimentelle Mikrowellen - betriebene Plasmaquelle [40] reduzierte die Biofilmbedeckung in signifikant größerer Menge als die direkte Plasmaquelle ($p = 0.032$). Alle anderen Gruppen waren bezüglich der Entfernung von Biofilmbedeckung nicht signifikant unterschiedlich. In keiner Testgruppe kam es zu einer vollständigen Entfernung des Biofilms, damit konnte die Hypothese nur teilweise bestätigt werden.

Zu berücksichtigen ist, dass Plasma und Luft - Wasser - Spray nur einmalig zum Einsatz kamen. In einer methodisch weitgehend vergleichbar durchgeführten *ex vivo* Studie [116] konnte Biofilm auf Titanprüfkörpern nach deren zweifacher Anwendung und einer damit deutlich verlängerten Anwendungszeit vollständig entfernt werden. In der vorliegenden Studie war die gänzliche Biofilmentfernung jedoch nur sekundärer Gegenstand der Untersuchung. Maßgeblich war der Vergleich der drei eingesetzten Plasmaquellen.

Die Biofilme zeigten sich auch mit der kürzeren, einmaligen Applikation unserer Studie nach Bestrahlung schon deutlich desintegriert und reduziert. Allein durch den Einsatz

einer weiteren Anwendungssequenz kann eine Steigerung der Behandlungseffektivität erwartet werden. Die Effektivitätsunterschiede der einzelnen Plasmaquellen könnten nach doppelter Anwendungssequenz signifikant größer werden. Weiterhin zeigten Untersuchungen, dass die Bestrahlung mit Plasma die Oberflächenadhärenz von Biofilmen zwar stark herabsetzt, für deren Entfernung von dieser Oberfläche aber der Einsatz von starkem Wassersprühdruck notwendig ist [50, 116]. Es ist denkbar, dass durch die Kombination von erhöhtem Wassersprühdruck und einer der in der vorliegenden Studie genutzten Plasmaquellen eine signifikant größere Entfernung von Biofilmen möglich ist als mit einer der Vergleichsquellen.

Einer Untersuchung zufolge konnte die Vorbehandlung von Oberflächen mit Vitamin C die Reduktion von 48 h entwickelten Biofilmen mit kaltem atmosphärischen Plasma signifikant verbessern [151]. Durch einen kombinierten Einsatz von Vitamin C mit CAP könnte dessen antibakterielle Wirksamkeit *in vivo* gesteigert werden.

Wie in unserer Untersuchung gezeigt, sind alle drei getesteten Plasmaquellen geeignet, etablierten Biofilm auf Titanprüfkörpern zu reduzieren, dessen Vitalität zu minimieren und dessen Struktur zu desintegrieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Applikationszeit von unter zwei Minuten dafür ausreichend war. Damit ist ein klinisch akzeptabler Zeitrahmen, auch bei doppelter Anwendungssequenz gegeben.

Obwohl mit CAP III in unseren Untersuchungen signifikant mehr Biofilm entfernt werden konnte als mit CAP II, ergeben sich für CAP III klinische Hindernisse. Das Mikrowellen - betriebene gepulste Plasma (CAP III) ist bisher nur als stationärer Prototyp verfügbar. Eine Anwendung in der Klinik ist gegenwärtig nicht möglich. Für einen Einsatz in der Klinik wäre zunächst die Entwicklung einer portablen Steuereinheit notwendig. Untersuchungen zeigten jedoch, wie eingangs beschrieben, das hohe Potential von CAP III für den Einsatz in der klinisch - dentalen Therapie. Die ungefährlichen Gastemperaturen, Hitzefluss sowie UV- und Ozonemission, Patienten Ableitstrom [40] und eine mögliche Einsatzzeit von bis zu 19min, die für die antimikrobielle Applikation in der Zahnmedizin ausreicht [50], als auch die in unserem Versuch belegte Wirksamkeit bei einem klinisch denkbar einhaltbaren Abstand von 3 mm sind für die Anwendung von CAP III am Menschen vielversprechend. Der spitz gestaltete Plasmaapplikationsansatz lässt einen guten Zugang zur Implantatoberfläche erwarten und könnte das Handling vereinfachen. Darüber hinaus würde seine

computergesteuerte Oberflächenbearbeitung vom manuellen Geschick des Anwenders unabhängig machen.

Der bereits in der therapeutischen Anwendung befindliche kINPen® MED (CAP I) wird zur Zeit speziell für die dentalen Gegebenheiten weiterentwickelt (kINPen® DENT, neoplas tools, Greifswald, Deutschland). Es erscheint möglich, den in unserer Methode verwendeten Arbeitsabstand von 3 mm einzuhalten. Damit ist er in Bezug auf die Handhabung dem direkten Plasmasystem CAP II (PlasmaDerm FLEX 9060) sowie dem noch nicht klinisch einsetzbaren CAP III bei intraoralem Einsatz überlegen. Der Applikationsansatz von CAP II scheint durch seine runde, mit einem Schwamm bestückte Form für die intraorale Anwendung überdimensioniert und für eine direkte Auflage auf der Implantatoberfläche ungeeignet. Es ist zu erwarten, dass bei einem klinischen Einsatz von CAP II auf Implantatoberflächen der von uns gewählte Abstand von 2 mm nicht einzuhalten sein könnte. Zur Zeit wird an einem miniaturisierten, kabellosen, noch nicht kommerziell erhältlichen DBD - Prototyp gearbeitet (Cinogy, Duderstadt, Deutschland), der alle technischen Komponenten sowie den Akkumulator beinhaltet. Mit einem solchen Gerät könnte der intraorale Zugang vereinfacht werden. Diese Entwicklung muss abgewartet und weitere Studien zum Einsatz *in vivo* durchgeführt werden, um eine Aussage über die Möglichkeit des klinischen Einsatzes aller Plasmaquellen treffen zu können.

Der geringe gerätschaftliche Aufwand, bestehend aus transportablem Handstück mit Steuerungseinheit, des PlasmaDerm FLEX 9060 (CAP II) könnte im klinischen Alltag vorteilhaft sein. Die Steuerungseinheit ist, aufgrund der Verwendung von Umgebungsluft als Medium zur Erzeugung von Plasma, einfach zu transportieren. Der externe Druckminderer zur Einspeisung von Argon macht den Transport des kINPen® MED (CAP I) dagegen aufwändiger. An einer Miniaturisierung wird derzeit gearbeitet (kINPen® DENT, neoplas tools, Greifswald, Deutschland). Die Einheit von CAP III ist nicht transportabel.

Generell gilt, dass die Dosis von ROS / RNS erzeugt durch Plasma - Jets (CAP I und CAP III) charakteristischer Weise verhältnismäßig hoch ist. Die Radikale werden mit dem Gasstrom an den Wirkungsort transportiert, wo deren Ionenkonzentration allerdings, aufgrund von Rekombination außerhalb des elektrischen Feldes, relativ klein ist. Außerdem strahlen vor allem Edelgasplasmen (CAP I Argon - Verwendung,

CAP III Helium - Verwendung) viel UV - Strahlung ab. Deren Intensität verkleinert sich aber im Quadrat des Abstands zwischen Quelle und Wirkungsort (gemäß $I = 1/d^2$). DBD - Quellen (CAP II) können im Vergleich dazu mehr Photonen und Ionen lokal wirksam werden lassen, da diese direkt am Ort der Exposition emittiert werden [41]. Diese Gegebenheiten könnten zu einer signifikant größeren Biofilmentfernung mit einer der getesteten Plasmaquellen *in vivo* führen.

In unserer Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass die Effektivität der Biofilmdesinfektion durch einzeitige Anwendung atmosphärischen Plasmas in Kombination mit Luft - Wasser - Spray der Effektivität des mechanischen Debridements in Kombination mit 0,2 % CHX Lösung entspricht. In einer anderen *in vitro* Studie konnte die Applikation von CAP für 600 s auf *P. aeruginosa* Monospezies Biofilm eine höhere antimikrobielle Reduktion als die Behandlung mit 0,1 % CHX erreichen [115].

In der klinischen Praxis stehen CHX - Präparate mit höheren Wirkstoffkonzentrationen zur Verfügung als in den genannten Studien, sodass eine höhere Desinfektionswirkung anzunehmen ist. CHX - Anwendung, beispielsweise im adjunktiven Einsatz im Rahmen einer konventionellen Periimplantitistherapie, führt jedoch auch zur Abtötung von Mikroorganismen die nicht periimplantopathogen sind. Zusätzlich ist es mit CHX - Lösung oder - Gel nicht möglich, präzise und punktuelle Desinfektionen der Oberfläche wie mit quadratmillimetergenauer Plasmaanwendung durchzuführen [8, 26].

Die mechanische Bearbeitung mit Küretten kann die empfindliche Oberflächentextur des Implantats zerstören. Durch Plasmaanwendung wird die für die Osseointegration wichtige Oberflächentextur nicht verändert. Im Gegenteil konnten sogar optimierte Materialeigenschaften von Titanoberflächen, wie eine gesteigerte Benetzbarkeit und verbessertes Wachstumsverhalten von Fibroblasten und Osteoblasten, nach Plasmaanwendung dokumentiert werden [118, 125]. Darüber hinaus wurde im Hundemodell eine optimierte Osseointegration von Implantaten sechs Wochen nach Behandlung mit kaltem atmosphärischem Plasma beobachtet [131].

Ein gleichmäßiger mechanischer Biofilmaustrag auf der Gesamtoberfläche des Implantats ist mit Küretten, im Vergleich zum hindernisfreien Zugang in der vorliegenden Studie, vom intraoralen Zugang aus erschwert. Umliegende anatomische

Strukturen und ggf. die freiliegende Gewindestruktur des Implantats, als auch die Abhängigkeit vom manuellen Geschick des Anwenders lassen einen geringeren und unregelmäßigen Biofilmbau *in vivo* erwarten. In der vorliegenden Studie konnten in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse Bereiche mit Kürettenzug klar von der nicht bearbeiteten Umgebung abgegrenzt werden.

In einer jüngst durchgeführten Untersuchung konnte zudem mit indirektem Plasma (KINPen® MED) *in vivo* entwickelter Biofilm auf extrahierten Zähnen in analogem Umfang wie mit mechanischer Reinigung entfernt werden[117].

Aufgrund der Präzisionsansätze und dem immer konstant bleibenden Plasmafluss der als Medizinprodukt zugelassenen Plasmaquellen ist durch ein erleichtertes Handling und eine Minimierung von der Abhängigkeit des Behandlersgeschicks, eine verbesserte Desinfektionseffektivität mit gleichmäßiger Verteilung auf der Implantatoberfläche bis in schwierig erreichbare, unter sich gehende Bereiche zu erwarten.

Eine gleichsam oberflächenschonende Alternative gegenüber der mechanischen Periimplantitistherapie mit Küretten ist die Anwendung verschiedener Laser - Therapien [8]. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, konnten diese jedoch nur initial zur Verbesserung einer Periimplantitis führen und darüber hinaus nicht für eine Reduktion der Keimbelastung sorgen [31]. Darüber hinaus konnte indirektes Plasma (KINPen® MED) artifiziellen Biofilm *in vitro* effektiver als die Anwendung eines Diodenlasers entfernen [120].

Bis heute sind keine Resistenzen von spezifischen Mikroben oder permanente ungewünschte Effekte für die Behandlung mit kaltem atmosphärischem Plasma bekannt [49, 61, 67, 68, 71, 81].

In unserer Studie wurden bei Einsatz von CAP die Temperaturen von 35 - 40°C nicht überschritten. Damit sind alle von uns getesteten Plasmen für eine schmerzarme klinische Behandlung geeignet (bezugnehmend auf DIN SPEC 91315:2014-06 (Allgemeine Anforderungen an medizinische Plasmaquellen)) [152]. Daneben könnten die Regeneration von Knochenstrukturen und eine Beschleunigung der Wundheilung bei periimplantären Entzündungen durch die Behandlung mit kaltem Plasma möglich sein [48, 49].

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der vorliegenden *ex vivo* Untersuchung das Potential von drei verschiedenen kalten atmosphärischen Plasmaquellen zur Reduktion von oralem Multispezies - Biofilm und Desinfektion von Titanoberflächen zur Verwendung in der regenerativen Periimplantitistherapie.

Bezugnehmend auf die Ergebnisse anderer Studiengruppen nehmen die Autoren an, dass die Kombination von adjunktiver Applikation kalten atmosphärischen Plasmas und antimikrobiellen Agenzien sowie mechanischem Debridement zu einer gesteigerten antimikrobiellen Effektivität, beziehungsweise zu einer effektiveren Elimination von Biofilm führt als Mono - Therapien [116, 118, 120, 153].

Darüber hinaus existiert bis heute keine Methode, die Biofilm auf Implantatoberflächen vollständig desinfiziert und eliminiert, ohne die Materialeigenschaften der Oberfläche zu zerstören. Zu diesem Zweck könnte Plasmabehandlung eine oberflächenschonende, atraumatische, non - invasive, zeiteffiziente Therapieoption zur Oberflächendesinfektion darstellen. Es sind weitere Studien sind notwendig um zu untersuchen, wie diese adjunktive Plasma - Biofilmbehandlung optimiert werden kann.

5.2 Kritische Betrachtung der Versuchsmodelle und Untersuchungsmethoden

Versuchsmodelle

Grundsätzlich sind *ex vivo* Studien und deren Ergebnisse in ihrer Relevanz für die Situation *in vivo* limitiert. Die Erkenntnisse die aus diesen Untersuchungen gewonnen wurden müssen deshalb als Ansätze zur Entwicklung einer klinische Anwendung verstanden werden.

In vivo können sich Biofilme auf Implantatoberflächen gegebenenfalls ohne jede antimikrobielle Einwirkung über mehrere Tage und Monate entwickeln. Daraus kann sich eine dickere Biofilmschicht als in unserem 72 h Modell ergeben. In einer Studie hat sich bereits gezeigt, dass Bakterien in dickeren Biofilmen resistenter gegenüber der Anwendung von Plasma waren und besser überleben konnten [94]. Hinzu kommt, dass das umliegende Gewebe der Implantate sowie umgebende anatomische Strukturen als physisches Hindernis die Plasmaapplikation *in vivo* erschweren.

Die Anforderungen an das Design der Plasmaquell - Applikatoren richtet sich nach Handling und Umgebungsmaterial. Konkret ist eine Miniaturisierung für den begrenzten intraoralen Raum erforderlich um eine möglichst optimale Anwendung und damit maximierte Plasmawirkung zu gewährleisten. Es könnte demnach sein, dass die Plasmawirkung *in vivo* aufgrund der genannten Gegebenheiten geringer ausfällt als in unserem *ex vivo* Versuch.

Darüber hinaus wurde belegt, dass der Sterilisationseffekt von Plasma reduziert wird, wenn die mikrobiellen Zellen vor der Behandlung in einem wässrigen Puffer eingebettet sind [68]. Aufgrund des umgebenden Speichels, Sulkusflüssigkeit und weiterer Exsudate, sind intraorale Implantate und damit die darauf befindlichen Bakterien von einem feuchten Milieu umgeben. Dies könnte ebenso zu einer verminderten Desinfektionswirkung von Plasma bei intraoraler Anwendung führen.

Demgegenüber konnten Studien [41] Anhalte liefern, dass die Mikrobiozidie von CAP in Flüssigkeiten ausgeprägter sein könnte als unter semi - feuchten bzw. trockenen Bedingungen. Unter den feuchten Gegebenheiten *in vivo*, würde der mikrobiozide Effekt von CAP hiernach eher verstärkt. Weitere Studien sind notwendig um diesen kontroversen Sachverhalt abschließend zu klären und eine Aussage für die Effizienz einer klinischen Anwendung treffen zu können.

Die vergleichsweise einfache Morphologie der in unserer Studie verwendeten titanen Probenkörper steht im Gegensatz zur komplexen Morphologie klinisch eingesetzter Implantate. Im Zweifel könnte eine geringere Effektivität auf den komplexen Oberflächen dentaler Implantate und damit verminderte Dekontamination *in vivo* vorliegen.

Untersuchungsmethoden

In der vorliegenden Studie wurden die Biofilme auf den zuvor mit kaltem atmosphärischen Plasma bestrahlten und mit Luft - Wasser - Spray abgesprühten Titanprüfkörpern fluoreszenzmikroskopisch (live/dead staining) untersucht. Die Ergebnisse wurden untereinander sowie mit den Ergebnissen von mechanisch mit Küretten bearbeiteten und 0,2 % CHX gespülten als auch von unbestrahlten Biofilmen verglichen. Es wurde die Vitalität bzw. Avitalität verbliebener Mikroorganismen der behandelten Biofilme untersucht. Darüber hinaus wurde die desinfizierende Effektivität und verbliebene Biofilmbedeckung nach anti - mikrobieller Behandlungen bestimmt.

Mehrlagige Biofilme sind aufgrund einer begrenzten Schärfentiefe der Aufnahmen des Fluoreszenzmikroskops schwierig zu untersuchen.

Alternativ wäre eine Analyse mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CSLM) möglich gewesen. Gegen diese sprach die hohe Anzahl an Titanprüfkörpern und die Biofilmbeeinflussung während der einige Minuten in Anspruch nehmenden Bildaufnahme durch den Laser.

Des Weiteren wurden RODAC - Kontaktpräparate angefertigt und nach 24 h sowie 48h Inkubation das mikrobielle Wachstum der Präparate ausgewertet. So konnte der Verbleib von wachstumsfähigen Mikroorganismen nach anti - Biofilm Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen bewertet werden.

Durch zusätzliche Untersuchung des Biofilms auf den Titanprüfkörpern mittels Rasterelektronenmikroskopie konnten die gewonnenen Ergebnisse untermauert werden, indem die Mikrostruktur der Oberflächen hochauflösend charakterisiert wurde. Begleitend dazu wären transmissions - elektronenmikroskopische Untersuchungen

interessant, um die Morphologie einzelner Bakterienzellen, wie zum Beispiel eine intakte oder zerstörte Matrix oder Zytoskelett, zu bewerten.

Da nach der Untersuchungsreihe klar wurde, dass der Biofilm nicht vollständig entfernt werden konnte, hätte eine zweite Versuchsreihe mit veränderten Parametern (z.B. Verdopplung der Anwendungssequenz) durchgeführt werden können. Dazu wären neue Oberkiefersplints und erneute *in vivo* Biofilmmakkumulation für eine ausreichende Anzahl an Titanprüfkörpern nötig gewesen. Dies war im zeitlichen Rahmen der Studie nicht praktikabel.

5.3 Fazit anderer Autoren

Kongruent zum Fazit der vorliegenden Studie kamen andere Autoren zu dem Schluss, dass Plasma als adjuvantes Therapiemittel in der Behandlung von Biofilm assoziierten Erkrankungen (wie z.B. Parodontitis und Periimplantitis) vorteilsbringend eingesetzt werden kann [114, 117, 118, 128]. Ebenfalls wurde die Applikationszeit als ausschlaggebender Faktor für die Effektivität der Plasmaanwendung angeführt [114, 117, 154]. Darüber hinaus wurden weitere positive Effekte wie die verbesserte Benetzbarkeit und Osseointegration von Implantaten und das Potential für beschleunigte Heilung beschrieben [94, 118, 128, 138].

5.4 Perspektiven

Implantat bezogene Plasmaanwendung

Neben der in dieser Studie untersuchten Effektivität zur Desinfektion und Desintegration von Biofilmen in der Behandlung von Biofilm - assoziierten Erkrankungen durch Bestrahlung mit drei verschiedenen Plasmaquellen gibt es weitere vielversprechende Ansätze für eine klinische Anwendung von CAP. Je nach Therapieansatz wird versucht, dessen einzelne Wirkmechanismen nutzbar zu machen.

Nicht nur in der Therapie einer bereits manifestierten Periimplantitis kann kaltes atmosphärisches Plasma zur Anwendung kommen. Es gibt mögliche prophylaktische Wirkungen, um bereits der Entstehung von Entzündungen im Implantatbett vorzubeugen. Studien zeigten, dass eine Plasma - induzierte Verbesserung der Benetzbarkeit von Implantatoberflächen eine Linker - vermittelte Anbindung antimikrobieller Peptide direkt an die Titanoberfläche des Implantats ermöglichen kann. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Periimplantitis könnte somit gesenkt werden [118, 155].

Das Ziel einer erfolgreichen Periimplantitistherapie ist die Ausheilung der Entzündung und die anschließende knöcherne Regeneration nach erfolgter Entfernung mikrobieller Plaque und derer Endotoxine. Von Interesse für die Heilung und Regeneration des umliegenden Gewebes nach Periimplantitistherapie, aber auch nach der

vorangegangenen, eigentlichen Insertion des Implantates, ist das bereits in der Einleitung erläuterte, durch Plasmabehandlung beschleunigte Heilungs- und Regenerationspotential von Wirtszellen. Derzeit finden die Effekte einer verbesserten Heilung, gesteigerten Angiogenese und Reepithelialisierung durch CAP-Behandlung vor allem in der Dermatologie Anwendung [61, 142, 145].

Im zahnmedizinischen Bereich wurde bei Patienten mit Wundheilungsstörungen nach komplizierten cranio - maxillo - fazialen Operationen ein vollständiger Verschluss der Wunden nach zusätzlicher Plasma - Bestrahlung neben der regulären Wundversorgung erreicht [150]. Bisher ist die Zahl vor allem klinischer Studien zur verbesserten bindegewebigen Heilung noch sehr gering. Weitere Untersuchungen wären wünschenswert, um das Potential einer verbesserten Einheilung von Implantaten in das Implantatbett, wie auch einer verbesserten Ausheilungschance von Periimplantitis durch Plasmabestrahlung zu bewerten.

Könnte ein entzündungsbedingt reduziertes Knochenniveau durch CAP - Anwendung nicht nur stabilisiert, sondern sogar regeneriert werden, würde dies den Folgen von Periimplantitis, wie zum Beispiel Verlust von Festigkeit, entgegenwirken und damit die Chance auf Implantaterhalt positiv beeinflussen. Eine verbesserte Knochenregeneration in der primären Einheilphase von Implantaten ist ausschlaggebend für dessen erfolgreiche Implantation und anschließende Belastungsfähigkeit. In zwei *in vitro* Studien zeigten sich bereits günstige Effekte der Knochenneubildung, sowie verbesserte Osseointegration nach CAP Behandlung auf rauen Titanoberflächen [127, 128]. Eine weitere Studie konnte die Stimulation von Osteoblastendifferenzierung durch Plasmabestrahlung und damit dessen möglichen Einsatz zur Förderung der Knochenregeneration belegen [130]. In diesem Zusammenhang sind weitere Studien notwendig, um eine CAP - geförderte verbesserte Knochengeneration und -regeneration für die Anwendung im zahnmedizinischen Bereich zu untersuchen.

Weitere zahnmedizinische Anwendungsfelder

Zu den Biofilm assoziierten Erkrankungen des oralen Raumes gehört auch, wie eingangs erläutert, die Parodontitis. *In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass CAP - Behandlung von humanen periodontalen Ligamentzellen Marker der periodontalen Wundheilung regulieren konnte [143]. Damit erscheint eine adjunktive Anwendung von CAP auch in der Parodontitistherapie möglich.

Ein weiteres Feld für die Anwendung von kaltem atmosphärischen Plasma sind endodontologische Fragestellungen. *In vitro* Studien beschrieben bisher die adjunktive Einsatzmöglichkeit von Plasma zur Desinfektion von Wurzelkanälen [156, 157]. Im Bereich der konservierenden Zahnheilkunde konnte an artifiziellem *S. mitis* Biofilm auf Wurzeloberflächen sowie *ex vivo* an Wurzelkaries auf extrahierten Zähnen eine gesteigerte Desinfektion nach Plasmabestrahlung gezeigt werden [158]. Für einen Einsatz in der restaurativen Zahnmedizin wurde in einer Studie die erhöhte Benetzbarkeit von Schmelz und Dentin nach Plasmajet - Applikation beschrieben. Dies ging mit einer erhöhten Penetration von Adhäsiven in die bestrahlten Areale von Schmelz und Dentin einher [39, 159].

Plasma zeigte darüber hinaus auch eine desinfizierende Wirkung bei Anwendung in intraoralen, mukosalen Umgebung. Die initiale Adhärenz von *Candida albicans*, einem Auslöser der oralen Prothesenstomatitis, wurde auf PMMA - Oberflächen durch Plasmabehandlung verringert [160]. Außerdem konnte eine durch *C. albicans* ausgelöste orale Candidiasis durch adjuvante Plasmabehandlung von Erythemen signifikant besser reduziert werden [64].

Weitere Studien sind notwendig um zu überprüfen, ob diese Untersuchungsergebnisse für eine klinische Anwendung in der Zahnmedizin übertragbar sind.

Erkrankungen der humanen Mukosa sowie von Infektionskrankheiten können viral ausgelöst werden. CAP Anwendung hatte eine nachweislich desinfizierende Wirkung auf oral auftretende Viren, wie zum Beispiel humane Herpesviren [161], humane Papillomaviren [162, 163] und Adenoviren [164]. Darüber hinaus wird die Möglichkeit der Anwendung von CAP in der anti - HIV - Therapie diskutiert [165].

Um zu überprüfen, ob die experimentellen Verfahren mit kaltem atmosphärischen Plasma für viral ausgelöste Mund - Schleimhaut - Erkrankungen sowie systemische Erkrankungen eine Therapieoption für den klinischen Einsatz darstellen, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Überdies besitzt Plasma das Potential zur Anwendung in der Therapie verschiedener maligner Tumoren [51, 166]. Es entwickelte sich das neu entstandene Feld der "Plasma - Onkologie". Gegenwärtig finden Studien statt, um die Bandbreite von Tumoren, die mit adjunktiver Plasmabestrahlung behandelt werden können, zu erweitern. Es wird versucht, den bisher wenig verstandenen Mechanismus für die Tumorbekämpfung mit CAP aufzudecken.

Bisher zeigten Studien, dass CAP in der Lage ist, Plattenepithelkarzinomzellen selektiv abzutöten [167-171]. Eine Inaktivierung von Osteosarkomzellen [155, 172], colorectalen Krebszellen [173], Lungenkarzinomen [174] sowie Glioblastomen [175, 176] scheint mit Plasmabehandlung bereits möglich.

Als ein zugrunde liegender Mechanismus für die hohe Selektivität von CAP gegen Tumorzellen wurde belegt, dass Karzinomzellen selektiv von Plasma - induzierten reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (engl. reactive oxygen and nitrogen species, RONS) zu einer apoptotischen Zellantwort geleitet wurden [168]. In Melanomzellen konnte durch CAP - Anwendung der Calcium - Influx getriggert werden [177]. Bestimmten Mitgliedern der Tumornekrosefaktor - Familie (v.a. Fas) und einer Überlastung intrazellulärer Stickstoffoxide (engl. nitric oxides, NO) sowie Proteinen (z.B. Sestrin2) konnte eine Beteiligung an der durch CAP ausgelösten Apoptose von Tumorzellen nachgewiesen werden [171].

Kaltes atmosphärisches Plasma zeigt sich somit als Fachbereiche übergreifende Möglichkeit zur Anwendung in Medizin und Zahnmedizin. CAP - Behandlung erfordert hohen wirtschaftlichen und apparativen Aufwand. Um die Details zur Wirkungsweise auf verschiedenste Anwendungsziele zu verstehen, sind aus medizinischer Sicht vor allem weitere klinische Studien wünschenswert.

6. Schlussfolgerung

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der vorliegenden *ex vivo* Untersuchung das vielversprechende Potential, kalte atmosphärische Plasmaquellen zur Reduktion von oralem Multispezies - Biofilm und Desinfektion von Titanoberflächen in der regenerativen Periimplantitistherapie einzusetzen.

Unter in Bezugnahme der Ergebnisse anderer Studiengruppen nehmen die Autoren an, dass adjunktive Applikation von kaltem atmosphärischen Plasma in Kombination mit mechanischem Debridement und antimikrobiellen Agenzien zu einer gesteigerten antimikrobiellen Effektivität, beziehungsweise zu einer effektiveren Elimination von Biofilm führt als Mono - Therapien [116, 118, 120, 153].

Da derzeit keine Methode existiert, die Biofilm auf Implantatoberflächen vollständig desinfiziert und eliminiert, ohne die Materialeigenschaften der Oberfläche zu zerstören, könnte Plasmabehandlung eine non - invasive, oberflächenschonende und zeiteffiziente Therapieoption darstellen. Weitere Studien sind notwendig um zu untersuchen, wie adjunktive Plasma - Biofilmbehandlung optimiert werden kann.

7. Literatur

1. 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.
2. Metelmann HR, v.W.T., Weltmann KD., *Plasmamedizin - Kaltplasma in der medizinischen Anwendung*. 2016.
3. Arjunan, K.P., V.K. Sharma, and S. Ptasinska, Effects of atmospheric pressure plasmas on isolated and cellular DNA—a review. *Int J Mol Sci*, 2015. **16**(2): p. 2971-3016.
4. *Plasma Medicine: Applications of Low-Temperature Gas Plasmas in Medicine and Biology*. 2012, Cambridge: Cambridge University Press.
5. Von Woedtke T, R.S., Masur K, Weltmann KD., *Plasmas for medicine*. *Phys. Rep.*, 2013. **530**: p. 291-320.
6. Von Woedtke T, M.H., Weltmann KD., Clinical plasma medicine: state and perspectives of in vivo application of cold atmospheric plasma. *Contrib Plasma Phys.*, 2014. **54**: p. 104-117.
7. Lee, J.H., W.S. Jeong, S.J. Seo, H.W. Kim, K.N. Kim, E.H. Choi, and K.M. Kim, Non-thermal atmospheric pressure plasma functionalized dental implant for enhancement of bacterial resistance and osseointegration. *Dent Mater*, 2017. **33**(3): p. 257-270.
8. Smeets, R., A. Henningsen, O. Jung, M. Heiland, C. Hammacher, and J.M. Stein, *Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis—a review*. *Head Face Med*, 2014. **10**: p. 34.
9. Schwarz, F., J. Becker, J. Bach, K. Bartsch, J. Beck, M. Blume, G. Iglhaut, M. Kebschull, L. Ritter, M. Schlee, M. Stiesch, M. Stiller, and T. Wolf, *S3-Leitlinie Die Behandlung periimplantärer Infektionen an Zahnimplantaten*. AWMF Online, 2016.
10. Deutsche Gesellschaft für Zahn-, M.-, und Kieferheilkunde, Deutsche Gesellschaft für Implantologie, *Gemeinsame Stellungnahme der DGZMK und DGI V 3.0 7/2005 DZZ 8 (60/2005)* *Deutsche Zahnärztliche Zeitung* 60, 915 - 9416 (2005), 2005. **60**: p. 915-9416.
11. Lindhe, J., J. Meyle, and D.o.E.W.o.P. Group, Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*, 2008. **35**(8 Suppl): p. 282-5.
12. Lang, N.P., T. Berglundh, and P. Working Group 4 of Seventh European Workshop on, Periimplant diseases: where are we now?—Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*, 2011. **38 Suppl 11**: p. 178-81.
13. Bowkett, A., D. Laverty, A. Patel, and L. Addy, *Removal techniques for failed implants*. *Br Dent J*, 2016. **220**(3): p. 109-14.
14. 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.
15. F., A.T.I., Consensus report: implant therapy, in: N.P. Lang, T. Karring (Eds.), *Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology*. Quintessence, Berlin, 1994: p. 365-369.
16. Zitzmann NU, W.C., Berglundh T, Ätiologie, Diagnostik und Therapie der Periimplantitis – eine Übersicht. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, 2006. **61**: p. 642–649.
17. Lee, C.T., Y.W. Huang, L. Zhu, and R. Weltman, Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent*, 2017. **62**: p. 1-12.
18. Klinge, B., J. Meyle, and G. Working, Peri-implant tissue destruction. The Third EAO Consensus Conference 2012. *Clin Oral Implants Res*, 2012. **23 Suppl 6**: p. 108-10.
19. Pesce, P., L. Canullo, M.G. Grusovin, H. de Bruyn, J. Cosyn, and P. Pera, *Systematic review of some prosthetic risk factors for periimplantitis*. *J Prosthet Dent*, 2015. **114**(3): p. 346-50.
20. Marsh, P.D., Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health*, 2006. **6 Suppl 1**: p. S14.
21. Hannig, C. and M. Hannig, The oral cavity—a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig*, 2009. **13**(2): p. 123-39.
22. Subramani, K., R.E. Jung, A. Molenberg, and C.H. Hammerle, *Biofilm on dental implants: a review of the literature*. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2009. **24**(4): p. 616-26.
23. Hilker, L., T. von Woedtke, K.D. Weltmann, and H.G. Wollert, Cold atmospheric plasma: a new tool for the treatment of superficial driveline infections. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2017. **51**(1): p. 186-187.
24. Horikawa, T., T. Odatsu, T. Itoh, Y. Soejima, H. Morinaga, N. Abe, N. Tsuchiya, T. Iijima, and T. Sawase, *Retrospective cohort study of rough-surface titanium implants with at least 25 years' function*. *Int J Implant Dent*, 2017. **3**(1): p. 42.

25. Schwarz, F., A. Sculean, G. Romanos, M. Herten, N. Horn, W. Scherbaum, and J. Becker, Influence of different treatment approaches on the removal of early plaque biofilms and the viability of SAOS2 osteoblasts grown on titanium implants. *Clin Oral Investig*, 2005. **9**(2): p. 111-7.
26. Suarez-Lopez Del Amo, F., S.H. Yu, and H.L. Wang, Non-Surgical Therapy for Peri-Implant Diseases: a Systematic Review. *J Oral Maxillofac Res*, 2016. **7**(3): p. e13.
27. Schwarz, F., D. Ferrari, K. Popovski, B. Hartig, and J. Becker, Influence of different air-abrasive powders on cell viability at biologically contaminated titanium dental implants surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009. **88**(1): p. 83-91.
28. Wennerberg, A. and T. Albrektsson, Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*, 2009. **20 Suppl 4**: p. 172-84.
29. Tastepe, C.S., R. van Waas, Y. Liu, and D. Wismeijer, Air powder abrasive treatment as an implant surface cleaning method: a literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2012. **27**(6): p. 1461-73.
30. Schwarz, F., K. Bieling, M. Bonsmann, T. Latz, and J. Becker, Nonsurgical treatment of moderate and advanced periimplantitis lesions: a controlled clinical study. *Clin Oral Investig*, 2006. **10**(4): p. 279-88.
31. Persson, G.R., A.M. Roos-Jansaker, C. Lindahl, and S. Renvert, Microbiologic results after non-surgical erbium-doped:yttrium, aluminum, and garnet laser or air-abrasive treatment of peri-implantitis: a randomized clinical trial. *J Periodontol*, 2011. **82**(9): p. 1267-78.
32. Muthukuru, M., A. Zainvi, E.O. Esplugues, and T.F. Flemmig, Non-surgical therapy for the management of peri-implantitis: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*, 2012. **23 Suppl 6**: p. 77-83.
33. Schwarz, F., A. Schmucker, and J. Becker, Efficacy of alternative or adjunctive measures to conventional treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Implant Dent*, 2015. **1**(1): p. 22.
34. Conrads, H. and M. Schmidt, *Plasma generation and plasma sources*. Plasma Sources Science and Technology, 2000. **9**(4): p. 441.
35. Weltmann, K.-D., E. Kindel, R. Brandenburg, C. Meyer, R. Bussiahn, C. Wilke, and T. von Woedtke, *Atmospheric Pressure Plasma Jet for Medical Therapy: Plasma Parameters and Risk Estimation*. Contributions to Plasma Physics, 2009. **49**(9): p. 631-640.
36. Mann, M., R. Tiede, K. Gavenis, G. Daeschlein, R. Bussiahn, K.-D. Weltmann, S. Emmert, T. von Woedtke, and R. Ahmed, *Introduction to DIN-Specification 91315 based on the characterization of the plasma jet kINPen® MED*. Vol. 4. 2016.
37. 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.
38. Schönbeck, R.B., A.; Theel, C., neoplas tools, Greifswald, Deutschland, <https://www.neoplas-tools.eu/de/impressum.html> , Access Date 05.10.2018. 2018.
39. Lehmann, A., A. Rueppell, A. Schindler, I.-M. Zylla, H.J. Seifert, F. Nothdurft, M. Hannig, and S. Rupf, *Modification of Enamel and Dentin Surfaces by Non-Thermal Atmospheric Plasma*. Plasma Processes and Polymers, 2013. **10**(3): p. 262-270.
40. A. Lehmann, F.P., Th. Arnold, Human health risk evaluation of a microwave-driven atmospheric plasma jet as medical device. *Clin Plasma Med*, 2017. **7-8**: p. 16-23.
41. Lackmann, J.W. and J.E. Bandow, Inactivation of microbes and macromolecules by atmospheric-pressure plasma jets. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014. **98**(14): p. 6205-13.
42. Southwood, L.L. and G.M. Baxter, Instrument sterilization, skin preparation, and wound management. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 1996. **12**(2): p. 173-94.
43. Delgado, L.M., A. Pandit, and D.I. Zeugolis, Influence of sterilisation methods on collagen-based devices stability and properties. *Expert Rev Med Devices*, 2014. **11**(3): p. 305-14.
44. Castro, M.G., C.A. Araujo, G.L. Menegaz, J.P. Silva, M.A. Nobilo, and P.C. Simamoto Junior, Laser and plasma dental soldering techniques applied to Ti-6Al-4V alloy: ultimate tensile strength and finite element analysis. *J Prosthet Dent*, 2015. **113**(5): p. 460-6.
45. Xuereb, M., J. Camilleri, and N.J. Attard, Systematic review of current dental implant coating materials and novel coating techniques. *Int J Prosthodont*, 2015. **28**(1): p. 51-9.
46. Wu, A.S., S. Kalghatgi, D. Dobrynin, R. Sensenig, E. Cerchar, E. Podolsky, E. Dulaimi, M. Paff, K. Wasko, K.P. Arjunan, K. Garcia, G. Fridman, M. Balasubramanian, R. Ownbey, K.A. Barbee, A. Fridman, G. Friedman, S.G. Joshi, and A.D. Brooks, *Porcine intact and wounded skin responses to atmospheric nonthermal plasma*. *J Surg Res*, 2013. **179**(1): p. e1-e12.

47. Butler-Manuel, S., J. Lippiatt, and T.K. Madhuri, Interval debulking surgery following neoadjuvant chemotherapy for stage IVB ovarian cancer using neutral argon plasma (PlasmaJet). *Gynecol Oncol*, 2014. **135**(3): p. 622-3.
48. Daeschlein, G., T. von Woedtker, E. Kindel, R. Brandenburg, K.-D. Weltmann, and M. Jünger, Antibacterial Activity of an Atmospheric Pressure Plasma Jet Against Relevant Wound Pathogens in vitro on a Simulated Wound Environment. *Plasma Processes and Polymers*, 2010. **7**(3-4): p. 224-230.
49. 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.
50. Rupf, S., A. Lehmann, M. Hannig, B. Schafer, A. Schubert, U. Feldmann, and A. Schindler, *Killing of adherent oral microbes by a non-thermal atmospheric plasma jet*. *J Med Microbiol*, 2010. **59**(Pt 2): p. 206-12.
51. Babington, P., K. Rajjoub, J. Canady, A. Siu, M. Keidar, and J.H. Sherman, *Use of cold atmospheric plasma in the treatment of cancer*. *Biointerphases*, 2015. **10**(2): p. 029403.
52. Sharkey, M.A., A. Chebbi, K.A. McDonnell, C. Staunton, and D.P. Dowling, Evaluation of the sensitivity of bacterial and yeast cells to cold atmospheric plasma jet treatments. *Biointerphases*, 2015. **10**(2): p. 029507.
53. Scholtz, V., J. Pazlarova, H. Souskova, J. Khun, and J. Julak, *Nonthermal plasma--A tool for decontamination and disinfection*. *Biotechnol Adv*, 2015. **33**(6 Pt 2): p. 1108-19.
54. Ptasinska, S., B. Bahnev, A. Stypczynska, M. Bowden, N.J. Mason, and N.S. Braithwaite, *DNA strand scission induced by a non-thermal atmospheric pressure plasma jet*. *Phys Chem Chem Phys*, 2010. **12**(28): p. 7779-81.
55. O'Connell, D., L.J. Cox, W.B. Hyland, S.J. McMahon, S. Reuter, W.G. Graham, T. Gans, and F.J. Currell, *Cold atmospheric pressure plasma jet interactions with plasmid DNA*. *Applied Physics Letters*, 2011. **98**(4): p. 043701.
56. Delben, J.A., C.E. Zago, N. Tyhovych, S. Duarte, and C.E. Vergani, Effect of Atmospheric-Pressure Cold Plasma on Pathogenic Oral Biofilms and In Vitro Reconstituted Oral Epithelium. *PLoS One*, 2016. **11**(5): p. e0155427.
57. Lademann, J., H. Richter, A. Alborova, D. Humme, A. Patzelt, A. Kramer, K.D. Weltmann, B. Hartmann, C. Ottomann, J.W. Fluhr, P. Hinz, G. Hubner, and O. Lademann, *Risk assessment of the application of a plasma jet in dermatology*. *J Biomed Opt*, 2009. **14**(5): p. 054025.
58. Fluhr, J.W., S. Sassning, O. Lademann, M.E. Darvin, S. Schanzer, A. Kramer, H. Richter, W. Sterry, and J. Lademann, In vivo skin treatment with tissue-tolerable plasma influences skin physiology and antioxidant profile in human stratum corneum. *Exp Dermatol*, 2012. **21**(2): p. 130-4.
59. 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.
60. Heinlin, J., G. Isbary, W. Stolz, F. Zeman, M. Landthaler, G. Morfill, T. Shimizu, J.L. Zimmermann, and S. Karrer, A randomized two-sided placebo-controlled study on the efficacy and safety of atmospheric non-thermal argon plasma for pruritus. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2013. **27**(3): p. 324-31.
61. 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.
62. Brehmer, F., H.A. Haenssle, G. Daeschlein, R. Ahmed, S. Pfeiffer, A. Gorlitz, D. Simon, M.P. Schon, D. Wandke, and S. Emmert, Alleviation of chronic venous leg ulcers with a hand-held dielectric barrier discharge plasma generator (PlasmaDerm((R)) VU-2010): results of a monocentric, two-armed, open, prospective, randomized and controlled trial (NCT01415622). *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2015. **29**(1): p. 148-55.
63. Maisch, T., A.K. Bosserhoff, P. Unger, J. Heider, T. Shimizu, J.L. Zimmermann, G.E. Morfill, M. Landthaler, and S. Karrer, *Investigation of toxicity and mutagenicity of cold atmospheric argon plasma*. *Environ Mol Mutagen*, 2017. **58**(3): p. 172-177.

64. Preissner, S., I. Kastner, E. Schutte, S. Hartwig, A.M. Schmidt-Westhausen, S. Paris, R. Preissner, and M. 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. **59**(7): p. 467-75.
65. Hong, Y.F., J.G. Kang, H.Y. Lee, H.S. Uhm, E. Moon, and Y.H. Park, Sterilization effect of atmospheric plasma on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* endospores. *Lett Appl Microbiol*, 2009. **48**(1): p. 33-7.
66. Alkawareek, M.Y., Q.T. Algwari, S.P. Gorman, W.G. Graham, D. O'Connell, and B.F. Gilmore, Application of atmospheric pressure nonthermal plasma for the in vitro eradication of bacterial biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2012. **65**(2): p. 381-4.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. Maisch, T., T. Shimizu, Y.F. Li, J. Heinlin, S. Karrer, G. Morfill, and J.L. Zimmermann, Decolonisation of MRSA, *S. aureus* and *E. coli* by cold-atmospheric plasma using a porcine skin model in vitro. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e34610.
71. Han, L., S. Patil, K.M. Keener, P.J. Cullen, and P. Bourke, Bacterial inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma: influence of process parameters and effects on cell leakage and DNA. *J Appl Microbiol*, 2014. **116**(4): p. 784-94.
72. 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.
73. Aboubakr, H.A., P. Williams, U. Gangal, M.M. Youssef, S.A. El-Sohaimy, P.J. Bruggeman, and S.M. Goyal, *Virucidal effect of cold atmospheric gaseous plasma on feline calicivirus, a surrogate for human norovirus*. *Appl Environ Microbiol*, 2015. **81**(11): p. 3612-22.
74. Han, L., S. Patil, D. Boehm, V. Milosavljevic, P.J. Cullen, and P. Bourke, Mechanisms of Inactivation by High-Voltage Atmospheric Cold Plasma Differ for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*, 2015. **82**(2): p. 450-8.
75. Wu, Y., Y. Liang, K. Wei, W. Li, M. Yao, J. Zhang, and S.A. Grinshpun, MS2 virus inactivation by atmospheric-pressure cold plasma using different gas carriers and power levels. *Appl Environ Microbiol*, 2015. **81**(3): p. 996-1002.
76. Yoo, E.M., S.H. Uhm, J.S. Kwon, H.S. Choi, E.H. Choi, K.M. Kim, and K.N. Kim, The Study on Inhibition of Planktonic Bacterial Growth by Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Jet Treated Surfaces for Dental Application. *J Biomed Nanotechnol*, 2015. **11**(2): p. 334-41.
77. Luhrmann, A., R. Matthes, and A. Kramer, Impact of cold atmospheric pressure argon plasma on antibiotic sensitivity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in vitro. *GMS Hyg Infect Control*, 2016. **11**: p. Doc17.
78. Napp, M., G. Daeschlein, S. von Podewils, P. Hinz, S. Emmert, H. Haase, R. Spitzmueller, D. Gumbel, R. Kasch, and M. Junger, In vitro susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains of *Staphylococcus aureus* to two different cold atmospheric plasma sources. *Infection*, 2016. **44**(4): p. 531-7.
79. Connor, M., P.B. Flynn, D.J. Fairley, N. Marks, P. Manesiotis, W.G. Graham, B.F. Gilmore, and J.W. McGrath, *Evolutionary clade affects resistance of Clostridium difficile spores to Cold Atmospheric Plasma*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 41814.
80. Wiegand, C., S. Fink, U.C. Hipler, O. Beier, K. Horn, A. Pfuch, A. Schimanski, and B. Grunler, Cold atmospheric pressure plasmas exhibit antimicrobial properties against critical bacteria and yeast species. *J Wound Care*, 2017. **26**(8): p. 462-468.
81. Matthes, R., O. Assadian, and A. Kramer, Repeated applications of cold atmospheric pressure plasma does not induce resistance in *Staphylococcus aureus* embedded in biofilms. *GMS Hyg Infect Control*, 2014. **9**(3): p. Doc17.
82. Mai-Prochnow, A., M. Clauson, J. Hong, and A.B. Murphy, Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 38610.

83. Napp, M., S. von Podewils, I. Klare, H. Haase, R. Kasch, D. Gumbel, A. Ekkernkamp, M. Junger, and G. Daeschlein, Does antibiotic resistance impair plasma susceptibility of multi-drug resistant clinical isolates of enterococci in vitro? *Gut Pathog*, 2016. **8**(1): p. 41.
84. Deng, S., R. Ruan, C.K. Mok, G. Huang, X. Lin, and P. Chen, Inactivation of *Escherichia coli* on almonds using nonthermal plasma. *J Food Sci*, 2007. **72**(2): p. M62-6.
85. Liu, X., F. Hong, Y. Guo, J. Zhang, and J. Shi, Sterilization of *Staphylococcus Aureus* by an Atmospheric Non-Thermal Plasma Jet. *Plasma Science and Technology*, 2013. **15**(5): p. 439.
86. Winter, T., J. Bernhardt, J. Winter, U. Mader, R. Schluter, K.D. Weltmann, M. Hecker, and H. Kusch, *Common versus noble Bacillus subtilis differentially responds to air and argon gas plasma*. *Proteomics*, 2013. **13**(17): p. 2608-21.
87. Kayes, M.M., F.J. Critzer, K. Kelly-Wintenberg, J.R. Roth, T.C. Montie, and D.A. Golden, *Inactivation of foodborne pathogens using a one atmosphere uniform glow discharge plasma*. *Foodborne Pathog Dis*, 2007. **4**(1): p. 50-9.
88. Muranyi, P., J. Wunderlich, and M. Heise, Influence of relative gas humidity on the inactivation efficiency of a low temperature gas plasma. *J Appl Microbiol*, 2008. **104**(6): p. 1659-66.
89. Fernandez, A., E. Noriega, and A. Thompson, Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on fresh produce by cold atmospheric gas plasma technology. *Food Microbiol*, 2013. **33**(1): p. 24-9.
90. Liao, X., D. Liu, Q. Xiang, J. Ahn, S. Chen, X. Ye, and T. Ding, *Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review*. *Food Control*, 2017. **75**(Supplement C): p. 83-91.
91. Yu, H., S. Perni, J.J. Shi, D.Z. Wang, M.G. Kong, and G. Shama, Effects of cell surface loading and phase of growth in cold atmospheric gas plasma inactivation of *Escherichia coli* K12. *J Appl Microbiol*, 2006. **101**(6): p. 1323-30.
92. Venezia, R.A., M. Orrico, E. Houston, S.M. Yin, and Y.Y. Naumova, Lethal activity of nonthermal plasma sterilization against microorganisms. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008. **29**(5): p. 430-6.
93. Azharonok, V.V., L.E. Krat'ko, Y.I. Nekrashevich, I.I. Filatova, L.A. Mel'nikova, N.V. Dudchik, S.A. Yanetskaya, and M.K. Bologna, *Bactericidal action of the plasma of high-frequency capacitive and barrier discharges on microorganisms*. *Journal of Engineering Physics and Thermophysics*, 2009. **82**(3): p. 419-426.
94. Ermolaeva, S.A., A.F. Varfolomeev, M.Y. Chernukha, D.S. Yurov, M.M. Vasiliev, A.A. Kaminskaya, M.M. Moisenovich, J.M. Romanova, A.N. Murashev, Selezneva, II, T. Shimizu, E.V. Sysolyatina, I.A. Shaginyan, O.F. Petrov, E.I. Mayevsky, V.E. Fortov, G.E. Morfill, B.S. Naroditsky, and A.L. Gintsburg, *Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds*. *J Med Microbiol*, 2011. **60**(Pt 1): p. 75-83.
95. Lunov, O., V. Zablotskii, O. Churpita, A. Jager, L. Polivka, E. Sykova, A. Dejneka, and S. Kubinova, *The interplay between biological and physical scenarios of bacterial death induced by non-thermal plasma*. *Biomaterials*, 2016. **82**: p. 71-83.
96. Laroussi, M., *Nonthermal Decontamination of Biological Media by Atmospheric-pressure Plasmas: Review, Analysis, and Prospects*. Vol. 30. 2002. 1409-1415.
97. Winter, T., J. Winter, M. Polak, K. Kusch, U. Mader, R. Sietmann, J. Ehlbeck, S. van Hijum, K.D. Weltmann, M. Hecker, and H. Kusch, *Characterization of the global impact of low temperature gas plasma on vegetative microorganisms*. *Proteomics*, 2011. **11**(17): p. 3518-30.
98. Brun, P., P. Brun, M. Vono, P. Venier, E. Tarricone, V. Deligianni, E. Martines, M. Zuin, S. Spagnolo, R. Cavazzana, R. Cardin, I. Castagliuolo, A.L. Valerio, and A. Leonardi, *Disinfection of ocular cells and tissues by atmospheric-pressure cold plasma*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e33245.
99. Lackmann, J.W., S. Schneider, E. Edengeiser, F. Jarzina, S. Brinckmann, E. Steinborn, M. Havenith, J. Benedikt, and J.E. Bandow, Photons and particles emitted from cold atmospheric-pressure plasma inactivate bacteria and biomolecules independently and synergistically. *J R Soc Interface*, 2013. **10**(89): p. 20130591.
100. Lunov, O., O. Churpita, V. Zablotskii, I.G. Deyneka, I.K. Meshkovskii, A. Jäger, E. Syková, Š. Kubinová, and A. Dejneka, *Non-thermal plasma mills bacteria: Scanning electron microscopy observations*. *Applied Physics Letters*, 2015. **106**(5): p. 053703.
101. Edengeiser, E., J.W. Lackmann, E. Brundermann, S. Schneider, J. Benedikt, J.E. Bandow, and M. Havenith, Synergistic effects of atmospheric pressure plasma-emitted components on DNA oligomers: a Raman spectroscopic study. *J Biophotonics*, 2015. **8**(11-12): p. 918-24.

102. Sharma, A., G. Collins, and A. Pruden, Differential gene expression in *Escherichia coli* following exposure to nonthermal atmospheric pressure plasma. *J Appl Microbiol*, 2009. **107**(5): p. 1440-9.
103. Perni, S., G. Shama, J.L. Hobman, P.A. Lund, C.J. Kershaw, G.A. Hidalgo-Arroyo, C.W. Penn, X.T. Deng, J.L. Walsh, and M.G. Kong, *Probing bactericidal mechanisms induced by cold atmospheric plasmas with Escherichia coli mutants*. *Applied Physics Letters*, 2007. **90**(7): p. 073902.
104. Li, L., H. Zhang, and Q. Huang, New insight into the residual inactivation of *Microcystis aeruginosa* by dielectric barrier discharge. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 13683.
105. Hwang, I.S., J. Lee, and D.G. Lee, Indole-3-carbinol generates reactive oxygen species and induces apoptosis. *Biol Pharm Bull*, 2011. **34**(10): p. 1602-8.
106. Yost, A.D. and S.G. Joshi, Atmospheric Nonthermal Plasma-Treated PBS Inactivates *Escherichia coli* by Oxidative DNA Damage. *PLoS One*, 2015. **10**(10): p. e0139903.
107. Ziuzina, D., D. Boehm, S. Patil, P.J. Cullen, and P. Bourke, Cold Plasma Inactivation of Bacterial Biofilms and Reduction of Quorum Sensing Regulated Virulence Factors. *PLoS One*, 2015. **10**(9): p. e0138209.
108. Flynn, P.B., A. Buseti, E. Wielogorska, O.P. Chevallier, C.T. Elliott, G. Laverty, S.P. Gorman, W.G. Graham, and B.F. Gilmore, *Non-thermal Plasma Exposure Rapidly Attenuates Bacterial AHL-Dependent Quorum Sensing and Virulence*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 26320.
109. Joshi, S.G., M. Paff, G. Friedman, G. Fridman, A. Fridman, and A.D. Brooks, Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic form and biofilms: a biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma. *Am J Infect Control*, 2010. **38**(4): p. 293-301.
110. Alkawareek, M.Y., Q.T. Algwari, G. Laverty, S.P. Gorman, W.G. Graham, D. O'Connell, and B.F. Gilmore, *Eradication of Pseudomonas aeruginosa biofilms by atmospheric pressure non-thermal plasma*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e44289.
111. Matthes, R., C. Bender, R. Schluter, I. Koban, R. Bussiahn, S. Reuter, J. Lademann, K.D. Weltmann, and A. Kramer, *Antimicrobial efficacy of two surface barrier discharges with air plasma against in vitro biofilms*. *PLoS One*, 2013. **8**(7): p. e70462.
112. Li, Y., K. Sun, G. Ye, Y. Liang, H. Pan, G. Wang, Y. Zhao, J. Pan, J. Zhang, and J. Fang, Evaluation of Cold Plasma Treatment and Safety in Disinfecting 3-week Root Canal *Enterococcus faecalis* Biofilm In Vitro. *J Endod*, 2015. **41**(8): p. 1325-30.
113. Annunziata, M., L. Canullo, G. Donnarumma, P. Caputo, L. Nastri, and L. Guida, Bacterial inactivation/sterilization by argon plasma treatment on contaminated titanium implant surfaces: In vitro study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2016. **21**(1): p. e118-21.
114. Modic, M., N.P. McLeod, J.M. Sutton, and J.L. Walsh, Cold atmospheric pressure plasma elimination of clinically important single- and mixed-species biofilms. *Int J Antimicrob Agents*, 2017. **49**(3): p. 375-378.
115. Matthes, R., N.O. Hubner, C. Bender, I. Koban, S. Horn, S. Bekeschus, K.D. Weltmann, T. Kocher, A. Kramer, and O. Assadian, Efficacy of different carrier gases for barrier discharge plasma generation compared to chlorhexidine on the survival of *Pseudomonas aeruginosa* embedded in biofilm in vitro. *Skin Pharmacol Physiol*, 2014. **27**(3): p. 148-57.
116. Rupf, S., A.N. Idlibi, F.A. Marrawi, M. Hannig, A. Schubert, L. von Mueller, W. Spitzer, H. Holtmann, A. Lehmann, A. Rueppell, and A. Schindler, *Removing biofilms from microstructured titanium ex vivo: a novel approach using atmospheric plasma technology*. *PLoS One*, 2011. **6**(10): p. e25893.
117. Jablonowski, L., K. Fricke, R. Matthes, B. Holtfreter, R. Schluter, T. von Woedtke, K.D. Weltmann, and T. Kocher, *Removal of naturally grown human biofilm with an atmospheric pressure plasma jet: An in-vitro study*. *J Biophotonics*, 2017. **10**(5): p. 718-726.
118. Duske, K., L. Jablonowski, I. Koban, R. Matthes, B. Holtfreter, A. Sckell, J.B. Nebe, T. von Woedtke, K.D. Weltmann, and T. Kocher, *Cold atmospheric plasma in combination with mechanical treatment improves osteoblast growth on biofilm covered titanium discs*. *Biomaterials*, 2015. **52**: p. 327-34.
119. Yu, Y., M. Tan, H. Chen, Z. Wu, L. Xu, J. Li, J. Cao, Y. Yang, X. Xiao, X. Lian, X. Lu, and Y. Tu, *Non-thermal plasma suppresses bacterial colonization on skin wound and promotes wound healing in mice*. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2011. **31**(3): p. 390-4.
120. Preissner, S., H.C. Wirtz, A.K. Tietz, S. Abu-Sirhan, S.R. Herbst, S. Hartwig, P. Pierdzioch, A.M. Schmidt-Westhausen, H. Dommisch, and M. Hertel, *Bactericidal efficacy of tissue tolerable*

- plasma on microrough titanium dental implants: An in-vitro-study.* J Biophotonics, 2016. **9**(6): p. 637-44.
121. Seon, G.M., H.J. Seo, S.Y. Kwon, M.H. Lee, B.J. Kwon, M.S. Kim, M.A. Koo, B.J. Park, and J.C. Park, Titanium surface modification by using microwave-induced argon plasma in various conditions to enhance osteoblast biocompatibility. Biomater Res, 2015. **19**: p. 13.
 122. Lee, H.J., T.Y. Kwon, K.H. Kim, S.S. Kang, S.H. Choi, S.T. Kwon, D.H. Cho, and J.S. Son, In Vitro Evaluation of Hydroxyapatite-Coated Titanium Implant with Atmospheric Plasma Treatment. J Nanosci Nanotechnol, 2015. **15**(8): p. 5593-6.
 123. Duske, K., I. Koban, E. Kindel, K. Schroder, B. Nebe, B. Holtfreter, L. Jablonowski, K.D. Weltmann, and T. Kocher, *Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals.* J Clin Periodontol, 2012. **39**(4): p. 400-7.
 124. Kawase, T., T. Tanaka, H. Minbu, M. Kamiya, M. Oda, and T. Hara, An atmospheric-pressure plasma-treated titanium surface potentially supports initial cell adhesion, growth, and differentiation of cultured human prenatal-derived osteoblastic cells. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2014. **102**(6): p. 1289-96.
 125. Lee, J.H., Y.H. Kim, E.H. Choi, K.M. Kim, and K.N. Kim, Air atmospheric-pressure plasma-jet treatment enhances the attachment of human gingival fibroblasts for early peri-implant soft tissue seals on titanium dental implant abutments. Acta Odontol Scand, 2015. **73**(1): p. 67-75.
 126. Canullo, L., T. Genova, M. Tallarico, G. Gautier, F. Mussano, and D. Botticelli, Plasma of Argon Affects the Earliest Biological Response of Different Implant Surfaces: An In Vitro Comparative Study. J Dent Res, 2016. **95**(5): p. 566-73.
 127. Canullo, L., T. Genova, P. Mandracci, F. Mussano, R. Abundo, and J.P. Fiorellini, Morphometric Changes Induced by Cold Argon Plasma Treatment on Osteoblasts Grown on Different Dental Implant Surfaces. Int J Periodontics Restorative Dent, 2017. **37**(4): p. 541-548.
 128. Yang, Y., J. Guo, X. Zhou, Z. Liu, C. Wang, K. Wang, J. Zhang, and Z. Wang, A novel cold atmospheric pressure air plasma jet for peri-implantitis treatment: An *in vitro* study. Dental Materials Journal, 2018. **37**(1): p. 157-166.
 129. Seo, H.Y., J.S. Kwon, Y.R. Choi, K.M. Kim, E.H. Choi, and K.N. Kim, Cellular attachment and differentiation on titania nanotubes exposed to air- or nitrogen-based non-thermal atmospheric pressure plasma. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e113477.
 130. Tominami, K., H. Kanetaka, S. Sasaki, T. Mokudai, T. Kaneko, and Y. Niwano, *Cold atmospheric plasma enhances osteoblast differentiation.* PloS one, 2017. **12**(7): p. e0180507-e0180507.
 131. Danna, N.R., B.G. Beutel, N. Tovar, L. Witek, C. Marin, E.A. Bonfante, R. Granato, M. Suzuki, and P.G. Coelho, *Assessment of Atmospheric Pressure Plasma Treatment for Implant Osseointegration.* Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 761718.
 132. Koban, I., M.H. Geisel, B. Holtfreter, L. Jablonowski, N.O. Hubner, R. Matthes, K. Masur, K.D. Weltmann, A. Kramer, and T. Kocher, *Synergistic Effects of Nonthermal Plasma and Disinfecting Agents against Dental Biofilms In Vitro.* ISRN Dent, 2013. **2013**: p. 573262.
 133. Canullo, L., M. Tallarico, M. Penarrocha, G. Corrente, J. Fiorellini, and D. Penarrocha, Plasma of Argon Cleaning Treatment on Implant Abutments in Periodontally Healthy Patients: Six Years Postloading Results of a Randomized Controlled Trial. Int J Periodontics Restorative Dent, 2017. **37**(5): p. 683-690.
 134. Garcia, B., F. Camacho, D. Penarrocha, M. Tallarico, S. Perez, and L. Canullo, Influence of plasma cleaning procedure on the interaction between soft tissue and abutments: a randomized controlled histologic study. Clin Oral Implants Res, 2017. **28**(10): p. 1269-1277.
 135. Kang, S.U., J.W. Choi, J.W. Chang, K.I. Kim, Y.S. Kim, J.K. Park, Y.E. Kim, Y.S. Lee, S.S. Yang, and C.H. Kim, N₂ non-thermal atmospheric pressure plasma promotes wound healing in vitro and in vivo: Potential modulation of adhesion molecules and matrix metalloproteinase-9. Exp Dermatol, 2017. **26**(2): p. 163-170.
 136. Schmidt, A., S. Bekeschus, K. Wende, B. Vollmar, and T. von Woedtke, A cold plasma jet accelerates wound healing in a murine model of full-thickness skin wounds. Exp Dermatol, 2017. **26**(2): p. 156-162.
 137. 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.

138. Garcia-Alcantara, E., R. Lopez-Callejas, P.R. Morales-Ramirez, R. Pena-Eguiluz, R. Fajardo-Munoz, A. Mercado-Cabrera, S.R. Barocio, R. Valencia-Alvarado, B.G. Rodriguez-Mendez, A.E. Munoz-Castro, A. de la Piedad-Beneitez, and I.A. Rojas-Olmedo, *Accelerated mice skin acute wound healing in vivo by combined treatment of argon and helium plasma needle*. Arch Med Res, 2013. **44**(3): p. 169-77.
139. Xu, G.M., X.M. Shi, J.F. Cai, S.L. Chen, P. Li, C.W. Yao, Z.S. Chang, and G.J. Zhang, *Dual effects of atmospheric pressure plasma jet on skin wound healing of mice*. Wound Repair Regen, 2015. **23**(6): p. 878-84.
140. Helmke, A., D. Hoffmeister, N. Mertens, S. Emmert, J. Schuette, and W. Viol, The acidification of lipid film surfaces by non-thermal DBD at atmospheric pressure in air. New Journal of Physics, 2009. **11**(11): p. 115025.
141. Hung, Y.W., L.T. Lee, Y.C. Peng, C.T. Chang, Y.K. Wong, and K.C. Tung, Effect of a nonthermal-atmospheric pressure plasma jet on wound healing: An animal study. J Chin Med Assoc, 2016. **79**(6): p. 320-8.
142. Arndt, S., P. Unger, M. Berneburg, A.K. Bosserhoff, and S. Karrer, Cold atmospheric plasma (CAP) activates angiogenesis-related molecules in skin keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells and improves wound angiogenesis in an autocrine and paracrine mode. J Dermatol Sci, 2018. **89**(2): p. 181-190.
143. Kleineidam, B., M. Nokhbehsaim, J. Deschner, and G. Wahl, Effect of cold plasma on periodontal wound healing—an in vitro study. Clin Oral Investig, 2018.
144. Marschewski, M., J. Hirschberg, T. Omairi, O. Hoff, W. Viol, S. Emmert, and W. Maus-Friedrichs, Electron spectroscopic analysis of the human lipid skin barrier: cold atmospheric plasma-induced changes in lipid composition. Exp Dermatol, 2012. **21**(12): p. 921-5.
145. Hartwig, S., C. Doll, J.O. Voss, M. Hertel, S. Preissner, and J.D. Raguse, Treatment of Wound Healing Disorders of Radial Forearm Free Flap Donor Sites Using Cold Atmospheric Plasma: A Proof of Concept. J Oral Maxillofac Surg, 2017. **75**(2): p. 429-435.
146. Chuangsuwanich, A., T. Assadamongkol, and D. Boonyawan, The Healing Effect of Low-Temperature Atmospheric-Pressure Plasma in Pressure Ulcer: A Randomized Controlled Trial. Int J Low Extrem Wounds, 2016. **15**(4): p. 313-319.
147. Kisch, T., A. Helmke, S. Schleusser, J. Song, E. Liodaki, F.H. Stang, P. Mailaender, and R. Kraemer, Improvement of cutaneous microcirculation by cold atmospheric plasma (CAP): Results of a controlled, prospective cohort study. Microvasc Res, 2016. **104**: p. 55-62.
148. Borchardt, T., J. Ernst, A. Helmke, M. Tanyeli, A.F. Schilling, G. Felmerer, and W. Viol, Effect of direct cold atmospheric plasma (diCAP) on microcirculation of intact skin in a controlled mechanical environment. Microcirculation, 2017.
149. Kisch, T., S. Schleusser, A. Helmke, K.L. Mauss, E.T. Wenzel, B. Hasemann, P. Mailaender, and R. Kraemer, The repetitive use of non-thermal dielectric barrier discharge plasma boosts cutaneous microcirculatory effects. Microvasc Res, 2016. **106**: p. 8-13.
150. Hartwig, S., S. Preissner, J.O. Voss, M. Hertel, C. Doll, R. Waluga, and J.D. Raguse, The feasibility of cold atmospheric plasma in the treatment of complicated wounds in cranio-maxillo-facial surgery. J Craniomaxillofac Surg, 2017. **45**(10): p. 1724-1730.
151. Helgadottir, S., S. Pandit, V.R. Mokkapati, F. Westerlund, P. Apell, and I. Mijakovic, *Vitamin C Pretreatment Enhances the Antibacterial Effect of Cold Atmospheric Plasma*. Front Cell Infect Microbiol, 2017. **7**: p. 43.
152. DIN SPEC 91315, General Requirements For Plasma Sources In Medicine. 2014: p. 1-16.
153. Idlibi, A.N., F. Al-Marrawi, M. Hannig, A. Lehmann, A. Rueppell, A. Schindler, H. Jentsch, and S. Rupf, *Destruction of oral biofilms formed in situ on machined titanium (Ti) surfaces by cold atmospheric plasma*. Biofouling, 2013. **29**(4): p. 369-379.
154. Mai-Prochnow, A., M. Bradbury, K. Ostrikov, and A.B. Murphy, Pseudomonas aeruginosa Biofilm Response and Resistance to Cold Atmospheric Pressure Plasma Is Linked to the Redox-Active Molecule Phenazine. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0130373.
155. Haralambiev, L., L. Wien, N. Gelbrich, A. Kramer, A. Mustea, M. Burchardt, A. Ekkernkamp, M.B. Stope, and D. Gumbel, Effects of Cold Atmospheric Plasma on the Expression of Chemokines, Growth Factors, TNF Superfamily Members, Interleukins, and Cytokines in Human Osteosarcoma Cells. Anticancer Res, 2019. **39**(1): p. 151-157.
156. Herbst, S.R., M. Hertel, H. Ballout, P. Pierdzioch, K.-D. Weltmann, H.C. Wirtz, S. Abu-Sirhan, E. Kostka, S. Paris, and S. Preissner, *Bactericidal Efficacy of Cold Plasma at Different Depths of Infected Root Canals In Vitro*. The open dentistry journal, 2015. **9**: p. 486-491.

157. Ballout, H., M. Hertel, J. Doehring, E. Kostka, S. Hartwig, S. Paris, and S. Preissner, Effects of plasma jet, dielectric barrier discharge, photodynamic therapy and sodium hypochlorite on infected curved root canals. *J Biophotonics*, 2018. **11**(3).
158. Pierdzioch, P., S. Hartwig, S.R. Herbst, J.D. Raguse, H. Dommisch, S. Abu-Sirhan, H.C. Wirtz, M. Hertel, S. Paris, and S. Preissner, *Cold plasma: a novel approach to treat infected dentin-a combined ex vivo and in vitro study*. *Clin Oral Investig*, 2016. **20**(9): p. 2429-2435.
159. Rupf, S., M. Al-Muhammad, M. Hannig, A. Lehmann, A. Rueppell, and A. Schindler, In-vitro influence of non-thermal atmospheric plasma treatment on the tooth-composite-interface. 2011.
160. Pan, H., G. Wang, J. Pan, G. Ye, K. Sun, J. Zhang, and J. Wang, Cold plasma-induced surface modification of heat-polymerized acrylic resin and prevention of early adherence of *Candida albicans*. *Dent Mater J*, 2015. **34**(4): p. 529-36.
161. Balasubramaniam, R., A.S. Kuperstein, and E.T. Stoopler, *Update on Oral Herpes Virus Infections*. *Dental Clinics of North America*, 2014. **58**(2): p. 265-280.
162. Doorbar, J., Model systems of human papillomavirus-associated disease. *J Pathol*, 2016. **238**(2): p. 166-79.
163. Weiss, M., G. Daeschlein, A. Kramer, M. Burchardt, S. Brucker, D. Wallwiener, and M.B. Stope, *Virucide properties of cold atmospheric plasma for future clinical applications*. *J Med Virol*, 2017. **89**(6): p. 952-959.
164. Bunz, O., K. Mese, W. Zhang, A. Piwowarczyk, and A. Ehrhardt, Effect of cold atmospheric plasma (CAP) on human adenoviruses is adenovirus type-dependent. *PLoS One*, 2018. **13**(10): p. e0202352.
165. Volotskova, O., L. Dubrovsky, M. Keidar, and M. Bukrinsky, Cold Atmospheric Plasma Inhibits HIV-1 Replication in Macrophages by Targeting Both the Virus and the Cells. *PLoS One*, 2016. **11**(10): p. e0165322.
166. Hirst, A.M., F.M. Frame, M. Arya, N.J. Maitland, and D. O'Connell, Low temperature plasmas as emerging cancer therapeutics: the state of play and thoughts for the future. *Tumour Biol*, 2016. **37**(6): p. 7021-31.
167. Welz, C., S. Emmert, M. Canis, S. Becker, P. Baumeister, T. Shimizu, G.E. Morfill, U. Harreus, and J.L. Zimmermann, *Cold Atmospheric Plasma: A Promising Complementary Therapy for Squamous Head and Neck Cancer*. *PLoS One*, 2015. **10**(11): p. e0141827.
168. Kim, S.J. and T.H. Chung, Cold atmospheric plasma jet-generated RONS and their selective effects on normal and carcinoma cells. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 20332.
169. Lee, J.H., J.Y. Om, Y.H. Kim, K.M. Kim, E.H. Choi, and K.N. Kim, Selective Killing Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma with NO Induced Dysfunction of Epidermal Growth Factor Receptor in Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One*, 2016. **11**(2): p. e0150279.
170. Schuster, M., C. Seebauer, R. Rutkowski, A. Hauschild, F. Podmelle, C. Metelmann, B. Metelmann, T. von Woedtke, S. Hasse, K.D. Weltmann, and H.R. Metelmann, *Visible tumor surface response to physical plasma and apoptotic cell kill in head and neck cancer*. *J Craniomaxillofac Surg*, 2016. **44**(9): p. 1445-52.
171. Xia, J., W. Zeng, Y. Xia, B. Wang, D. Xu, D. Liu, M.G. Kong, and Y. Dong, Cold atmospheric plasma induces apoptosis of melanoma cells via Sestrin2-mediated nitric oxide synthase signaling. *J Biophotonics*, 2018: p. e201800046.
172. Gumbel, D., N. Gelbrich, M. Weiss, M. Napp, G. Daeschlein, A. Sckell, S.A. Ender, A. Kramer, M. Burchardt, A. Ekkernkamp, and M.B. Stope, *New Treatment Options for Osteosarcoma - Inactivation of Osteosarcoma Cells by Cold Atmospheric Plasma*. *Anticancer Res*, 2016. **36**(11): p. 5915-5922.
173. Schneider, C., S. Arndt, J.L. Zimmermann, Y. Li, S. Karrer, and A.K. Bosserhoff, *Cold atmospheric plasma treatment inhibits growth in colorectal cancer cells*. *Biol Chem*, 2018.
174. Yu, H., Y. Wang, S. Wang, X. Li, W. Li, D. Ding, X. Gong, M. Keidar, and W. Zhang, Paclitaxel-Loaded Core-shell Magnetic Nanoparticles and Cold Atmospheric Plasma Inhibit Non-small Cell Lung Cancer Growth. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018.
175. Vandamme, M., E. Robert, S. Lerondel, V. Sarron, D. Ries, S. Dozias, J. Sobilo, D. Gosset, C. Kieda, B. Legrain, J.M. Pouvesle, and A.L. Pape, *ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma*. *Int J Cancer*, 2012. **130**(9): p. 2185-94.
176. Privat-Maldonado, A., Y. Gorbanev, S. Dewilde, E. Smits, and A. Bogaerts, Reduction of Human Glioblastoma Spheroids Using Cold Atmospheric Plasma: The Combined Effect of Short- and Long-Lived Reactive Species. *Cancers (Basel)*, 2018. **10**(11).

177. Schneider, C., L. Gebhardt, S. Arndt, S. Karrer, J.L. Zimmermann, M.J.M. Fischer, and A.K. Bosserhoff, *Cold atmospheric plasma causes a calcium influx in melanoma cells triggering CAP-induced senescence*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 10048.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Ann Cathrin Pöhlmann versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Ex vivo* Studie zum Vergleich dreier kalter atmosphärischer Plasmaquellen zur Biofilmentfernung auf mikrostrukturierten Titanoberflächen“ 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 etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der unten stehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autorin 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 etwaigen erfolgten Publikationen

Frau Ann Cathrin Pöhlmann hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Preissner S#, **Pöhlmann AC#**, Schubert A, Lehmann A, Arnold T, Nell O, Rupf S.
Ex Vivo Study Comparing Three Cold Atmospheric Plasma (CAP) Sources for Biofilm Removal on Microstructured Titanium.
Plasma Medicine. 2018 Dec; Vol9. doi: 10.1615/PlasmaMed.2018027314.
#geteilte Erstautorenschaft

Beitrag im Einzelnen:

- umfassende Einarbeitung in den Stand der Literatur hinsichtlich Plasmaphysik, Plasmagenerierung, Plasmaquellen, klinische Anwendung von Plasma, Möglichkeiten zur Anwendung in der Mundhöhle
- Einarbeitung in die Untersuchungsmethoden im Labor, im Speziellen Herstellung von ex vivo Apparaturen
- Mitarbeit beim Aufbau des Studiendesigns, dabei vor allem
 - Durchführung zahlreicher Vorversuche zur Versuchsdurchführung

- umfangreiche Vorversuche zur Ermöglichung der Standardisierung der Beprobung
- Mitarbeit bei der Erstellung des Ethikantrages, der Teilnehmerinformation etc.
- Labortechnische Herstellung aller Schienenapparaturen
- Mitarbeit bei der Durchführung der Plasmaversuche
- Mitarbeit bei der Auswertung der Ergebnisse und Aufarbeitung der Daten
- Mitarbeit beim Schreiben des Manuskripts und finale Kontrolle des selbigen

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Publikationen

“The use of direct oral anticoagulants for stroke prevention in atrial fibrillation: A study on physicians' perspective and preferences.”

Alexander Wutzler, Marwin Bannehr, Ann Cathrin Pöhlmann, Wilhelm Haverkamp

International Journal of Cardiology, 2014, Volume 175, Issue 1, Pages 188 - 191

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.04.245>

“Ex vivo study comparing three cold atmospheric plasma (CAP) sources for biofilm removal on microstructured titanium”

Saskia Preißner^{1st}, Ann Cathrin Poehlmann^{1st}, Andreas Schubert, Antje Lehmann, Thomas Arnold, Olaf Nell, Stefan Rupf

Plasma Medicine, 2019, Volume 9, Issue 1, Pages 1 - 14

DOI: [10.1615/PlasmaMed.2018027314](https://doi.org/10.1615/PlasmaMed.2018027314)

Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. dent. Saskia Preißner für die Überlassung dieses aktuellen und spannenden Themas. Vielen Dank für die freundliche und unkomplizierte Unterstützung. Die interessanten Diskussionen und die Zusammenarbeit haben mir große Freude bereitet.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Rupf für die Labor - Zusammenarbeit im IZI Leipzig und die Anfertigung der REM - Bilder.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Olaf Nell für die Zusammenarbeit bei der Anfertigung der FM - Bilder.

Darüber hinaus gilt mein Dank Frau Dr. Antje Lehmann, Andreas Schubert, Thomas Arnold und den Mitarbeitern des IZI Leipzig für die Bereitstellung des Mikrowellen - betriebenen Plasma - Jets des IOM, der Laborräume und des Fluoreszenzmikroskops.

Mein Dank gilt natürlich allen freiwilligen Probanden, für das zuverlässige Tragen der Miniplastschienen und des manchmal sicher nicht leichten Verzichts auf die gewohnte Mundhygiene und Komfort.

Ich bedanke mich bei meiner Mutter Dr. med. Michaela Pöhlmann für die unermüdliche Motivation, Unterstützung und den zu jeder Zeit verfügbaren Rat.

Außerdem bedanke ich mich bei meinem Partner Franz Kamutzki für die Unterstützung.

Weiterhin gilt mein Dank Dentsply Implants Friadent, Mannheim, Deutschland für die Bereitstellung der Implantatplättchen.