

Aus dem
CharitéCentrum 3 für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
Bereich Oralmedizin, zahnärztliche Röntgenologie und Chirurgie
Leiterin: Prof. Dr. med. dent. Andrea Maria Schmidt-Westhausen

Habilitationsschrift

Die Therapie Biofilm-assoziiertes oraler Erkrankungen mit atmosphärischem kaltem Plasma — die Anwendung des vierten Aggregatzustands in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

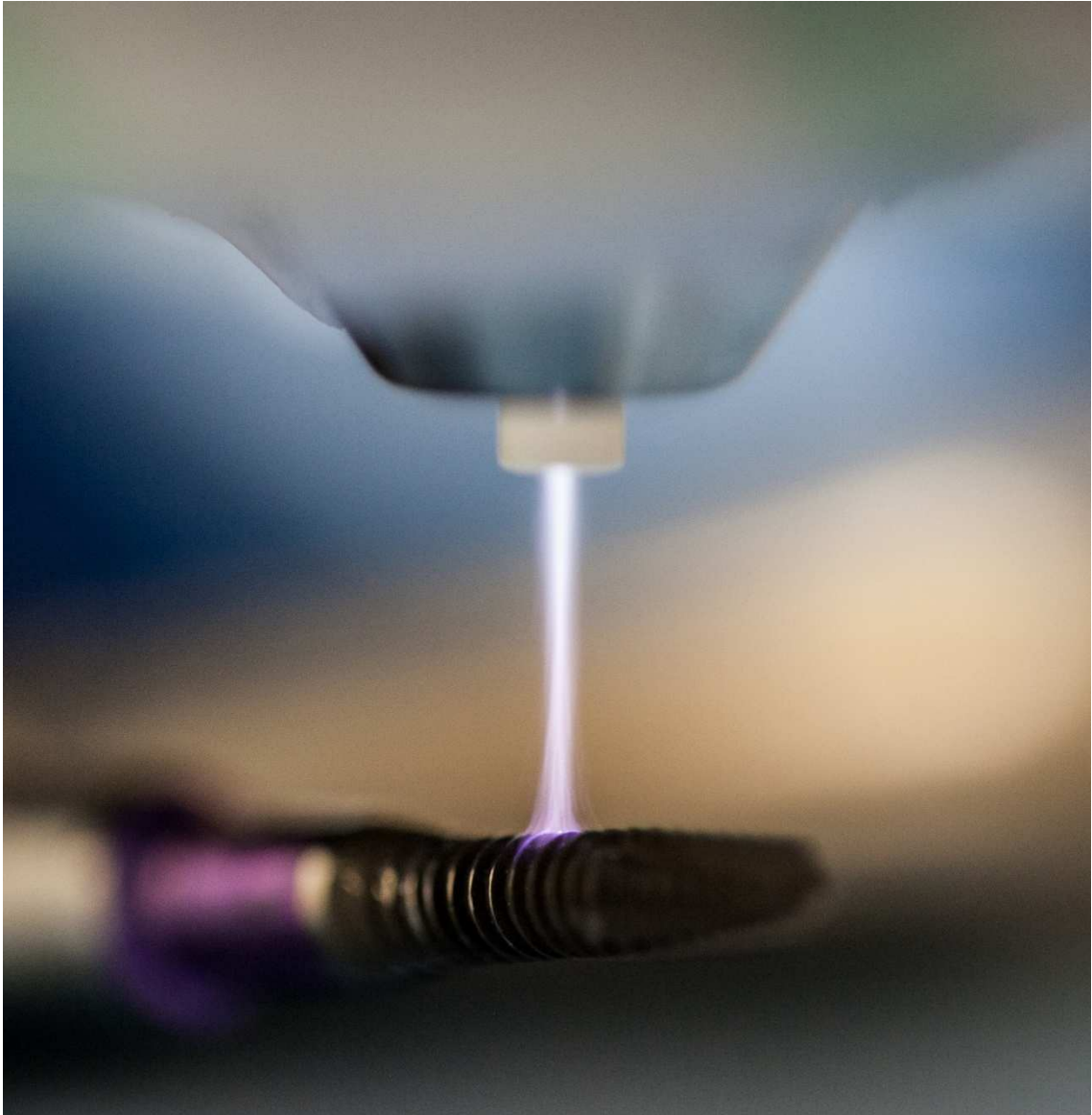
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. dent. Moritz Hertel

Eingereicht: Juni 2016
Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries
1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hans-Robert Metelmann, Greifswald
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Henning Schliephake, Göttingen



Meiner Familie gewidmet.

(insb. Karl Philipp Hertel †2016)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abkürzungen | 4 |
| 1. Einleitung..... | 6 |
| 1.1 Physikalische Grundlagen..... | 7 |
| 1.2 Medizinische Anwendung | 10 |
| 1.2.1 Wirkung auf Mikroorganismen und Viren..... | 11 |
| 1.2.2 Wirkung auf eukaryotische Zellen und mammale Gewebe | 13 |
| 1.2.3 Wirkung auf Tumorzellen | 16 |
| 1.3 Frage- und Zielstellung | 18 |
| 2. Eigene Arbeiten zur antimikrobiellen Therapie mit CAP im oralen Bereich | 19 |
| 2.1 Antibakterielle Wirkung in oralen Hartgeweben <i>in vitro</i> und <i>ex vivo</i> | 19 |
| 2.1.1 Kariesfreie und kariöse Wurzeloberflächen | 19 |
| 2.1.2 Wurzelkanäle..... | 27 |
| 2.1.3 Alveolarknochen..... | 34 |
| 2.2 Antibakterielle Wirkung auf Implantatoberflächen <i>in vitro</i> | 40 |
| 2.3 Antimykotische Wirkung <i>in vivo</i> | 49 |
| 3. Diskussion..... | 59 |
| 4. Zusammenfassung..... | 66 |
| 5. Literatur | 68 |
| Danksagung | 78 |
| Erklärung | 79 |

Abkürzungen

| | |
|---------------------------------|--|
| α-SMA | Alpha Smooth Muscle Actin |
| APP | Atmospheric Pressure Plasma |
| Ar | Argon |
| ATM | Ataxia Telangiectasia Mutated Kinase |
| BEI | Backscatter Electron Image |
| CAP | Cold Atmospheric Plasma |
| CE | Communauté Européenne |
| CFU | Colony Forming Unit |
| CHX | Chlorhexidine-bis-Gluconate |
| CLSM | Confocal Laser Scanning Microscopy |
| DBD | Dielectric Barrier Discharge |
| DIN SPEC | Spezifikation des Deutschen Instituts für Normung e. V. |
| DL | Diode Laser |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid |
| DSM(Z) | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (und Zellkulturen) |
| EGFR | Epidermal Growth Factor Receptor |
| ERK-1/2 | Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 |
| <i>f</i> | Frequenz [Hz] |
| FGF-2 | Fibroblast Growth Factor 2 |
| FM | Fluorescence Microscopy |
| H | Wasserstoff |
| He | Helium |
| HIF-2α | Hypoxia Inducible Factor 2 α |
| HMOX-1 | Heme Oxygenase 1 |
| ICAM-1 | Intercellular Adhesion Molecule 1 |
| IL-6/8 | Interleukin 6/8 |
| JNK-1/2 | C-Jun-N-terminal Kinase 1/2 |

| | |
|----------------------------------|---|
| LFA-1 | Lymphocyte Function Associated Antigen 1 |
| log RF | Logarithmic Reduction Factor |
| MCP-1 | Monocyte Chemoattractant Protein 1 |
| MEK-1/2 | Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal Regulated Kinase Kinase 1/2 |
| MRONJ | Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw |
| MRSA | Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> |
| N | Stickstoff |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| Ne | Neon |
| Nox-2-ASK-1 | NADPH Oxidase 2-Induced Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 |
| O | Sauerstoff |
| p38-MAPK | p-38 Mitogen-Activated Protein Kinase |
| PMMA | Polymethylmethacrylat |
| RCL | Root Caries Lesion |
| RNS | Reactive Nitrogen Species |
| ROS | Reactive Oxygen Species |
| SEI | Secondary Electron Image |
| SEM | Scanning Electron Microscopy |
| SRP | Scaling and Root Planning |
| TGF-β1/2 | Transforming Growth Factor β 1/2 |
| TNF-ASK-1 | Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 |
| TTP | Tissue Tolerable Plasma |
| U | Stromspannung [V] |
| UV | Ultraviolett |
| VAS | Visual Analogue Scale |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| YY-1 | Yin Yang 1 |

1. Einleitung

Die medikamentöse Behandlung mikrobieller Erkrankungen bewegt sich im Spannungsfeld zwischen dem therapeutischen Nutzen und dem Risiko des Auftretens von Resistenzen. Vor dem Hintergrund einer progredienten Verschiebung dieses Verhältnisses zu Letzterem besteht ein Bedarf für neue Therapieansätze, welche den sich hieraus ergebenden Herausforderungen gerecht werden (1). Die häufigsten mikrobiellen bzw. Biofilm-assoziierten Erkrankungen im oralen Bereich sind Karies (2) und inflammatorische (Folge-)Erkrankungen des Endodonts und apikalen Parodontiums (3) sowie der Formenkreis der Plaque-induzierten Gingivitiden und marginalen Parodontitiden (4). Bei zunehmender Zahl weltweit inserierter dentaler Implantate kommt zudem der periimplantären Mucositis und Periimplantitis eine zunehmende epidemiologische Bedeutung zu (5). Ferner wurden mikrobielle Infektionen im Zusammenhang mit den pathologischen Mechanismen medikamentenassoziiierter Osteonekrosen des Kiefers (medication-related osteonecrosis of the jaw, MRONJ) diskutiert (6). Die genannten Erkrankungen haben in Bezug auf die kausativen Pathogene eher unspezifischen Charakter und eine multifaktorielle Ätiopathogenese. Demgegenüber existiert ein breites Spektrum an spezifischen Infektionen der Mundschleimhaut bzw. Infektionskrankheiten mit oralen Manifestationen, welche durch pathogene Mikroorganismen (Bakterien (z. B. *T. pallidum* (7)) und Pilze (z. B. *Candida spp.* (8) sowie *A. fumigatus* (9)) und Viren (z. B. humane Herpesviren (10), humane Papillomaviren (11), Coxsackieviren (12) und Paramyxoviren (13)) verursacht werden. Innerhalb der klinischen Plasmamedizin stellt die Nutzung mikrobiozider und viruzider Effekte von sogenanntem kaltem atmosphärischem Plasma einen vielversprechenden Ansatz im eingangs dargestellten Kontext dar. In Ergänzung zur Inaktivierung von Pathogenen können Mechanismen der Heilung stimuliert werden. Hieraus ergibt sich das Potenzial therapeutischer Synergieeffekte.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Wirksamkeit von kaltem atmosphärischem Plasma zur Inaktivierung oraler fakultativ-pathogener Bakterien und *Candida* Spezies *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* auf kariesfreien und kariösen Dentinoberflächen, in Wurzelkanälen, in Alveolarknochen,

auf Implantatoberflächen, auf oraler Mucosa und auf Polymethylmethacrylat (PMMA)-Prothesen. Es wurde angenommen, dass eine Bestrahlung mit Plasma in Relation zu Vergleichs- und Kontrollgruppen in einer signifikant stärkeren Reduktion der koloniebildenden Einheiten (colony forming units, CFU) *in vitro* und *ex vivo* sowie einer beschleunigten Remission *in vivo*, gemessen an Surrogaten für eine Infektion, resultiert.

1.1 Physikalische Grundlagen

Physikalisches Plasma stellt neben fest, flüssig und gasförmig den vierten Aggregatzustand dar und ist definiert als ein partiell oder vollständig ionisiertes Gas. Seine Zusammensetzung besteht dementsprechend zu variablen Anteilen aus Elektronen sowie neutralen und ionisierten Atomen und Molekülen. Die Bezeichnung „Plasma“ wurde 1928 erstmals von Irvine Langmuir für ein ionisiertes Gas verwendet. Plasmen werden entsprechend ihrer Temperatur, des herrschenden Drucks, der emittierten Strahlung und der Fähigkeit zur Induktion elektromagnetischer Felder klassifiziert (14). Artifizell kann physikalisches Plasma sowohl bei Über- und Unterdruck als auch bei einem atmosphärischen Druck von 101,325 kPa durch Eintrag von Energie in ein Gas erzeugt werden. Durch weitgehende bis vollständige Ionisation entsteht thermisches bzw. heißes Plasma (> 40 bis mehrere tausend °C). Non-thermisches bzw. kaltes Plasma (30 - 40 °C) resultiert bei partieller Ionisierung (< 0,1 %). Plasma kann in Umgebungsluft, künstlichen Gasmischen (z. B. Ar / O₂) und reinen Gasen (z. B. Ar, He, Ne, N₂) erzeugt werden (14). Hierbei bestimmt die chemische Zusammensetzung des betreffenden Gases maßgeblich, welche Reaktionen ein Plasma in Materie vermittelt. Weiterhin haben die physikalischen Determinanten der Plasmaquelle und die Expositionsdauer einen entscheidenden Einfluss. Die resultierenden Wechselwirkungen basieren auf der Induktion bzw. Emission von Elektronen, Ionen, reaktiven Sauerstoff- (reactive oxygen species, ROS) und Stickstoffspezies (reactive nitrogen species, RNS), Photonen (ultraviolettes (UV) und sichtbares Licht), elektromagnetischer Strahlung und Wärme (14).

Sogenannte direkte Quellen erzeugen artifizielles Plasma in der zwischen einer Hochspannungselektrode und einer geerdeten Elektrode befindlichen Raumluft (dielectric barrier discharge, DBD). Auf dem genannten Prinzip basiert das System PlasmaDerm® (Cinogy, Duderstadt, Deutschland), welches in Deutschland für die therapeutische Anwendung am Menschen zugelassen ist. Alle technischen Komponenten sind in eine Steuerungseinheit und ein Handstück integriert. Ein aktuell noch nicht kommerziell verfügbarer Prototyp vereint alle Elemente inklusive Akkumulator in einem kabellosen Handstück (Abbildung 1). Bei indirekten Quellen, sogenannten Plasma-Jets, wird zwischen zwei Elektroden ein Plasma generiert und über ein Carriergas fortgeleitet. Überdies finden Hybridsysteme Anwendung (15). Ein Plasma-Jet-System mit Zulassung für die therapeutische Anwendung an Mensch und Tier ist der kINPen Med® (neoplas tools, Greifswald, Deutschland). In einem durch eine Kapillare geleiteten Argon-Gasstrom von ca. 4,3 sl / min wird hierbei durch die Applikation eines hochfrequenten Wechselstroms ($U = 2 - 6 \text{ kV}$, $f = 1,1 \text{ MHz}$) atmosphärisches Kaltplasma mit einer Energie unter $60 \text{ J} / \text{cm}^2 \cdot \text{min}$ erzeugt und transportiert. Die technischen Komponenten sind in einer Steuerungseinheit sowie in einem Handstück verbaut. Das Argon wird aus einem externen Gasbehältnis über einen Druckminderer zugeführt (Abbildungen 2 und 3).



Abbildung 1: DBD-System PlasmaDerm® (Prototyp) (Cinogy, Duderstadt, Deutschland).

1 = kabelloses Handstück, 2 = Applikator mit dielektrisch ummantelter Hochspannungselektrode



Abbildung 2: Plasma-Jet-System kINPen Med® (neoplas tools, Greifswald, Deutschland).

1 = externe Einspeisung von Argon über Druckminderer, 2 = Handstück; 3 = Steuerungseinheit mit Feinregelung und Anzeige des Ar-Gasflusses in $sl \cdot min^{-1}$

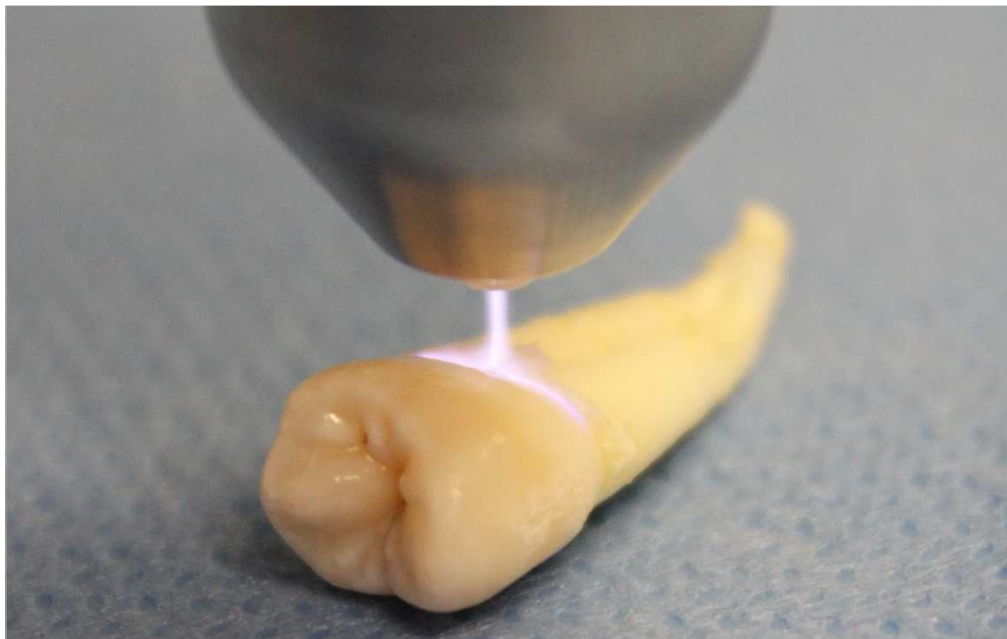


Abbildung 3: Exemplarische Bestrahlung eines extrahierten humanen Prämolaren mit kINPen Med®.

1.2 Medizinische Anwendung

Durch die Determination der Eigenschaften einer Plasmaquelle, des genutzten Gases sowie der Expositionszeit kann die biologische Wirkung eines Plasmas gesteuert werden (16). Hierdurch wird ermöglicht, mit physikalischen Plasmen ein breites Anwendungsspektrum innerhalb der Medizin abzudecken. In Überschneidung mit der technisch-industriellen Nutzung finden heißes und kaltes Plasma Verwendung zur Bearbeitung von Biomaterialien durch Schweißen, Löten sowie zur Beschichtung und Modifikation von Oberflächen (17, 18). Zudem können medizinische Instrumente und Implantate sterilisiert werden (19, 20). Die moderne klinische Plasmamedizin geht über die seit längerem etablierte Nutzung zur Koagulation, Ablation und Vaporisation von Geweben (21, 22) hinaus und umfasst mittlerweile zusätzlich die antimikrobielle Therapie, die Stimulation der Wundheilung sowie die Tumorthherapie als Teilgebiete. In der praktischen Anwendung ergeben sich Synergien, insbesondere zwischen Mikrobiozidie und Stimulation der Heilung bei der Wundtherapie. Grundlage der klinischen Anwendung ist hierbei die therapeutische Nutzung der Interaktion biologisch aktiver Komponenten von Plasmen mit organischer Materie. Die zugrunde liegenden Wirkungen basieren nach aktuellem Kenntnisstand vorrangig auf der Emission von UV-Strahlung und der Freisetzung verschiedener ROS und RNS (14). Zu letzteren zählen unter anderem das Hydroxyl-Radikal ($\cdot\text{OH}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), das Superoxid-Anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), Stickstoffmonoxid ($\cdot\text{NO}$) und das Peroxinitrit-Anion (ONOO^-) (15). Basierend auf physikalischen Modellen und experimentell gemessenen elektrischen Feldstärken in Plasma wird zudem postuliert, dass die induzierten elektromagnetischen Felder unabhängig von UV-Strahlung und ROS/RNS z. B. die Permeabilität von Zellen beeinflussen können (23, 24). Dosisabhängig erzeugt Plasma u. a. Schäden an isolierter und zellulärer DNA (chemische Veränderung von Nukleinbasen und Desoxyribose, Thymin-Dimerisierung, Einzel- und Doppelstrangbrüche und DNA-Protein-Crosslinks) (14, 15, 25, 26). Dies kann therapeutisch genutzt werden, beispielsweise zur antimikrobiellen oder onkologischen Therapie. Dieser Effekt ist in Zellen des Patienten jedoch unerwünscht (15). Die physikalischen Eigenschaften von atmosphärischem kaltem Plasma (cold atmospheric plasma, CAP bzw. atmospheric pressure plasma,

APP; Synonym: gewebeverträgliches Kaltplasma (tissue tolerable plasma, TTP)) erlauben durch die Abwesenheit bekannter negativer Effekte auf mammale Gewebe innerhalb der therapeutischen Breite bzw. Dosis eine Anwendung *in vivo*. Nach klinischer Nutzung wurden keine unerwünschten Wirkungen bzw. vereinzelt lediglich passagere Rötung und subjektiv tolerable Wärmesensation beschrieben (27-33).

1.2.1 Wirkung auf Mikroorganismen und Viren

Das Potenzial von CAP zur Inaktivierung eines breiten Spektrums humanpathogener Mikroorganismen (Bakterien und Sporen, Pilze) und Viren wurde in zahlreichen Untersuchungen beschrieben (34-53). Obwohl die Empfindlichkeit unterschiedlicher Pathogene gegenüber kaltem Plasma variiert, sind keine Resistenzen bekannt (35, 42, 44). Dementsprechend werden auch multiresistente Erreger effektiv inaktiviert (43, 51, 54-56). Die zwischen verschiedenen Mikroorganismen primär unterschiedliche Suszeptibilität ist zusätzlich abhängig von den Parametern bzw. der Art der Plasmaquelle, der Expositionszeit und folglich der Dosis erzeugter UV-Strahlung, ROS und RNS (42-44, 57).

Insbesondere die Bakterizidie von CAP wurde vielfältig untersucht. Beispielsweise fanden sich *in vitro* für *B. subtilis*, *E. coli*, *L. monocytogenes* und verschiedene multiresistente Bakterien wie Methicillin-resistenter *S. aureus* (MRSA) und *P. aeruginosa* eine Zunahme der intrazellulären Konzentration von ROS und Schäden der DNA, RNA, intrazellulärer Funktionsproteine, Mitochondrien sowie unterschiedlicher Bestandteile von Zellwänden und -Membranen (42-44, 48, 58-60). Die emittierte UV-Strahlung modifiziert hierbei Nukleinbasen, wohingegen reaktive korpuskulare Anteile des Plasmas zusätzlich Strangbrüche induzieren und Schäden an Biomolekülen, Organellen und Zelloberflächen bewirken können (u. a. Oxidation von Proteinen und Lipidperoxidation) (58). Als Resultat wurden für *E. coli* nach Bestrahlung mit CAP konsekutive Phasen des Zelltodes im Sinne einer Inaktivierung zellulärer Transportsysteme, gefolgt von einer Depolarisation der Membran und finaler Permeabilisierung der Zelle, beobachtet (44). Generell kann die Kapazität antioxidativer Schutz- (z. B. Katalasen und Superoxiddismutasen) und zellulärer Reparaturmechanismen (z. B. SOS-Response) als

wesentlicher Faktor für das Ausmaß an inerter Suszeptibilität gegenüber Plasma angenommen werden (60). *E. coli*-Mutanten mit Fehlen bestimmter Gene der oxidativen Response (OxyR und SoxS) zeigten in diesem Zusammenhang *in vitro* eine höhere Empfindlichkeit gegenüber CAP als der Wildtyp (50). Ferner wurde in *E. coli* an anderer Stelle eine Hochregulation von Genen der SOS-Antwort als Reaktion auf oxidativen Stress infolge einer Bestrahlung mit CAP gefunden (61). Für die Mechanismen der Fungizidie von CAP können weitestgehende Analogien zur Bakterizidie angenommen werden. Dies schließt die Induktion von Apoptose durch oxidativen Stress ein (62). Opportunistisch-pathogene Pilze, insbesondere *C. albicans* und *A. fumigatus*, wurden verschiedentlich experimentell mit Plasma inaktiviert. *C. albicans* wies hierbei in Relation zu Bakterien eine hohe Toleranz auf (34, 48). Als mögliche Ursache wurden protektive Eigenschaften von β -D-Glucanen der Zellwand und der Schutz der DNA durch das Vorhandensein einer Kernmembran diskutiert (34, 63). Im Zusammenhang mit der Inaktivierung von Viren und Bakteriophagen wurden analog zu Mikroorganismen Effekte von CAP auf Hüllstrukturen und Ribonukleinsäuren beschrieben (64-66).

Über die dargestellten Effekte auf Mikroorganismen hinaus besitzt CAP das Potenzial zur Zerstörung von Biofilmen. Eine entsprechende Wirkung wurde *in vitro* für bakterielle (*B. cenocepacia*, *E. coli*, *E. faecalis*, MRSA, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*) (52, 67-70) und mykotische Monospezies-Biofilme (*C. albicans*) dokumentiert (36, 71). Unter anderem wurde hierbei eine bakterizide Wirkung von Plasma auf artifizielle *E. faecalis*-Biofilme (52, 72) und *Ex-vivo*-Biofilme in humanen Wurzelkanälen gefunden (73). Für orale *Ex-vivo*-Multispezies-Biofilme wurden ferner die Inaktivierung von Bakterien und eine signifikante Reduktion der Proteinmenge durch CAP verglichen mit unbehandelten Kontrollen beschrieben. Die vollständige Entfernung der Biofilme von Titanoberflächen erforderte jedoch den adjuvanten Einsatz eines Aerosols (74). Zudem konnten an anderer Stelle nach der Entfernung oraler *Ex-vivo*-Biofilme von Titanplättchen durch die Kombination von CAP mit mechanischem Debridement Osteoblasten auf den betreffenden Proben kultiviert werden (75).

In verschiedenen Tiermodellen wurde ferner eine teilweise Inhibition bakterieller Kolonisation bis hin zur vollständigen Eradizierung bestimmter Bakterien auf infizierten Wundflächen nachgewiesen (70, 76). Klinische Humanstudien zeigten eine signifikante Reduktion der bakteriellen Kontamination von chronischen Hautwunden und venösen Ulzera im Vergleich zur Kontrolle. Der beobachtete Effekt war hierbei speziesunabhängig (29, 31, 33).

1.2.2 Wirkung auf eukaryotische Zellen und mammales Gewebe

Von der biologischen Systematik abweichend schließen die folgenden Abschnitte Pilze in die Bezeichnung „eukaryotische Zellen“ nicht ein. Diese werden trotz der sich überschneidenden Zuordnung zu den Eukaryoten und den Mikroorganismen im Kontext der vorliegenden Arbeit ausschließlich unter dem letztgenannten Begriff behandelt.

Die Effekte von mit Plasma-Jets und DBD-Quellen erzeugtem CAP auf eukaryotische Zellen wurden mehrheitlich *in vitro* an Monolayern untersucht (14). Im Fokus stand die Beeinflussung von Zelladhäsion, -migration, Differenzierung, Genexpression, Zytokinfreisetzung, intrazellulärer ROS-Konzentration, DNA-Schäden, Zellzyklus und Apoptose in humanen und tierischen Keratinozyten (48, 77-83), Endothelzellen (83-85), Drüsenepithelzellen (86), Ovarialzellen (87), Fibroblasten (48, 88, 89), Chondrozyten (90), Osteoblasten (90) und Leukozyten (u. a. B- und T-Lymphozyten) (91-94). Aufgrund der Analogie der in Zellen beobachteten Effekte bei direkter und indirekter Exposition (direkte Bestrahlung versus Applikation bestrahlter Medien) sowie ihrer Abschwächung durch einen Austausch der Kulturmedien unmittelbar nach Bestrahlung mit CAP wird angenommen, dass die im Folgenden dargestellten Wirkungen vorrangig auf der Induktion von ROS und RNS statt auf UV-Emission basieren (78, 80).

Bezogen auf Adhäsionsmoleküle der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion humaner Keratinozyten fand sich *in vitro* nach einer Kurzzeitbestrahlung mit Plasma keine Beeinflussung der Expression von $\alpha 2$ - und $\beta 1$ -Integrin, E-Cadherin und des Rezeptors für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR). Eine Verdreifachung der Expositionsdauer führte hingegen zu einer reduzierten Expression von E-Cadherin

und EGFR, jedoch nicht von Integrinen (77). Analoge Effekte wurden an anderer Stelle beobachtet, wobei die in der betreffenden Studie zusätzlich untersuchte Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls 1 (ICAM-1) nicht beeinflusst wurde (78). Bei Lymphozyten zeigte sich demgegenüber eine Herabregulation von L-Selectin, ICAM-1 und dem lymphozytenfunktionsassoziierten Antigen 1 (LFA-1 bzw. α L β 2-Integrin) nach Exposition mit CAP (91). Insgesamt sind die Ergebnisse unterschiedlicher *In-vitro*-Studien zur Zelladhäsion als heterogen einzustufen (14). Dennoch kann basierend auf der verfügbaren Literatur verallgemeinernd ein dosisabhängiges Potenzial zur Beeinflussung der Adhäsion und Migration von Zellen durch CAP abgeleitet werden.

In niedriger Dosis sind freie Radikale in physiologische Funktionen involviert und wirken unter anderem regulatorisch als Mediatoren in verschiedenen Signaltransduktionskaskaden (95). Übergeordnet können sie zudem das Überleben, die Proliferation sowie die Migration von Zellen fördern (15). Die Ergebnisse einer Untersuchung zur Bestrahlung von Endothelzellen mit CAP *in vitro* weisen in diesem Zusammenhang auf eine Stimulation der Proliferation durch eine ROS-medierte Freisetzung des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 2 (FGF-2) hin (84, 85). Neben FGF-2 wirken ROS und NOS per se pro-angiogenetisch (14). Zudem wurde die Vermittlung proliferativer Stimuli im Sinne einer Aktivierung der extrazellulär-signalregulierten Kinasen 1 und 2 (ERK-1/2) und der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK)/ERK Kinasen 1 und 2 (MEK-1/2) durch CAP in Leukozyten beschrieben (94). In humanen Fibroblasten, darunter Gingivafibroblasten, führte Plasma zu einer Verstärkung der Expression von verschiedenen Schlüsselmolekülen der Wundheilung, insbesondere Interleukin 6 (IL-6), IL-8, monozytenchemotaktisches Protein 1 (MCP-1), transformierender Wachstumsfaktor β 1 und β 2 (TGF- β 1 und 2), vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF), Kollagen Typ-1 und α -Glattmuskelaktin (α -SMA) (88, 89). CAP verstärkte weiterhin in monozytischen Zelllinien die Translation von mit Zellwachstum und -Differenzierung assoziierten Transkriptionsfaktoren (Yin Yang 1, YY-1 und Interferon-induzierende Faktoren) (93). Ebenfalls fand sich eine Aktivierung des anti-apoptotischen Hitzeschockproteins 27 (HSP-27) (94). Eine zusätzliche Modulation inflammatorischer Prozesse wurde

aufgrund der beobachteten verstärkten Expression der Hämoxigenase 1 (HMOX1) und von IL-8 angenommen (93). Demgegenüber erzeugen insbesondere höhere Dosen ROS oxidativen Stress und können wesentliche Zellbestandteile, insbesondere die DNA, schädigen. Entsprechende Mechanismen sind assoziiert mit Zellalterung und der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen. Ferner können sie direkt Apoptose induzieren (95-97). *In vitro* kann eine Plasmaexposition die Konzentration intrazellulärer ROS erhöhen (78, 82, 85, 90). Zudem wurden signifikante Veränderungen des Transkriptoms und Proteoms beschrieben. In Entsprechung zeigte sich unter anderem eine erhöhte Expression von Transkriptionsfaktoren und Enzymen des antioxidativen Systems (z. B. Hypoxie-induzierter Faktor 2α , HIF- 2α und Oxidoreduktasen) nach Applikation von CAP (48, 81, 93). Ferner wurden eine lineare Häufung von DNA-Schäden, eine vermehrte Arretierung des Zellzyklus in der G2/M-Phase und ein reduziertes Zellüberleben bei zunehmender Expositionszeit beobachtet (80, 82). In Analogie fand sich eine dosisabhängige Apoptoserate basierend auf Caspase-3-Assays (94). Eine Bestrahlung mit CAP führte hierbei zur Aktivierung pro-apoptotischer Signalproteine, wie p38-MAPK und den c-Jun-N-terminalen Kinasen 1 und 2 (JNK-1/2) (94). Nach exzessiver Bestrahlung wurde zudem Zellnekrose beschrieben (87). Allerdings deuten die Ergebnisse einer auf die zelluläre Response fokussierenden weiteren *In-vitro*-Studie an, dass der Konzentrationsanstieg an ROS sowie auch eine Zunahme der Apoptoserate durch bestimmte Determinanten der Plasmaquelle und kurze Bestrahlungszyklen vermieden werden können (79). Auf den aktuell verfügbaren Daten basierend kann postuliert werden, dass bei ausreichend niedrigen Dosen die Stimulation von Proliferation, Differenzierung, Adhäsion / Migration und Angiogenese gegenüber potenziellen negativen Effekten assoziiert mit oxidativem Stress überwiegt und somit ein günstiges Nutzen-Schaden-Verhältnis angenommen werden kann (81). Es liegt hierbei nahe zu vermuten, dass die Kapazität der zellulären antioxidativen und reparativen Mechanismen die Grenze der tolerablen Dosis bestimmt. In Übereinstimmung hiermit unterscheidet sich diese zwischen verschiedenen Zelltypen (83). Ein zusätzlicher Einfluss des lokalen Milieus auf das Ausmaß zellschädigender Effekte ist zudem bekannt (82, 92). Dieses kann durch seine Pufferkapazität und Interaktion mit bioaktiven Komponenten von

CAP entweder protektiv wirken oder durch hierbei entstehende sekundäre Radikale eine Potenzierung der Zytotoxizität vermitteln.

Die Stimulation der Wundheilung wurde verschiedentlich in tierexperimentellen Studien untersucht. Neben einer Beeinflussung der Expression von mit Heilung assoziierten Genen und einer beschleunigten Remission von Hautwunden im Mausmodell (88, 98) wurde für Ratten eine signifikant erhöhte Heilungsrate bakteriell infizierter Hautwunden nach Behandlung mit CAP in Vergleich zu unbehandelten Kontrollen beschrieben (70). Histologien von Hautwunden in Mäusen zeigten kleinere Entzündungs- und größere Reepithelisations- und Neovaskularisations-Scores nach Therapie mit Plasma im Gegensatz zu Spontanheilung. Allerdings waren die gefundenen Unterschiede nur zu einigen Untersuchungszeitpunkten statistisch signifikant (76). Klinische Daten zur Wundtherapie am Menschen liegen für unterschiedliche kleinere Patientenkollektive vor. Die entsprechenden Untersuchungen wurden mehrheitlich im Bereich der Dermatologie durchgeführt. Für die Behandlung infektionsfreier Hauttransplantatentnahmewunden mit CAP wurden in Relation zur Kontrolle eine signifikant beschleunigte Reepithelisation sowie ein verringertes Ausmaß an Krustenbildung beschrieben (30). Allerdings zeigte die Plasmatherapie bei Patienten mit venösen Beinulzera verglichen mit einer Kontrollgruppe keine signifikante Reduktion der Läsionsausdehnung (31). Für weitere Hauterkrankungen, z. B. M. Hailey-Hailey und Pruritus unterschiedlicher Genese, liegen vereinzelt Daten zur klinischen Anwendung von CAP vor (32, 99). In einer *Ex-vivo*-Studie fand sich in diesem Kontext eine Veränderung der atomaren Zusammensetzung der kutanen Lipidbarriere sowie eine Absenkung des pH-Werts durch die Applikation von kaltem Plasma im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen (100, 101). Mögliche Kausalitäten wurden jedoch bisher nicht vertiefend analysiert.

1.2.3 Wirkung auf Tumorzellen

Mit Ansätzen zur Behandlung diverser solider maligner Tumoren hat sich die Onkologie zu einem eigenständigen Bereich der Plasmamedizin entwickelt (102). Das Prinzip besteht dabei in der Entfaltung der bereits dargestellten zytotoxischen Effekte. Wie ausgeführt, sind diese im Kontext der

Wundbehandlung in humanen Zellen unerwünscht. In der Tumorthherapie hingegen sind eben diese Wirkungen beabsichtigt. Zudem eröffnet die Mikrobiozidie von CAP Möglichkeiten in der palliativen Therapie fortgeschrittener Neoplasien (103). Prinzipiell kann Plasma direkt auf Tumoren appliziert werden (103). Alternativ wurde die Injektion plasmabestrahlter Medien diskutiert (104, 105).

Obwohl oxidativer Stress mit der Entstehung und Progression von Neoplasien assoziiert ist (106), stellt die Induktion von ROS einen Bestandteil der Wirkungsmechanismen etablierter Behandlungsmethoden, z. B. der Radio-, Chemo- und der photodynamischen Therapie, dar (107-111). Dem liegt die Beobachtung zugrunde, dass Tumorzellen durch ihre erhöhte metabolische Aktivität ihr antioxidatives Potenzial in weiterem Umfang ausschöpfen als umliegende gesunde Zellen. Folglich wird ihnen eine reduzierte Toleranz gegenüber oxidativem Stress zugeschrieben (107, 112). Hinzu kommt, dass mit hohen Mitoseraten eine verstärkte Vulnerabilität für DNA-Schäden in der M-Phase einhergeht (113). In diesem Zusammenhang wurden selektive Effekte von CAP auf Tumorzellen beobachtet und eine erhöhte Suszeptibilität postuliert (114, 115). Analog zu gesunden Zellen wurde eine Erhöhung der intrazellulären ROS-Konzentration in Tumorzellen durch Applikation von Plasma beschrieben (116, 117). Neben ROS erzeugt CAP, anders als Radiatio und photodynamische Therapie, auch RNS, wobei anhand der Induktion von Apoptose durch hohe NO-Konzentrationen nitrosativer Stress als Ansatz in der Tumorthherapie diskutiert wurde (118).

Experimentell konnte durch CAP ein reduziertes Wachstum bzw. Überleben von Zellen verschiedener maligner Tumore *in vitro* und in *In-vivo*-(Maus)-Modellen mit zunehmender Dosis gezeigt werden (116, 119). Ferner wurde im Mausmodell eine Verkleinerung des Volumens von Glioblastomen verglichen mit unbehandelten Mäusen beobachtet (120). Als assoziierte Mechanismen wurden die Unterbrechung des Zellzyklus und die Induktion von Apoptose durch multiple Pathways, u. a. via Nicotinamidadeninukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase-2- und Tumornekrosefaktor- α -induzierte Apoptosesignal-regulierende Kinase 1 (Nox-2-ASK-1 und TNF-ASK-1), Ataxia Telangiectasia-mutierte Kinase (ATM)/p53, JNK und p38-MAPK beschrieben (117, 119-126). In Prostatakarzinomzellen wurden

darüber hinaus Zellnekrosen nach Exposition mit CAP beschrieben. Allerdings traten diese in der zugrunde liegenden Studie auch in gesunden Prostataepithelzellen auf (127). Dementsprechend bleibt aktuell unklar, inwiefern die oben genannten selektiven Effekte von Plasma auf Tumorzellen im Rahmen der klinischen Anwendung tatsächlich erwartet werden können. Nichtsdestotrotz stellt CAP einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz in der Onkologie, zumindest in Form der adjuvanten Applikation, dar (108). Experimentelle Ergebnisse der Anwendung in Kombination mit anderen Therapeutika deuten ein synergistisches Potenzial an (128-130). Insbesondere könnte CAP bei Resistenzen oder reduzierter Empfindlichkeit von Tumoren gegenüber konventionellen Therapeutika eingesetzt werden (131, 132). Postuliert wurde in diesem Zusammenhang, dass über eine direkte Zuleitung von O₂ über die Plasmaquelle hypoxieassoziierte Resistenzeffekte adressiert werden könnten (108).

Aktuell sind für den Bereich der Onkologie prospektive klinische Studien am Menschen nicht verfügbar. Die Ergebnisse einer retrospektiven Untersuchung zur Anwendung von CAP im Rahmen der palliativen Therapie von Patienten mit inoperablen Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region zeigten eine positive Beeinflussung des Ausmaßes an Beschwerden, Foetor und Superinfektionen (103).

1.3 Frage- und Zielstellung

Basierend auf den dargestellten Effekten von CAP ergab sich die Frage nach der Möglichkeit einer Anwendung zur Therapie Biofilm-assoziiierter oraler Erkrankungen. Vor diesem Hintergrund sollte dessen antimikrobielle Wirkung in bzw. auf verschiedenen oralen Hart- und Weichgeweben, im Einzelnen auf kariesfreien und kariösen humanen Dentinoberflächen, in humanen Wurzelkanälen, porcinem Alveolarknochen und oraler Mucosa *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* untersucht werden. Im Weiteren sollte die Wirksamkeit gegen Biofilme auf alloplastischen Oberflächen von dentalen Implantaten und Prothesen analysiert werden. Es galt ferner, die mikrobiozide Wirkung von CAP in Ergänzung sowie im Vergleich zu den jeweiligen etablierten antimikrobiellen Verfahren bzw. Therapiestandards zu evaluieren.

2. Eigene Arbeiten zur antimikrobiellen Therapie mit CAP im oralen Bereich

Die vorliegende Arbeit umfasst als kumulative Habilitationsschrift eigene experimentelle Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit von CAP in bzw. auf oralen Hart- und Weichgeweben, dentalen Implantaten und Prothesen *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo*.

2.1 Antibakterielle Wirkung in oralen Hartgeweben *in vitro* und *ex vivo*

2.1.1 Kariesfreie und kariöse Wurzeloberflächen

Die Destruktion von Biofilmen und die fokale Elimination kariogener und parodontalpathogener Mikroorganismen sind Bestandteil der Prophylaxe und der konventionellen Therapien bei der Behandlung von Karies, Gingivitiden und marginalen Parodontitiden. Hierbei ermöglicht CAP eine adjuvante Anwendung in Kombination mit etablierten mechanisch-ablativen Verfahren wie z. B. der Kariesexkavation mit rotierenden Instrumenten und der parodontalen Kürettage (scaling and root planning, SRP). Weitere Perspektiven ergeben sich im Kontext moderner minimal- bzw. non-invasiver Kariestherapiekonzepte wie der fraktionierten bzw. subtotalen Exkavation (133) und der Infiltration kariöser Zahnhartsubstanzen (134). Die Ergebnisse einer experimentellen Studie zur antibakteriellen Wirkung von CAP auf artifizielle *S. mitis*-Biofilme auf kariesfreien humanen Dentinoberflächen *in vitro* und symmetrische Wurzelkaries (root caries lesions, RCL) an humanen Zähnen *ex vivo* wurden im Journal „Clinical Oral Investigations“ publiziert. Die Kombination aus SRP und CAP resultierte auf kariesfreiem Dentin in einer Reduktion der CFU-Zahlen von *S. mitis* auf 0. Die Unterschiede zu SRP allein und zur Negativkontrolle (2,98 und 3,85 log CFU / ml) waren hochsignifikant ($p < 0,001$; Mann-Whitney U Test). Für SRP mit und ohne CAP ergaben sich demnach logarithmische Reduktionsfaktoren (log RF) von 3,85 und 0,87. Bei RCL führte CAP kombiniert mit CHX zu signifikant kleineren Multispezies-CFU-Zahlen verglichen mit CHX allein (2,67 vs. 4,45 log CFU / ml; $p < 0,01$) (135).

Pierdzioch P & Hartwig S, Herbst SR, Raguse JD, Dommisch H, Abu-Sirhan S, Wirtz HC, Hertel M, Paris S, Preissner S. Cold plasma: a novel approach to treat infected dentin-a combined ex vivo and in vitro study. *Clinical oral investigations*. 2016.

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

2.1.2 Wurzelkanäle

Das Hauptziel der endodontischen Therapie ist die Elimination von Mikroorganismen und Biofilmen aus dem Wurzelkanalsystem (136). Zusätzlich zum mechanischen Debridement werden hierfür lokal antimikrobielle Chemotherapeutika wie Natriumhypochlorit (NaOCl), Chlorhexidin-bis-Glukonat (CHX), Tetrazyklin, Doxyzyklin, Kalziumhydroxid ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), Ozon (O_3) und verschiedene Photosensitizer (z. B. Toluidinblau) eingesetzt (137). NaOCl und CHX in Form von Spüllösungen können zudem zur Potenzierung ihrer Wirksamkeit ultraschallaktiviert werden (138). Misserfolge im Sinne persistierender periapikaler Entzündungen können dennoch durch das Überleben von Mikroorganismen im Endodont und in Dentintubuli auftreten. Hiermit assoziiert ist die reduzierte Empfindlichkeit gegenüber den genannten Agenzien durch intrinsische Resistenz von *E. faecalis* und *C. albicans* (139) sowie durch die Präsenz von Biofilmen (136). CAP stellt aufgrund seiner mikrobioziden Potenz einen neuen Ansatz für die adjuvante Desinfektion des Wurzelkanalsystems dar. Eine erste experimentelle Studie zeigte vielversprechende Resultate (52). Die Ergebnisse einer eigenen, auf die Wirksamkeit von CAP gegen artifizielle *E. faecalis*-Biofilme in unterschiedlichen Schichten standardisierter humaner Wurzelkanäle fokussierenden, *In-vitro*-Untersuchung wurden im „The Open Dentistry Journal“ publiziert. Insgesamt fanden sich nach Applikation von CHX kombiniert mit CAP bis in 800 μm signifikant kleinere CFU-Zahlen von *E. faecalis* als für CHX allein ($p < 0,01$; Mann-Whitney U Test). Der Unterschied nach Anwendung der Kombination aus CHX und CAP und CAP allein war nicht statistisch signifikant ($p > 0,05$). Alle aufgeführten Gruppen zeigten signifikant kleinere CFU-Zahlen als die Negativkontrolle ($p < 0,01$). Für CHX und CAP, CAP allein, sowie CHX allein ergaben sich log RFs von 3,56, 3,27 und 2,65. In oberflächlichen und tiefen Dentinschichten (0 - 300 und 500 - 800 μm) zeigten sich signifikant kleinere CFU-Zahlen für CHX und CAP, CAP allein und CHX allein in Relation zur Negativkontrolle ($p < 0,01$). Weiterführend waren innerhalb der untersuchten Schichten lediglich zwischen 0 - 300 μm die Ergebnisse für CHX kombiniert mit CAP im Sinne kleinerer CFU-Zahlen verglichen mit CAP bzw. CHX allein signifikant unterschiedlich (log RF = 4,41 vs. 3,43 vs. 2,87; $p < 0,01$) (140).

Herbst SR & Hertel M, Ballout H, Pierdzioch P, Weltmann KD, Wirtz HC, Abu-Sirhan S, Kostka E, Paris S, Preissner S. Bactericidal Efficacy of Cold Plasma at Different Depths of Infected Root Canals In Vitro. The open dentistry journal. 2015; 9: 486 -91.

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

2.1.3 Alveolarknochen

Ogleich die Pathophysiologie der MRONJ in Detail bis heute nicht vollständig geklärt ist, gilt die Infektion avaskulären, avitalen bzw. nekrotischen Knochens durch Mikroorganismen der oralen Flora als relevanter Faktor bei der Entstehung und der Progression des Krankheitsbildes (6, 141). Dementsprechend adressieren unterschiedliche Therapieansätze u. a. orale (fakultativ)-pathogene Mikroorganismen und Biofilme. Die primär konservative und palliative Behandlung von MRONJ besteht vorwiegend in der lokalen Antiseptik und ggf. systemischen antiinfektiven Therapie. Zudem können im Rahmen der chirurgischen Behandlung mikrobiozide Agenzien adjuvant appliziert werden (142). Eine auf die potenzielle Anwendung von CAP zur supportiven Therapie medikamentenassoziierter Kieferosteonekrosen fokussierende eigene *In-vitro*-Studie untersuchte die Wirksamkeit gegen artifizielle *S. mitis*-Biofilme in kortiko-spongiösem porcinem mandibulärem Knochen. Die Resultate waren Gegenstand einer Veröffentlichung im Journal „Clinical Plasma Medicine“. CAP führte in porcinem Alveolarknochen zu signifikant kleineren CFU-Zahlen (4,37 log CFU / ml) als CHX und die Negativkontrolle (4,57 und 4,61 log CFU / ml; $p < 0,01$; Kruskal-Wallis Test). Zwischen 0 - 300 μm Probtiefe waren die Ergebnisse der Gruppen allerdings nicht signifikant unterschiedlich ($p > 0,05$). Hingegen resultierte die Applikation von CAP in signifikant kleineren CFU-Zahlen (4,38 log CFU / ml) verglichen mit CHX und der Kontrollgruppe innerhalb von 300 - 600 μm (4,70 und 4,62 log CFU / ml; $p < 0,05$). In einer Probtiefe von 600 - 900 μm fanden sich signifikant kleinere CFU-Zahlen für CAP verglichen mit CHX (4,5 vs. 4,9 log CFU / ml; $p < 0,05$). Für alle Gruppen zeigte sich eine Zunahme der CFU-Zahlen mit größer werdender Probtiefe. Hierbei waren die Unterschiede innerhalb der CAP-Gruppe nicht signifikant ($p > 0,05$). Für CHX unterschieden sich die Resultate zwischen 0 - 300 und 600 - 900 μm statistisch signifikant voneinander (4,52 vs. 4,90 log CFU / ml; $p < 0,05$) (143).

Abu-Sirhan S & Hertel M, Preissner S, Wirtz H, Herbst S, Pierdzioch P, Raguse JD, Hartwig S. Bactericidal efficacy of cold plasma in processed bone. A new approach for adjuvant therapy of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw? *Clinical Plasma Medicine*. 2015.

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

2.2 Antibakterielle Wirkung auf Implantatoberflächen *in vitro*

Periimplantäre Entzündungen sind mit der Bildung von Biofilmen auf Oberflächen von dentalen Implantaten und Suprakonstruktionen aus Metallen bzw. Legierungen, Keramiken und Polymeren assoziiert. Die Biofilmmakkumulation fördernde Faktoren, wie z. B. das Verbleiben von Zementresten im periimplantären Sulkus, können den zugrunde liegenden Pathomechanismus induzieren bzw. unterhalten (144). Die involvierten Pathogene initiieren hierbei eine inflammatorische Reaktion der periimplantären Mucosa ohne (periimplantäre Mucositis) oder mit Beteiligung des angrenzenden Kieferknochens (Periimplantitis). Hierauf basierend implizieren sowohl die konservative, als auch die chirurgische (resektive oder regenerative) Therapie der periimplantären Entzündungen die Zerstörung von Biofilmen (5). Eine vorangegangene experimentelle Studie zeigte hierbei, dass orale *Ex-vivo*-Biofilme auf Probekörpern aus mikrorauem Titan mit CAP zerstört und durch den zusätzlichen Einsatz eines Aerosols entfernt werden können (74). Zudem konnte *in vitro* eine Verbesserung der Benetzbarkeit von Titanoberflächen sowie der Anheftung und des Wachstums von Fibroblasten und Osteoblasten durch CAP gezeigt werden (53, 145, 146). Im Hundemodell wurde ferner eine signifikant größere Kontaktfläche zwischen Knochen und Implantat sechs Wochen nach Applikation von CAP im Vergleich zu unbestrahlten Titanimplantaten beschrieben (147). Diese Ergebnisse zeigen ein Potenzial innerhalb der regenerativen Periimplantitistherapie. Allerdings kann angenommen werden, dass die Effektivität der Dekontamination von Implantaten durch ihre komplexe Morphologie im Vergleich zu einfachen Probekörpern reduziert ist. Vor diesem Hintergrund wurde eine Untersuchung zur Wirkung von CAP auf artifizielle *S. mitis*-Biofilme auf mikrorauen dentalen Titanimplantaten durchgeführt. Die Ergebnisse der zugrunde liegenden *In-vitro*-Studie wurden im „Journal of Biophotonics“ publiziert. Unabhängig von der Expositionszeit von 60 und 120 s fanden sich für CAP statistisch signifikant kleinere CFU-Zahlen im Vergleich zur Negativkontrolle (2,19 bzw. 2,20 vs. 3,29 log CFU / ml; $p < 0,05$; Mann-Whitney U Test). Hingegen unterschieden sich die Ergebnisse des Diodenlasers und der Kontrolle nicht signifikant ($p > 0,05$). Für CAP und DL wurden log RFs von 2,21 bzw. 1,93 und 0,59 ermittelt (148).

Preissner S & Wirtz HC, Tietz AK, Abu-Sirhan S, Herbst SR, Hartwig S, Pierdzioch P, Schmidt-Westhausen AM, Dommisch H, Hertel M. Bactericidal efficacy of tissue tolerable plasma on microrough titanium dental implants: An in-vitro-study. *Journal of biophotonics*. 2015.

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

2.3 Antimykotische Wirkung *in vivo*

Etwa 50 % der Bevölkerung sind asymptomatische oropharyngeale Träger fakultativ-pathogener Hefen der Gattung *Candida* (8). Eine Veränderung des lokalen Milieus der Mundhöhle und / oder der Immunkompetenz des Wirts erlauben *Candida*-Spezies jedoch den Übergang vom Kommensalismus zur Pathogenität. Der häufigste Erreger der oralen Candidiasis ist hierbei *C. albicans* gefolgt von einer Vielzahl unterschiedlicher non-*albicans*-Spezies (149). Neben weiteren klinischen Formen manifestiert sich die orale Candidiasis potenziell als sogenannte Prothesenstomatitis (150). Die ausgedehnte Bedeckung der oralen Mucosa durch herausnehmbaren Zahnersatz verändert hierbei das lokale Milieu (u. a. pH-Wert und O₂-Gehalt) und isoliert die prothesenbedeckte Mundschleimhaut weitgehend von der Clearance und antimikrobiellen Wirkung des Speichels. Ferner stellen Mikroporositäten im PMMA ein Keimreservoir dar (151). Als Konsequenz infiziert *Candida* lokalisiert und superfiziell die tegumentale Mucosa. Der Therapiestandard umfasst neben der Restitution des lokalen Milieus und der Kontrolle der Immunkompetenz des Patienten die antimykotische Chemotherapie. Hierbei ergeben sich jedoch potenziell Probleme assoziiert mit reduzierter Empfindlichkeit sowie intrinsischen und erworbenen Resistenzen gegenüber den eingesetzten Antimykotika (152). CAP stellt in diesem Zusammenhang durch die bereits dargestellte antimykotische Wirksamkeit einen vielversprechenden Therapieansatz dar. Zudem wurde ein inhibierender Effekt auf die Adhäsion von *C. albicans* an PMMA-Oberflächen beschrieben (153). Die Ergebnisse einer eigenen klinischen randomisierten doppelt verblindeten Pilotstudie im „Split-Mouth-Design“ zur adjuvanten Therapie der oralen Candidiasis mit CAP waren Gegenstand einer Veröffentlichung im Journal „Mycoses“. Nach dem besten Wissen der Autoren war die betreffende Untersuchung die weltweit erste klinische Humanstudie zur therapeutischen Anwendung von CAP in der Mundhöhle. Der adjuvante Einsatz von CAP führte im Vergleich zur Kontrollseite zu einer signifikant größeren relativen Reduktion der Erytheme zu allen Untersuchungszeitpunkten ab 14 Tage bis zum Ende des Beobachtungszeitraums sechs Wochen nach Therapiebeginn ($p < 0,05$; t-Test) (154).

Preissner S & Kastner I, Schutte E, Hartwig S, Schmidt-Westhausen AM, Paris S, Preissner R, Hertel M.
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.

<http://dx.doi.org/10.1111/myc.12495>

3. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung von CAP auf bzw. in oralen Hart- und Weichgeweben, dentalen Implantaten und PMMA-Prothesen. Es wurde angenommen, dass eine (adjuvante) Bestrahlung mit Plasma im Vergleich zu den jeweiligen Positiv- und Negativkontrollgruppen zu signifikant kleineren CFU-Zahlen im Sinne einer stärkeren Inaktivierung von Bakterien in artifiziellen *In-vitro*-Monospezies- und *Ex-vivo*-Multispezies-Biofilmen führt. Ferner wurde vermutet, dass eine Anwendung von CAP auf der oralen Mucosa und der mit ihr in Kontakt befindlichen Prothesenoberfläche bei Patienten mit oraler Candidiasis in einer beschleunigten Reduktion der erythematösen Fläche im Sinne einer protrahierten Remission resultiert. Die Hypothesen wurden, mit den in der Ergebnisdarstellung und Diskussion der jeweiligen Arbeiten geäußerten Einschränkungen, bestätigt. Hierbei zeigte sich im Einzelnen, dass: **(1)** die Kombination aus SRP + CAP auf kariesfreiem Dentin zu einer Reduktion der CFU-Zahlen von *S. mitis* auf 0 führte. Der Unterschied zu SRP allein und zur Negativkontrolle war signifikant. Bei RCL führte CHX + CAP zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Multispezies-CFUs in Relation zu CHX allein (135). **(2)** In humanen Wurzelkanälen fanden sich für CHX + CAP signifikant weniger CFUs von *E. faecalis* als für CHX allein. Der Unterschied zwischen CHX + CAP und CAP allein war nicht signifikant. Alle aufgeführten Gruppen zeigten signifikant kleinere CFU-Zahlen als die Negativkontrolle (140). Die entsprechend unterschiedlicher Dentinschichten stratifizierte Analyse findet sich im Abschnitt 2.1.2. **(3)** CAP führte in porcinem Alveolarknochen zu signifikant kleineren CFU-Zahlen von *S. mitis* als CHX und die Negativkontrolle. Die Ergebnisse der Stratifizierung anhand verschiedener Probertiefen finden sich im Abschnitt 2.1.3. **(4)** Auf Titanimplantaten zeigten sich unabhängig von der Expositionszeit für CAP statistisch signifikant kleinere CFU-Zahlen von *S. mitis* als für die Negativkontrolle. DL und die Negativkontrolle waren bezüglich der CFU-Zahlen nicht signifikant unterschiedlich (143). **(5)** Die adjuvante Applikation von CAP bei Patienten mit oraler Candidiasis führte im Vergleich zur

Kontrollseite zu einer signifikant größeren relativen Reduktion der Erytheme ab 14 Tage nach Therapiebeginn bis zum Ende des Beobachtungszeitraums (154).

Insgesamt kann aus den Ergebnissen der eigenen *In-vitro*- und *Ex-vivo*-Untersuchungen ein Potenzial von CAP zur Inaktivierung von oralen Mikroorganismen abgeleitet werden. Hierbei deuten die eigenen Ergebnisse und die anderer Arbeitsgruppen an, dass CAP adjuvant, d. h. in Kombination mit mechanischem Debridement und / oder weiteren antimikrobiellen Agenzien, eine stärkere mikrobiozide Wirkung erzielt bzw. Biofilme effektiver zerstört bzw. entfernt werden können als durch Monotherapien (74, 75, 140). Zudem zeigte sich in einigen *In-vitro*-Studien aus dem Bereich der Endodontie keine überlegene Wirksamkeit einer alleinigen Anwendung von CAP im Vergleich zu NaOCl als Therapiestandard (72, 73). Die Heterogenität der Designs der aktuell verfügbaren *In-vitro*- und *Ex-vivo*-Studien in Bezug auf die verwendeten Mikroorganismen, Kulturbedingungen, Plasmaquellen, Bestrahlungsparameter und -Modi (direkt versus indirekt), Analyseverfahren etc. erschwert jedoch die Vergleichbarkeit der Resultate. Die eigenen Ergebnisse beziehen sich auf die direkte Bestrahlung mit dem kINPen Med®. Plasma-Jets sind charakterisiert durch relativ hohe Dosen an ROS / RNS, welche mit dem Gasstrom an den Wirkungsort transportiert werden. Demgegenüber ist dort die Konzentration an Ionen verhältnismäßig klein, da diese außerhalb des elektrischen Feldes schnell rekombinieren. Insbesondere Edelgasplasmen sind zudem reich an UV-Strahlung, wobei beachtet werden muss, dass sich die Photonendosis mit dem Quadrat des Abstands zwischen Quelle und Wirkungsort verkleinert. Durch DBD-Quellen werden lokal vergleichsweise mehr Photonen und Ionen wirksam, da diese unmittelbar am Ort der Exposition emittiert werden. Unabhängig von der Art der Plasmaquelle resultiert bei Applikation zuvor exponierter Medien (indirekte Plasmatherapie) ein um kurzlebige bzw. instabile Radikale, Photonen und das elektromagnetische Feld reduziertes Spektrum biologisch wirksamer Agenzien (60). Trotz der limitierten Vergleichbarkeit entsprechen die dargestellten eigenen Ergebnisse im Sinne eines Nachweises mikrobiozider Eigenschaften von CAP denen der im Abschnitt 1.2.1 zitierten Arbeiten. Ferner finden sich in methodisch weitgehend vergleichbaren Untersuchungen korrespondierende Ergebnisse. In einer *In-vitro*-Studie zeigte sich für

E. coli, *L. casei*, *S. mutans* und *C. albicans* auf humanen Dentinoberflächen eine logarithmische Reduktion der CFU-Zahl von 3 - 4 durch CAP in Relation zur unbehandelten Kontrolle (47). Der in der eigenen Studie ermittelte log RF für CAP gegen *S. mitis*-Biofilme auf Dentin war 3,85 (135). Die Expositionszeit war in der zum Vergleich herangezogenen Untersuchung jedoch mit bis zu 0,9 s / mm² kürzer als in der eigenen (3,0 s / mm²). Zudem wurde kein mechanisches Debridement durchgeführt. Anders als in der eigenen Arbeit wurde ferner für keines der untersuchten Mikroorganismen eine vollständige Inaktivierung in allen Proben erreicht. Ob in den eigenen Versuchen allerdings bei höherer initialer Keimlast noch immer eine Reduktion der CFUs auf 0 erreicht worden wäre, kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet werden.

Basierend auf den Resultaten *in vivo* erscheint eine supportive klinische Anwendung zur Behandlung Biofilm-assoziiierter oraler Erkrankungen erfolgversprechend. Methodisch hochwertige prospektive klinische Studien im Sinne einer Randomisierung, Placebo-Kontrolle und doppelter Verblindung sind zwar verfügbar, weisen mehrheitlich jedoch relativ kleine Patientenzahlen auf bzw. haben den Charakter von Pilotstudien. Daten zum Einfluss einer Behandlung mit CAP auf relevante klinische Outcome-Parameter in größeren Patientenkollektiven fehlen daher aktuell. In analoger Weise gilt dies für die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus *In-vitro*-, *Ex-vivo*- und tierexperimentellen Untersuchungen auf die klinische Situation. Einschränkend kommt hinzu, dass in den meisten Studien, wie auch in der eigenen dargestellten Untersuchung, CAP in Ergänzung des jeweiligen Therapiestandards verwendet wurde. Es liegt nahe, dass dieser Umstand den geltenden Anforderungen an die ethischen Standards klinischer Studien geschuldet ist. Die beschriebenen klinischen Effekte beziehen sich daher in der Regel auf eine adjuvante bzw. supportive Anwendung. Die Wirksamkeit einer alleinigen Plasmatherapie ist daher weitgehend unbekannt. Im Falle positiver Ergebnisse weiterer Pilotstudien könnte die Untersuchung einer solitären CAP-Therapie, situativ sogar unter Implementierung einer Placebo-Kontrolle, in Zukunft ethisch vertretbar sein.

Im Hinblick auf die eigenen Resultate muss betont werden, dass für das Erreichen der Qualitäten Desinfektion oder Sterilisation eine Reduktion der Keimlast um mindestens fünf bzw. auf sechs Log-Stufen erforderlich ist. Mit Ausnahme der Ergebnisse nach Anwendung von SRP + CAP auf kariesfreiem Wurzelzement war die Inaktivierung der untersuchten Mikroorganismen in allen Untersuchungen *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* unvollständig. Hiermit könnte zusammen hängen, dass die Mikrobizidie von CAP in Flüssigkeiten ausgeprägter sein könnte als unter semi-feuchten bzw. trockenen Bedingungen (60). Eine Feuchthaltung des Bestrahlungsareals, z. B. durch Hydrogele, könnte einen positiven Einfluss auf die Wirksamkeit von CAP haben. Diesen Aspekt aufgreifende Studien fehlen jedoch weitgehend, zumal das Vorhandensein eines klinisch messbaren und in zweiter Instanz relevanten Effekts unbekannt ist. Dies könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Trotz der bereits erwähnten methodischen Heterogenität der verfügbaren Studien lassen deren Ergebnisse im Hinblick auf das Verhältnis von stimulierenden zu toxischen Effekten auf Zellen und Gewebe eine, wenn auch eingeschränkte, Zusammenfassung zu. Kurzzeitige Bestrahlung bzw. kleine Dosen hat bzw. haben stimulierende Wirkungen auf Zellproliferation und -Migration sowie die Induktion von DNA-Reparaturmechanismen. Hingegen führt bzw. führen langdauernde Exposition bzw. hohe Dosen zu zytotoxischen Effekten wie DNA-Schäden, Arretierung des Zellzyklus, Inhibition von Proliferation und Zelltod. Stimulierende Dosen werden daher zur Förderung der Wundheilung appliziert, wohingegen letale Dosen in der antimikrobiellen und Anti-Tumor-Therapie Anwendung finden (14). Bei der Behandlung infizierter Wunden ergeben sich jedoch aus dem dargestellten Prinzip widersprüchliche Anforderungen, da Pathogene inaktiviert, die Zellen des Patienten jedoch stimuliert werden sollen. Aktuell wird hierbei eine niedrigdosierte Bestrahlung mit CAP im allgemeinen Konsens positiv bewertet (14). Die Ergebnisse aus *In-vitro*-Untersuchungen an Pathogenen und eukaryotischen Zellen deuten in diesem Zusammenhang an, dass die Suszeptibilität gegenüber Plasma bei Mikroorganismen größer ist (48). Zudem zeigten diverse Studien, dass ein Teil der Effekte von CAP, insbesondere DNA-Schäden, in eukaryotischen, allerdings auch in prokaryotischen Zellen reversibel sind (14, 80, 82, 90). Zuletzt sind Zellverbände verglichen mit einzelnen Zellen weniger empfindlich

gegenüber CAP (79). Hierauf basierend kann postuliert werden, dass potenzielle negative Effekte in soliden Geweben in Relation zu Pathogenen erst bei höheren Dosen auftreten.

Dem vermeintlich simplen Prinzip der Dosis-Wirkungs-Relation steht jedoch die aktuell ungelöste Problematik der Dosimetrie und Dosisfindung gegenüber. Die Definition eines Dosisbegriffs ist per se erschwert durch die komplexe Komposition von CAP und die Breite potenzieller sekundärer Effekte mit biologischer Wirksamkeit. Seit 2014 existieren in Deutschland „Allgemeine Anforderungen an medizinische Plasmaquellen“ (DIN SPEC 91315). Hierin werden u. a. Testmethoden zur Prüfung der Eignung von Systemen für medizinische Anwendungen empfohlen. Allerdings fehlen weitgehend international gültige Normen zu technischen Spezifikationen sowie zur Quantifizierung der Erzeugung von Radikalen und Emission von UV-Strahlung (14). Weitere Studien mit dem Ziel der Klärung der physikalischen, chemischen und biologischen Implikationen der Wirkungen von CAP könnten der Etablierung entsprechender Standards den Weg bereiten. Zwischenzeitlich erscheint es praktikabel, die Dosis pauschal über die Expositionszeit zu definieren. Nichtsdestotrotz wird eine solche Simplifizierung der multifaktoriellen Dosis-Effekt-Beziehung von CAP nicht gerecht, sodass eine präzisere Dosiskontrolle erstrebenswert erscheint. Zudem ist festzuhalten, dass der Wirkungsmechanismus von CAP im Detail nicht vollständig geklärt ist. Als gesichert kann gelten, dass der biologische Effekt neben den Eigenschaften der bestrahlten Materie abhängig von den Determinanten der Plasmaquelle und der Dosis ist. Allerdings ist in Anbetracht der komplexen Zusammensetzung von CAP das Verständnis der Wirkung der einzelnen Komponenten auf zelluläre Zielstrukturen noch rudimentär (60). Die alleinige Exposition von *B. subtilis* und *E. coli* mit Photonen und Partikeln nach physikalischer Auftrennung des Plasma zeigte zumindest eine reduzierte Wirksamkeit verglichen mit beiden Komponenten in Kombination (155). Plasmaquellen erzeugen neben ROS und RNS Ozon. Da sich die eingangs dargestellten Effekte von CAP *in vitro* durch ROS (z. B. H₂O₂), jedoch nicht durch Ozon, reproduzieren lassen (79), wird dessen Bedeutung für die therapeutische Wirkung auf Basis der zugrunde liegenden Studien in Frage gestellt (14). Zusätzlich wird im Kontext der Onkologie die lokale Induktion sogenannter „Bystander-Effekte“ durch oxidativen

Stress diskutiert (108). Der Anteil oberflächlicher und intrazellulärer Effekte von CAP an der Inaktivierung von Pathogenen lässt sich ferner aus den aktuell vorhandenen Arbeiten nicht sicher ableiten bzw. wird kontrovers diskutiert (15). Die Resultate einzelner Untersuchungen deuten jedoch an, dass Schäden an Ribonukleinsäuren von Mikroorganismen und Viren eine untergeordnete Bedeutung zukommen könnte (43, 64, 156). Nichtsdestotrotz können basierend auf Daten einer Untersuchung zur Wirkung von CAP auf unterschiedliche potenzielle zelluläre Zielstrukturen multifokale Effekte als Grundlage des Wirkungsmechanismus angenommen werden (56). Nicht zuletzt wurde eine Mutagenität von Plasma auf prokaryotische Zellen beschrieben (157, 158). Hier muss betont werden, dass ein entsprechender Effekt in den zugrunde liegenden Studien intentionell war und folglich auf diesen abzielende physikalische Parameter Anwendung fanden. Trotz eines dosisabhängigen Potenzials für DNA-Schäden wurde bei therapeutischen Dosen keine Dimerisierung der DNA nachgewiesen (48). Dennoch verdeutlichen die Ergebnisse, dass das mutagene Potenzial von Plasmen bedacht und in Zukunft weiter untersucht werden sollte.

Basierend auf der aktuell verfügbaren Literatur unter Einbeziehung der eigenen Untersuchungen stellt CAP einen vielversprechenden Ansatz für unterschiedliche medizinische Indikationen, einschließlich der Behandlung Biofilm-assoziiierter Erkrankungen im oralen Bereich, dar. Die Applikation in variabler Fläche bis in den Submillimeterbereich eröffnet hierbei ein breites Anwendungsspektrum (87). Durch die Abwesenheit bekannter Resistenzen könnten hiermit assoziierte Probleme im Rahmen der antimikrobiellen Therapie adressiert werden (35, 42, 44). Zudem könnten regenerative Stimuli die Remission erkrankter Patienten beschleunigen. Da bis dato keine permanenten unerwünschten Effekte beobachtet wurden (27-33), erscheint eine Anwendung am Patienten praktikabel und sicher, wobei einschränkend auf die limitierte klinische Erfahrung hingewiesen werden muss. Insgesamt stellt CAP eine non-invasive, relativ kostengünstige sowie verhältnismäßig wenig apparativ und zeitlich aufwendige Therapieoption dar. Potenzielle Anwendungsgebiete innerhalb der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde sind die Therapie und Prophylaxe von Karies, Plaque-induzierten Gingivitis und marginalen Parodontitiden, periimplantären Entzündungen, MRONJ, die Endodontie und die

Oralmedizin. Derzeit befinden sich speziell für die Zahnmedizin konfigurierte abgewinkelte Systeme in Entwicklung, sind jedoch noch nicht kommerziell verfügbar. Bevor CAP potenziell Einzug in die medizinische und zahnmedizinische Routine halten kann, sind jedoch weitere experimentelle und klinische Untersuchungen zu Wirkungsmechanismen, erwünschten und unerwünschten Wirkungen, Dosimetrie, Dosisfindung und Einfluss auf relevante klinische Outcome-Parameter notwendig.

4. Zusammenfassung

Physikalisches Plasma ist definiert als ein ionisiertes Gas. Somit stellt es den vierten Aggregatzustand dar. Plasmen können artifiziell erzeugt werden, wobei die physikalischen Eigenschaften von kaltem atmosphärischem Plasma eine therapeutische Anwendung am Menschen ermöglichen. Aus der aktuell verfügbaren Literatur kann eine Dosisabhängigkeit des Eintretens und des Ausmaßes bestimmter Effekte auf Mikroorganismen, Viren, eukaryotische Zellen, mammale Gewebe und Tumorzellen abgeleitet werden. Auf zellulärer Ebene lässt sich das Spektrum potenzieller Wirkungen vereinfacht zusammenfassen als Beeinflussung der Genexpression, Stimulation oder Inhibition von Zellproliferation und -Migration, Alteration von Zelloberflächen, Schädigung von Biomolekülen (insbesondere DNA) und Organellen, Arretierung des Zellzyklus, Apoptose und Zellnekrose mediiert durch Photonen, radikale Sauerstoff- und Stickstoffspezies (14). Der Grundsatz der Dosisabhängigkeit gilt in Analogie für das Auftreten und das Verhältnis erwünschter und unerwünschter Effekte. Welche Wirkungen wiederum erwünscht oder unerwünscht sind, variiert in Abhängigkeit der jeweiligen Indikation. Hierbei kann die biologische Wirkung weitgehend über die physikalischen Determinanten einer Plasmaquelle gesteuert werden. Basierend auf der aktuell verfügbaren Literatur kann innerhalb der antimikrobiellen Therapie, der Wundbehandlung und der Tumorthherapie das Nutzen-Risiko-Verhältnis von kaltem atmosphärischem Plasma in therapeutischen Dosen als positiv bewertet werden. Folglich stellt Plasma einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar.

Vor dem Hintergrund einer potenziellen Anwendung zur Therapie Biofilm-assoziiierter Erkrankungen im oralen Bereich wurde die antimikrobielle Wirkung von kaltem atmosphärischem Plasma allein und in Kombination mit anderen bakteriziden Agenzien an artifiziellen *In-vitro*-Monospezies- (*S. mitis* und *E. faecalis*) und *Ex-vivo*-Multispezies-Biofilmen auf bzw. in oralen Hartgeweben (humanes kariesfreies und kariöses Wurzelentin, humane Wurzelkanäle und porciner Alveolarknochen) und dentalen Titanimplantaten untersucht. Ferner war der Einfluss einer adjuvanten Plasmabestrahlung der oralen Mucosa und Prothesen von Patienten mit oraler Candidiasis auf die Remission der

infektionsassoziierten Erytheme Gegenstand einer klinischen Pilotstudie. *In vitro* und *ex vivo* fanden sich signifikant kleinere Zahlen koloniebildender Einheiten nach Anwendung von: (1) Plasma und Kürettage im Vergleich zur alleinigen Kürettage und der Negativkontrolle auf kariessfreiem Dentin sowie Plasma verglichen mit Chlorhexidin auf kariösem Dentin, (2) Plasma und Chlorhexidin in Relation zu Chlorhexidin allein und der Negativkontrolle in Wurzelkanälen, (3) Plasma im Vergleich zu Chlorhexidin und der Negativkontrolle in Alveolarknochen und (4) Plasma gegenüber der Negativkontrolle auf Implantaten, wobei sich nach Verwendung eines Diodenlasers kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle fand. *In vivo* zeigte sich eine signifikant beschleunigte Remission der Erytheme zu allen Untersuchungszeitpunkten ab der zweiten Woche (5).

Aus den dargestellten Resultaten kann in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen für kaltes atmosphärisches Plasma ein Potenzial zur Inaktivierung oraler Mikroorganismen in Biofilmen abgeleitet werden. Unter Einbeziehung weiterer Studien deutet sich ferner an, dass die mikrobiozide Wirkung und die Destruktion bzw. Entfernung von Biofilmen durch eine Kombination von Plasma mit mechanischem Debridement und / oder anderen antimikrobiellen Chemotherapeutika verstärkt werden kann. Einschränkend ist festzustellen, dass *in vitro* eine Reduktion der Keimzahl um fünf Log-Stufen in Relation zur jeweiligen Negativkontrolle im Sinne einer Desinfektion nicht gefunden wurde. Auch *in vivo* waren nach Abschluss der Therapie partiell *Candida*-Spezies nachweisbar. Basierend auf den dargestellten Resultaten könnte kaltes atmosphärisches Plasma einen Beitrag zur Therapie Biofilm-assoziiierter Erkrankungen im Kontext mikrobieller Resistenzen leisten, da zwar unterschiedliche Pathogene verschieden suszeptibel sind, jedoch bisher keine Resistenzen beschrieben wurden. Zudem wurden nach klinischer Anwendung keine relevanten unerwünschten Wirkungen beobachtet. Nichtsdestotrotz bedarf es vor dem Hintergrund begrenzter Evidenz weiterer, insbesondere klinischer Studien.

5. Literatur

1. Spellberg B, Bartlett J, Wunderink R, Gilbert DN. Novel approaches are needed to develop tomorrow's antibacterial therapies. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2015;191(2):135-40.
2. Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *Journal of dental research*. 2015;94(5):650-8.
3. Eriksen HM. Endodontology--epidemiologic considerations. *Endodontics & dental traumatology*. 1991;7(5):189-95.
4. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*. 1999;4(1):1-6.
5. Smeets R, Henningsen A, Jung O, Heiland M, Hammacher C, Stein JM. Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis--a review. *Head & face medicine*. 2014;10:34.
6. Katsarelis H, Shah NP, Dhariwal DK, Pazianas M. Infection and medication-related osteonecrosis of the jaw. *Journal of dental research*. 2015;94(4):534-9.
7. Leuci S, Martina S, Adamo D, Ruoppo E, Santarelli A, Sorrentino R, et al. Oral Syphilis: a retrospective analysis of 12 cases and a review of the literature. *Oral diseases*. 2013;19(8):738-46.
8. Coronado-Castellote L, Jimenez-Soriano Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *J Clin Exp Dent*. 2013;5(5):e279-86.
9. Gomes CC, Pinto LC, Victor FL, da Silva EA, Ribeiro Ade A, Sarquis MI, et al. Aspergillus in endodontic infection near the maxillary sinus. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*. 2015;81(5):527-32.
10. Balasubramaniam R, Kuperstein AS, Stoopler ET. Update on oral herpes virus infections. *Dental clinics of North America*. 2014;58(2):265-80.
11. Doorbar J. Model systems of human papillomavirus-associated disease. *The Journal of pathology*. 2016;238(2):166-79.
12. Frydenberg A, Starr M. Hand, foot and mouth disease. *Australian family physician*. 2003;32(8):594-5.
13. Brook I. Diagnosis and management of parotitis. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 1992;118(5):469-71.
14. Haertel B, von Woedtke T, Weltmann KD, Lindequist U. Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing. *Biomolecules & therapeutics*. 2014;22(6):477-90.
15. Arjunan KP, Sharma VK, Ptasinska S. Effects of atmospheric pressure plasmas on isolated and cellular DNA-a review. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(2):2971-3016.
16. Isbary G, Shimizu T, Li YF, Stolz W, Thomas HM, Morfill GE, et al. Cold atmospheric plasma devices for medical issues. *Expert review of medical devices*. 2013;10(3):367-77.
17. Castro MG, Araujo CA, Menegaz GL, Silva JP, Nobilo MA, Simamoto Junior PC. Laser and plasma dental soldering techniques applied to Ti-6Al-4V alloy: ultimate tensile strength and finite element analysis. *The Journal of prosthetic dentistry*. 2015;113(5):460-6.
18. Xuereb M, Camilleri J, Attard NJ. Systematic review of current dental implant coating materials and novel coating techniques. *The International journal of prosthodontics*. 2015;28(1):51-9.

19. Southwood LL, Baxter GM. Instrument sterilization, skin preparation, and wound management. *The Veterinary clinics of North America Equine practice*. 1996;12(2):173-94.
20. Delgado LM, Pandit A, Zeugolis DI. Influence of sterilisation methods on collagen-based devices stability and properties. *Expert review of medical devices*. 2014;11(3):305-14.
21. Wu AS, Kalghatgi S, Dobrynin D, Sensenig R, Cerchar E, Podolsky E, et al. Porcine intact and wounded skin responses to atmospheric nonthermal plasma. *The Journal of surgical research*. 2013;179(1):e1-e12.
22. Butler-Manuel S, Lippiatt J, Madhuri TK. Interval debulking surgery following neo-adjuvant chemotherapy for stage IVB ovarian cancer using neutral argon plasma (PlasmaJet). *Gynecologic oncology*. 2014;135(3):622-3.
23. Jansky J, Algwari QT, O'Connell D, Bourdon A. Experimental-Modeling Study of an Atmospheric-Pressure Helium Discharge Propagating in a Thin Dielectric Tube. *Ieee T Plasma Sci*. 2012;40(11):2912-9.
24. Begum A, Laroussi M, Pervez MR. Atmospheric pressure He-air plasma jet: Breakdown process and propagation phenomenon. *Aip Adv*. 2013;3(6).
25. O'Connell D, Cox LJ, Hyland WB, McMahon SJ, Reuter S, Graham WG, et al. Cold atmospheric pressure plasma jet interactions with plasmid DNA. *Applied Physics Letters*. 2011;98(4).
26. Ptasinska S, Bahnev B, Stypczynska A, Bowden M, Mason NJ, Braithwaite NS. DNA strand scission induced by a non-thermal atmospheric pressure plasma jet. *Phys Chem Chem Phys*. 2010;12(28):7779-81.
27. Fluhr JW, Sassning S, Lademann O, Darvin ME, Schanzer S, Kramer A, et al. In vivo skin treatment with tissue-tolerable plasma influences skin physiology and antioxidant profile in human stratum corneum. *Experimental dermatology*. 2012;21(2):130-4.
28. Lademann J, Richter H, Alborova A, Humme D, Patzelt A, Kramer A, et al. Risk assessment of the application of a plasma jet in dermatology. *Journal of biomedical optics*. 2009;14(5):054025.
29. Isbary G, Heinlin J, Shimizu T, Zimmermann JL, Morfill G, Schmidt HU, et al. Successful and safe use of 2 min cold atmospheric argon plasma in chronic wounds: results of a randomized controlled trial. *The British journal of dermatology*. 2012;167(2):404-10.
30. Heinlin J, Zimmermann JL, Zeman F, Bunk W, Isbary G, Landthaler M, et al. Randomized placebo-controlled human pilot study of cold atmospheric argon plasma on skin graft donor sites. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2013;21(6):800-7.
31. Brehmer F, Haenssle HA, Daeschlein G, Ahmed R, Pfeiffer S, Gorlitz A, et al. 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). *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2015;29(1):148-55.
32. Heinlin J, Isbary G, Stolz W, Zeman F, Landthaler M, Morfill G, et al. A randomized two-sided placebo-controlled study on the efficacy and safety of atmospheric non-thermal argon plasma for pruritus. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2013;27(3):324-31.
33. Isbary G, Morfill G, Schmidt HU, Georgi M, Ramrath K, Heinlin J, et al. A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. *The British journal of dermatology*. 2010;163(1):78-82.

34. Wiegand C, Beier O, Horn K, Pfuch A, Tolke T, Hipler UC, et al. Antimicrobial impact of cold atmospheric pressure plasma on medical critical yeasts and bacteria cultures. *Skin pharmacology and physiology*. 2014;27(1):25-35.
35. Klampfl TG, Isbary G, Shimizu T, Li YF, Zimmermann JL, Stolz W, et al. Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest. *Applied and environmental microbiology*. 2012;78(15):5077-82.
36. Maisch T, Shimizu T, Isbary G, Heinlin J, Karrer S, Klampfl TG, et al. Contact-free inactivation of *Candida albicans* biofilms by cold atmospheric air plasma. *Applied and environmental microbiology*. 2012;78(12):4242-7.
37. Rahmi-Verki N, Shapoorzadeh A, Razzaghi-Abyaneh M, Atyabi SM, Shams-Ghahfarokhi M, Jahanshiri Z, et al. Cold atmospheric plasma inhibits the growth of *Candida albicans* by affecting ergosterol biosynthesis and suppresses the fungal virulence factors in vitro. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2015.
38. Matthes R, Jablonowski L, Koban I, Quade A, Hubner NO, Schlueter R, et al. In vitro treatment of *Candida albicans* biofilms on denture base material with volume dielectric barrier discharge plasma (VDBD) compared with common chemical antiseptics. *Clinical oral investigations*. 2015;19(9):2319-26.
39. Ahlfeld B, Li Y, Boulaaba A, Binder A, Schotte U, Zimmermann JL, et al. Inactivation of a foodborne norovirus outbreak strain with nonthermal atmospheric pressure plasma. *mBio*. 2015;6(1).
40. Aboubakr HA, Williams P, Gangal U, Youssef MM, El-Sohaimy SA, Bruggeman PJ, et al. Virucidal effect of cold atmospheric gaseous plasma on feline calicivirus, a surrogate for human norovirus. *Applied and environmental microbiology*. 2015;81(11):3612-22.
41. Wu Y, Liang Y, Wei K, Li W, Yao M, Zhang J, et al. MS2 virus inactivation by atmospheric-pressure cold plasma using different gas carriers and power levels. *Applied and environmental microbiology*. 2015;81(3):996-1002.
42. Han L, Patil S, Keener KM, Cullen PJ, Bourke P. Bacterial inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma: influence of process parameters and effects on cell leakage and DNA. *Journal of applied microbiology*. 2014;116(4):784-94.
43. Kvam E, Davis B, Mondello F, Garner AL. Nonthermal atmospheric plasma rapidly disinfects multidrug-resistant microbes by inducing cell surface damage. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(4):2028-36.
44. Sharkey MA, Chebbi A, McDonnell KA, Staunton C, Dowling DP. Evaluation of the sensitivity of bacterial and yeast cells to cold atmospheric plasma jet treatments. *Biointerphases*. 2015;10(2):029507.
45. Hong YF, Kang JG, Lee HY, Uhm HS, Moon E, Park YH. Sterilization effect of atmospheric plasma on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* endospores. *Letters in applied microbiology*. 2009;48(1):33-7.
46. Kim PY, Kim YS, Koo IG, Jung JC, Kim GJ, Choi MY, et al. Bacterial inactivation of wound infection in a human skin model by liquid-phase discharge plasma. *PloS one*. 2011;6(8):e24104.
47. Rupf S, Lehmann A, Hannig M, Schafer B, Schubert A, Feldmann U, et al. Killing of adherent oral microbes by a non-thermal atmospheric plasma jet. *Journal of medical microbiology*. 2010;59(Pt 2):206-12.
48. Brun P, Brun P, Vono M, Venier P, Tarricone E, Deligianni V, et al. Disinfection of ocular cells and tissues by atmospheric-pressure cold plasma. *PloS one*. 2012;7(3):e33245.

49. Deng XT, Shi JJ, Kong MG. Physical mechanisms of inactivation of *Bacillus subtilis* spores using cold atmospheric plasmas. *Ieee T Plasma Sci.* 2006;34(4):1310-6.
50. Perni S, Shama G, Hobman JL, Lund PA, Kershaw CJ, Hidalgo-Arroyo GA, et al. Probing bactericidal mechanisms induced by cold atmospheric plasmas with *Escherichia coli* mutants. *Applied Physics Letters.* 2007;90(7).
51. Daeschlein G, von Woedtke T, Kindel E, Brandenburg R, Weltmann KD, Junger M. Antibacterial Activity of an Atmospheric Pressure Plasma Jet Against Relevant Wound Pathogens in vitro on a Simulated Wound Environment. *Plasma Process Polym.* 2010;7(3-4):224-30.
52. Li Y, Sun K, Ye G, Liang Y, Pan H, Wang G, et al. Evaluation of Cold Plasma Treatment and Safety in Disinfecting 3-week Root Canal *Enterococcus faecalis* Biofilm In Vitro. *Journal of endodontics.* 2015;41(8):1325-30.
53. Yoo EM, Uhm SH, Kwon JS, Choi HS, Choi EH, Kim KM, et al. The Study on Inhibition of Planktonic Bacterial Growth by Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Jet Treated Surfaces for Dental Application. *Journal of biomedical nanotechnology.* 2015;11(2):334-41.
54. Daeschlein G, Napp M, Lutze S, Arnold A, von Podewils S, Guembel D, et al. Skin and wound decontamination of multidrug-resistant bacteria by cold atmospheric plasma coagulation. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG.* 2015;13(2):143-50.
55. Maisch T, Shimizu T, Li YF, Heinlin J, Karrer S, Morfill G, et al. Decolonisation of MRSA, *S. aureus* and *E. coli* by cold-atmospheric plasma using a porcine skin model in vitro. *PLoS one.* 2012;7(4):e34610.
56. Alkawareek MY, Gorman SP, Graham WG, Gilmore BF. Potential cellular targets and antibacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma. *International journal of antimicrobial agents.* 2014;43(2):154-60.
57. Winter T, Bernhardt J, Winter J, Mader U, Schluter R, Weltmann KD, et al. Common versus noble *Bacillus subtilis* differentially responds to air and argon gas plasma. *Proteomics.* 2013;13(17):2608-21.
58. Lackmann JW, Schneider S, Edengeiser E, Jarzina F, Brinckmann S, Steinborn E, et al. Photons and particles emitted from cold atmospheric-pressure plasma inactivate bacteria and biomolecules independently and synergistically. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society.* 2013;10(89):20130591.
59. Winter T, Winter J, Polak M, Kusch K, Mader U, Sietmann R, et al. Characterization of the global impact of low temperature gas plasma on vegetative microorganisms. *Proteomics.* 2011;11(17):3518-30.
60. Lackmann JW, Bandow JE. Inactivation of microbes and macromolecules by atmospheric-pressure plasma jets. *Applied microbiology and biotechnology.* 2014;98(14):6205-13.
61. Sharma A, Collins G, Pruden A. Differential gene expression in *Escherichia coli* following exposure to nonthermal atmospheric pressure plasma. *Journal of applied microbiology.* 2009;107(5):1440-9.
62. Hwang IS, Lee J, Lee DG. Indole-3-carbinol Generates Reactive Oxygen Species and Induces Apoptosis. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(10):1602-8.
63. Klis FM, de Koster CG, Brul S. A mass spectrometric view of the fungal wall proteome. *Future Microbiol.* 2011;6(8):941-51.
64. Venezia RA, Orrico M, Houston E, Yin SM, Naumova YY. Lethal activity of nonthermal plasma sterilization against microorganisms. *Infection control and hospital epidemiology.* 2008;29(5):430-6.

65. Yasuda H, Miura T, Kurita H, Takashima K, Mizuno A. Biological Evaluation of DNA Damage in Bacteriophages Inactivated by Atmospheric Pressure Cold Plasma. *Plasma Process Polym.* 2010;7(3-4):301-8.
66. Zimmermann J, Dumler K, Shimizu T, Morfill G, Wolf A, Boxhammer V, et al. Effects of cold atmospheric plasmas on adenoviruses in solution. *J Phys D Appl Phys.* 2011;44(50):1-9.
67. Joshi SG, Paff M, Friedman G, Fridman G, Fridman A, Brooks AD. Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic form and biofilms: a biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma. *American journal of infection control.* 2010;38(4):293-301.
68. Alkawareek MY, Algwari QT, Laverty G, Gorman SP, Graham WG, O'Connell D, et al. Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by atmospheric pressure non-thermal plasma. *PLoS one.* 2012;7(8):e44289.
69. Matthes R, Bender C, Schluter R, Koban I, Bussiahn R, Reuter S, et al. Antimicrobial efficacy of two surface barrier discharges with air plasma against in vitro biofilms. *PLoS one.* 2013;8(7):e70462.
70. Ermolaeva SA, Varfolomeev AF, Chernukha MY, Yurov DS, Vasiliev MM, Kaminskaya AA, et al. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *Journal of medical microbiology.* 2011;60(Pt 1):75-83.
71. Fricke K, Koban I, Tresp H, Jablonowski L, Schroder K, Kramer A, et al. Atmospheric pressure plasma: a high-performance tool for the efficient removal of biofilms. *PLoS one.* 2012;7(8):e42539.
72. Ureyen Kaya B, Keceli AD, Guldas HE, Cetin ES, Ozturk T, Oksuz L, et al. Efficacy of endodontic applications of ozone and low-temperature atmospheric pressure plasma on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Letters in applied microbiology.* 2014;58(1):8-15.
73. Schaudinn C, Jaramillo D, Freire MO, Sedghizadeh PP, Nguyen A, Webster P, et al. Evaluation of a nonthermal plasma needle to eliminate ex vivo biofilms in root canals of extracted human teeth. *International endodontic journal.* 2013;46(10):930-7.
74. Rupf S, Idlibi AN, Al Marrawi F, Hannig M, Schubert A, von Mueller L, et al. Removing Biofilms from Microstructured Titanium Ex Vivo: A Novel Approach Using Atmospheric Plasma Technology. *PLoS one.* 2011;6(10).
75. Duske K, Jablonowski L, Koban I, Matthes R, Holtfreter B, Sckell A, et al. Cold atmospheric plasma in combination with mechanical treatment improves osteoblast growth on biofilm covered titanium discs. *Biomaterials.* 2015;52:327-34.
76. Yu Y, Tan M, Chen H, Wu Z, Xu L, Li J, et al. Non-thermal plasma suppresses bacterial colonization on skin wound and promotes wound healing in mice. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban.* 2011;31(3):390-4.
77. Haertel B, Wende K, von Woedtke T, Weltmann KD, Lindequist U. Non-thermal atmospheric-pressure plasma can influence cell adhesion molecules on HaCaT-keratinocytes. *Experimental dermatology.* 2011;20(3):282-4.
78. Haertel B, Hahnel M, Blackert S, Wende K, von Woedtke T, Lindequist U. Surface molecules on HaCaT keratinocytes after interaction with non-thermal atmospheric pressure plasma. *Cell biology international.* 2012;36(12):1217-22.
79. Haertel B, Strassenburg S, Oehmigen K, Wende K, von Woedtke T, Lindequist U. Differential influence of components resulting from atmospheric-pressure plasma on integrin expression of human HaCaT keratinocytes. *BioMed research international.* 2013;2013:761451.

80. Blackert S, Haertel B, Wende K, von Woedtke T, Lindequist U. Influence of non-thermal atmospheric pressure plasma on cellular structures and processes in human keratinocytes (HaCaT). *Journal of dermatological science*. 2013;70(3):173-81.
81. Schmidt A, Wende K, Bekeschus S, Bundscherer L, Barton A, Ottmuller K, et al. Non-thermal plasma treatment is associated with changes in transcriptome of human epithelial skin cells. *Free radical research*. 2013;47(8):577-92.
82. Wende K, Strassenburg S, Haertel B, Harms M, Holtz S, Barton A, et al. Atmospheric pressure plasma jet treatment evokes transient oxidative stress in HaCaT keratinocytes and influences cell physiology. *Cell biology international*. 2014;38(4):412-25.
83. Liebmann J, Scherer J, Bibinov N, Rajasekaran P, Kovacs R, Gesche R, et al. Biological effects of nitric oxide generated by an atmospheric pressure gas-plasma on human skin cells. *Nitric Oxide-Biol Ch*. 2011;24(1):8-16.
84. Kalghatgi S, Friedman G, Fridman A, Clyne AM. Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release. *Annals of biomedical engineering*. 2010;38(3):748-57.
85. Arjunan KP, Friedman G, Fridman A, Clyne AM. Non-thermal dielectric barrier discharge plasma induces angiogenesis through reactive oxygen species. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*. 2012;9(66):147-57.
86. Kalghatgi S, Kelly CM, Cerchar E, Torabi B, Alekseev O, Fridman A, et al. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PloS one*. 2011;6(1):e16270.
87. Kieft IE, Broers JL, Caubet-Hilloutou V, Slaaf DW, Ramaekers FC, Stoffels E. Electric discharge plasmas influence attachment of cultured CHO K1 cells. *Bioelectromagnetics*. 2004;25(5):362-8.
88. Arndt S, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Heinlin J, Li YF, et al. 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):e79325.
89. Kwon JS, Kim YH, Choi EH, Kim CK, Kim KN, Kim KM. Non-thermal atmospheric pressure plasma increased mRNA expression of growth factors in human gingival fibroblasts. *Clinical oral investigations*. 2015.
90. Steinbeck MJ, Chernets N, Zhang J, Kurpad DS, Fridman G, Fridman A, et al. Skeletal cell differentiation is enhanced by atmospheric dielectric barrier discharge plasma treatment. *PloS one*. 2013;8(12):e82143.
91. Haertel B, Volkman F, von Woedtke T, Lindequist U. Differential sensitivity of lymphocyte subpopulations to non-thermal atmospheric-pressure plasma. *Immunobiology*. 2012;217(6):628-33.
92. Bekeschus S, Kolata J, Winterbourn C, Kramer A, Turner R, Weltmann KD, et al. Hydrogen peroxide: A central player in physical plasma-induced oxidative stress in human blood cells. *Free radical research*. 2014;48(5):542-9.
93. Bekeschus S, Schmidt A, Bethge L, Masur K, von Woedtke T, Hasse S, et al. Redox Stimulation of Human THP-1 Monocytes in Response to Cold Physical Plasma. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016;2016:5910695.
94. Bundscherer L, Wende K, Ottmuller K, Barton A, Schmidt A, Bekeschus S, et al. Impact of non-thermal plasma treatment on MAPK signaling pathways of human immune cell lines. *Immunobiology*. 2013;218(10):1248-55.
95. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*. 2002;82(1):47-95.

96. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free radical biology & medicine*. 2010;48(6):749-62.
97. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2000;5(5):415-8.
98. Garcia-Alcantara E, Lopez-Callejas R, Morales-Ramirez PR, Pena-Eguiluz R, Fajardo-Munoz R, Mercado-Cabrera A, et al. Accelerated mice skin acute wound healing in vivo by combined treatment of argon and helium plasma needle. *Archives of medical research*. 2013;44(3):169-77.
99. Isbary G, Morfill G, Zimmermann J, Shimizu T, Stolz W. Cold atmospheric plasma: a successful treatment of lesions in Hailey-Hailey disease. *Archives of dermatology*. 2011;147(4):388-90.
100. Marschewski M, Hirschberg J, Omairi T, Hofft O, Viol W, Emmert S, et al. Electron spectroscopic analysis of the human lipid skin barrier: cold atmospheric plasma-induced changes in lipid composition. *Experimental dermatology*. 2012;21(12):921-5.
101. Helmke A, Hoffmeister D, Mertens N, Emmert S, Schuette J, Viol W. The acidification of lipid film surfaces by non-thermal DBD at atmospheric pressure in air. *New Journal of Physics*. 2009;11.
102. Babington P, Rajjoub K, Canady J, Siu A, Keidar M, Sherman JH. Use of cold atmospheric plasma in the treatment of cancer. *Biointerphases*. 2015;10(2):029403.
103. Metelmann H-R, Nedrelow DS, Seebauer C, Schuster M, von Woedtke T, Weltmann KD, et al. Head and neck cancer treatment and physical plasma. *Clinical Plasma Medicine*. 2015;3(1):17-23.
104. Yan DY, Sherman JH, Cheng XQ, Ratovitski E, Canady J, Keidar M. Controlling plasma stimulated media in cancer treatment application. *Applied Physics Letters*. 2014;105(22).
105. Utsumi F, Kajiyama H, Nakamura K, Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, et al. Effect of Indirect Nonequilibrium Atmospheric Pressure Plasma on Anti-Proliferative Activity against Chronic Chemo-Resistant Ovarian Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *PloS one*. 2013;8(12).
106. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2004;44:239-67.
107. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature reviews Drug discovery*. 2013;12(12):931-47.
108. Hirst AM, Frame FM, Arya M, Maitland NJ, O'Connell D. Low temperature plasmas as emerging cancer therapeutics: the state of play and thoughts for the future. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016.
109. Yoshida T, Goto S, Kawakatsu M, Urata Y, Li TS. Mitochondrial dysfunction, a probable cause of persistent oxidative stress after exposure to ionizing radiation. *Free radical research*. 2012;46(2):147-53.
110. Sangeetha P, Das UN, Koratkar R, Suryaprabha P. Increase in free radical generation and lipid peroxidation following chemotherapy in patients with cancer. *Free radical biology & medicine*. 1990;8(1):15-9.
111. Conklin KA. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integrative cancer therapies*. 2004;3(4):294-300.
112. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature reviews Drug discovery*. 2009;8(7):579-91.
113. Hubenak JR, Zhang Q, Branch CD, Kronowitz SJ. Mechanisms of injury to normal tissue after radiotherapy: a review. *Plastic and reconstructive surgery*. 2014;133(1):49e-56e.

114. Guerrero-Preston R, Ogawa T, Uemura M, Shumulinsky G, Valle BL, Pirini F, et al. Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells. *International journal of molecular medicine*. 2014;34(4):941-6.
115. Wang M, Holmes B, Cheng X, Zhu W, Keidar M, Zhang LG. Cold atmospheric plasma for selectively ablating metastatic breast cancer cells. *PloS one*. 2013;8(9):e73741.
116. Weiss M, Gumbel D, Hanschmann EM, Mandelkow R, Gelbrich N, Zimmermann U, et al. Cold Atmospheric Plasma Treatment Induces Anti-Proliferative Effects in Prostate Cancer Cells by Redox and Apoptotic Signaling Pathways. *PloS one*. 2015;10(7):e0130350.
117. Kang SU, Cho JH, Chang JW, Shin YS, Kim KI, Park JK, et al. Nonthermal plasma induces head and neck cancer cell death: the potential involvement of mitogen-activated protein kinase-dependent mitochondrial reactive oxygen species. *Cell death & disease*. 2014;5:e1056.
118. Hirst D, Robson T. Targeting nitric oxide for cancer therapy. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2007;59(1):3-13.
119. Partecke LI, Evert K, Haugk J, Doering F, Normann L, Diedrich S, et al. Tissue tolerable plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *BMC cancer*. 2012;12:473.
120. Vandamme M, Robert E, Lerondel S, Sarron V, Ries D, Dozias S, et al. ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. *International journal of cancer*. 2012;130(9):2185-94.
121. Nakai N, Fujita R, Kawano F, Takahashi K, Ohira T, Shibaguchi T, et al. Retardation of C2C12 myoblast cell proliferation by exposure to low-temperature atmospheric plasma. *The journal of physiological sciences : JPS*. 2014;64(5):365-75.
122. Chang JW, Kang SU, Shin YS, Kim KI, Seo SJ, Yang SS, et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma induces apoptosis in oral cavity squamous cell carcinoma: Involvement of DNA-damage-triggering sub-G(1) arrest via the ATM/p53 pathway. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014;545:133-40.
123. Ma Y, Ha CS, Hwang SW, Lee HJ, Kim GC, Lee KW, et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma preferentially induces apoptosis in p53-mutated cancer cells by activating ROS stress-response pathways. *PloS one*. 2014;9(4):e91947.
124. Siu A, Volotskova O, Cheng X, Khalsa SS, Bian K, Murad F, et al. Differential Effects of Cold Atmospheric Plasma in the Treatment of Malignant Glioma. *PloS one*. 2015;10(6):e0126313.
125. Ishaq M, Evans MD, Ostrikov KK. Atmospheric pressure gas plasma-induced colorectal cancer cell death is mediated by Nox2-ASK1 apoptosis pathways and oxidative stress is mitigated by Srx-Nrf2 anti-oxidant system. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1843(12):2827-37.
126. Ishaq M, Kumar S, Varinli H, Han ZJ, Rider AE, Evans MD, et al. Atmospheric gas plasma-induced ROS production activates TNF-ASK1 pathway for the induction of melanoma cancer cell apoptosis. *Molecular biology of the cell*. 2014;25(9):1523-31.
127. Hirst AM, Simms MS, Mann VM, Maitland NJ, O'Connell D, Frame FM. Low-temperature plasma treatment induces DNA damage leading to necrotic cell death in primary prostate epithelial cells. *British journal of cancer*. 2015;112(9):1536-45.
128. Brulle L, Vandamme M, Ries D, Martel E, Robert E, Lerondel S, et al. Effects of a non thermal plasma treatment alone or in combination with gemcitabine in a MIA PaCa2-luc orthotopic pancreatic carcinoma model. *PloS one*. 2012;7(12):e52653.
129. Cheng XQ, Murphy W, Recek N, Yan DY, Cvelbar U, Vesel A, et al. Synergistic effect of gold nanoparticles and cold plasma on glioblastoma cancer therapy. *J Phys D Appl Phys*. 2014;47(33).

130. Cheng XQ, Rajjoub K, Sherman J, Canady J, Recek N, Yan DY, et al. Cold Plasma Accelerates the Uptake of Gold Nanoparticles Into Glioblastoma Cells. *Plasma Process Polym.* 2015;12(12):1364-9.
131. Koritzer J, Boxhammer V, Schafer A, Shimizu T, Klampfl TG, Li YF, et al. Restoration of sensitivity in chemo-resistant glioma cells by cold atmospheric plasma. *PLoS one.* 2013;8(5):e64498.
132. Yang H, Lu R, Xian Y, Gan L, Lu X, Yang X. Effects of atmospheric pressure cold plasma on human hepatocarcinoma cell and its 5-fluorouracil resistant cell line. *Phys Plasmas.* 2015;22(12).
133. Schwendicke F. Modern Concepts for Caries Tissue Removal. *Journal of esthetic and restorative dentistry : official publication of the American Academy of Esthetic Dentistry [et al].* 2016.
134. Paris S, Meyer-Lueckel H. The potential for resin infiltration technique in dental practice. *Dental update.* 2012;39(9):623-6, 8.
135. Pierdzioch P, Hartwig S, Herbst SR, Raguse JD, Dommisch H, Abu-Sirhan S, et al. Cold plasma: a novel approach to treat infected dentin-a combined ex vivo and in vitro study. *Clinical oral investigations.* 2016.
136. Chavez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *Journal of endodontics.* 2007;33(6):652-62.
137. Rahimi S, Janani M, Lotfi M, Shahi S, Aghbali A, Vahid Pakdel M, et al. A review of antibacterial agents in endodontic treatment. *Iranian endodontic journal.* 2014;9(3):161-8.
138. Mozo S, Llena C, Forner L. Review of ultrasonic irrigation in endodontics: increasing action of irrigating solutions. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal.* 2012;17(3):e512-6.
139. Misuriya A, Bhardwaj A, Bhardwaj A, Aggrawal S, Kumar PP, Gajjarepu S. A comparative antimicrobial analysis of various root canal irrigating solutions on endodontic pathogens: an in vitro study. *The journal of contemporary dental practice.* 2014;15(2):153-60.
140. Herbst SR, Hertel M, Ballout H, Pierdzioch P, Weltmann KD, Wirtz HC, et al. Bactericidal Efficacy of Cold Plasma at Different Depths of Infected Root Canals In Vitro. *The open dentistry journal.* 2015;9:486-91.
141. Aghaloo T, Hazboun R, Tetradis S. Pathophysiology of Osteonecrosis of the Jaws. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America.* 2015;27(4):489-96.
142. Williams WB, O'Ryan F. Management of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America.* 2015;27(4):517-25.
143. Abu-Sirhan S, Hertel M, Preissner S, Wirtz H, Herbst S, Pierdzioch P, et al. Bactericidal efficacy of cold plasma in processed bone. A new approach for adjuvant therapy of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw? *Clinical Plasma Medicine.* 2015.
144. Pesce P, Canullo L, Grusovin MG, de Bruyn H, Cosyn J, Pera P. Systematic review of some prosthetic risk factors for periimplantitis. *The Journal of prosthetic dentistry.* 2015;114(3):346-50.
145. Lee JH, Kim YH, Choi EH, Kim KM, Kim KN. 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 odontologica Scandinavica.* 2015;73(1):67-75.
146. Kawase T, Tanaka T, Minbu H, Kamiya M, Oda M, Hara T. An atmospheric-pressure plasma-treated titanium surface potentially supports initial cell adhesion, growth, and differentiation of cultured human prenatal-derived osteoblastic cells. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials.* 2014;102(6):1289-96.

147. Danna NR, Beutel BG, Tovar N, Witek L, Marin C, Bonfante EA, et al. Assessment of Atmospheric Pressure Plasma Treatment for Implant Osseointegration. *BioMed research international*. 2015;2015:761718.
148. Preissner S, Wirtz HC, Tietz AK, Abu-Sirhan S, Herbst SR, Hartwig S, et al. Bactericidal efficacy of tissue tolerable plasma on microrough titanium dental implants: An in-vitro-study. *Journal of biophotonics*. 2015.
149. Hertel M, Schmidt-Westhausen AM, Strietzel FP. Local, systemic, demographic, and health-related factors influencing pathogenic yeast spectrum and antifungal drug administration frequency in oral candidiasis: a retrospective study. *Clinical oral investigations*. 2015.
150. Lalla RV, Patton LL, Dongari-Bagtzoglou A. Oral candidiasis: pathogenesis, clinical presentation, diagnosis and treatment strategies. *Journal of the California Dental Association*. 2013;41(4):263-8.
151. Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of Candida-associated denture stomatitis: new insights. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2008;16(2):86-94.
152. Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology / the Society of the Nippon Dental University*. 2010;98(1):15-25.
153. Pan H, Wang G, Pan J, Ye G, Sun K, Zhang J, et al. Cold plasma-induced surface modification of heat-polymerized acrylic resin and prevention of early adherence of *Candida albicans*. *Dental materials journal*. 2015;34(4):529-36.
154. Preissner S, Kastner I, Schutte E, Hartwig S, Schmidt-Westhausen AM, Paris S, et al. 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.
155. Schneider S, Lackmann JW, Narberhaus F, Bandow JE, Denis B, Benedikt J. Separation of VUV/UV photons and reactive particles in the effluent of a He/O-2 atmospheric pressure plasma jet. *J Phys D Appl Phys*. 2011;44(29).
156. Tseng S, Abramzon N, Jackson JO, Lin WJ. Gas discharge plasmas are effective in inactivating *Bacillus* and *Clostridium* spores. *Applied microbiology and biotechnology*. 2012;93(6):2563-70.
157. Wang LY, Huang ZL, Li G, Zhao HX, Xing XH, Sun WT, et al. Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma. *Journal of applied microbiology*. 2010;108(3):851-8.
158. Fang M, Jin L, Zhang C, Tan Y, Jiang P, Ge N, et al. Rapid mutation of *Spirulina platensis* by a new mutagenesis system of atmospheric and room temperature plasmas (ARTP) and generation of a mutant library with diverse phenotypes. *PloS one*. 2013;8(10):e77046.

Danksagung

Mein erster und besonderer Dank gilt meiner lieben Chefin und Mentorin

Frau Prof. Dr. Andrea Maria Schmidt-Westhausen.

Sie haben mir Umfeld, Mittel und Freiheiten ermöglicht, ohne welche die vorliegende Arbeit und meine bisherige fachliche und wissenschaftliche Karriere nicht möglich gewesen wären. Zudem waren Sie mir zu jeder Zeit moralische Instanz und Unterstützung. Ich hoffe sehr, diese Gunst einmal wenigstens in Teilen aufwiegen zu können.

Mein besonderer Dank gilt zudem meiner sehr geschätzten Kollegin und guten Freundin

Frau PD Dr. Saskia Preißner.

Du warst mir in meiner wissenschaftlichen Arbeit stets Vorbild, Inspiration und unschätzbare Hilfe. Ohne dich hätte ich den Weg, der im Ergebnis zu der vorliegenden Arbeit geführt hat, nicht eingeschlagen.

Herzlich bedanken möchte ich mich ferner bei

Herrn PD Dr. Frank-Peter Strietzel.

Neben der wertvollen Zusammenarbeit bei gemeinsamen Forschungsprojekten durfte ich von Ihnen sämtlich meine chirurgischen Fertigkeiten erlernen. Sie haben meine praktische und wissenschaftliche Arbeit über alle Maße geprägt.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen, mit denen ich gemeinsame Forschungsprojekte erfolgreich verwirklichen durfte. Besonders benennen möchte ich

Herrn Dr. Stefan Hartwig, Herrn ZA Husam Ballout, Frau ZÄ Anne-Kristin Tietz, Herrn Dr. Eckehard Kostka, Herrn PD Dr. Wolf-Dieter Müller, Herrn Prof. Dr. Sebastian Paris, Herrn Prof. Dr. Henrik Dommisch, Herrn PD Dr. Dr. Jan-Dirk Raguse, Frau PD Dr. Annette Moter, Herrn Prof. Dr. Peter Reichart, Herrn Prof. Dr. Michael Bornstein, Herrn Dr. Konrad Neumann, Herrn ZA Eyke Schütte, Herrn PD Dr. Robert Preißner, Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Weltmann, Herrn PD Dr. Michael Laule, Herrn Dr. Spiros Zinelis, Herrn Dr. Bernhard Gillissen, Herrn Dr. Herbert Renz, Herrn Dr. Fabian Lübke, Herrn Prof. Dr. Dr. Bodo Hoffmeister und alle Doktorandinnen und Doktoranden.

Danke!

Nicht zuletzt danke ich

meiner Familie, zu der ich Sandra Maria und Familie Imiolczyk zähle, und meinen lieben Freunden.

Ihr wart trotz meiner körperlichen und geistigen Abwesenheit im Zuge meiner wissenschaftlichen Arbeit mein unerschütterliches Fundament. Hierfür kann ich euch nicht genug danken. Euch widme ich die vorliegende Arbeit.

Erklärung

gem. § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Berlin, den 25.07.2016

Dr. Moritz Hertel