

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

DISSERTATION

Untersuchung neuer Methoden zur Dekontamination komplexer oraler
Strukturen im Rahmen der parodontalen Regeneration

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Henrik Carl Benjamin Wirtz

aus Würzburg

Datum der Promotion: 16.6.2018

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	3
1.1. Abstract deutsch	3
1.2. Abstract english	4
2. Einführung	4
2.1. Parodontitis und Periimplantitis	4
2.2. Behandlung parodontaler und periimplantärer Entzündungen	6
2.3. Probleme bei der parodontalen Heilung	8
2.4. Anwendung von kaltem Plasma in der Wundheilung	8
2.5. Zielstellung	9
3. Methodik	10
3.1. Herstellung komplexer Oberflächenstrukturmodelle	10
3.2. Monospezies-Biofilme und <i>ex vivo</i> Ansätze	10
3.3. Dekontaminationsprotokolle	11
3.4. Probengewinnung	12
3.5. Auswertungsstrategien	13
4. Ergebnisse	13
4.1. Implantatstrukturen	13
4.2. Kavitierte und nicht-kavitierte Dentinoberflächen	14
4.3. Knochenoberflächen	14
5. Diskussion	15
5.1. Bewertung der Ergebnisse	15
5.2. Kritische Betrachtung der Strukturmodelle	16
5.3. Konsequenzen für die Klinik	17
5.4. Ausblick / Fazit	18
Literaturverzeichnis	19
Eidesstattliche Versicherung	23
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	26
Lebenslauf	47
Publikationsliste	48
Danksagung	49

1. Zusammenfassung

1.1. Abstract deutsch

Die aktuelle Parodontitis- und Periimplantitistherapie setzt den Fokus auf die mechanische Dekontamination der Wurzel- bzw. Implantatoberfläche. Mit Hilfe der gesteuerten Geweberegeneration kann die Regeneration des angrenzenden Alveolarknochens gefördert werden. Kaltes Plasma (CAP) zeigt bei der Behandlung von chronischen Wunden eine dekontaminierende und heilungsstimulierende Wirkung. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, wie sich der bakterizide Effekt des CAP, auf die bei einer Periimplantitis und Parodontitis vorhandenen Gewebe auswirkt, und so der Frage nachgegangen werden, ob CAP als ein neuer Therapieansatz weiterzuverfolgen sei.

In der ersten Studie wurde die Wirkung von CAP auf kontaminierte dentale Implantate untersucht. Hierzu wurden die Implantate mit dem Modellkeim *Streptococcus mitis* (*S. mitis*) infiziert, und anschließend mit CAP oder dem Diodenlaser als Vergleichsgruppe, neben einer Kontrollgruppe, behandelt. Im Anschluss erfolgte die Quantifizierung vitaler Bakterien nach standardisiertem Ablösen von der Implantatoberfläche. Beide CAP Gruppen (60 s und 120 s) erreichten eine signifikante Keimreduktion, die Laserbehandlung reduzierte die Keimzahl nicht signifikant.

Die zweite Studie diente der Untersuchung infizierten Knochens. Aufbereiteter, porciner Knochen wurde mit *S. mitis* inkubiert und anschließend von der Oberfläche mit CAP oder Chlorhexidindigluconat (CHX) parallel zu einer Kontrollgruppe behandelt. Es wurden dann von der Oberfläche in die Tiefe drei Schichten unterschieden und die vitalen Bakterien jeweils quantifiziert. Über alle Schichten gesehen zeigte CAP eine signifikante Keimreduktion gegenüber der Kontroll- sowie CHX-Gruppe.

Dentinoberflächen wurden in einer dritten Studie untersucht. In einem *ex vivo* Ansatz wurden extrahierte, kariöse Zähne halbiert, sodass kongruente Läsionen entstanden, wobei jeweils eine Hälfte 60 s mit CAP und die andere Hälfte mit 1 % CHX Gel behandelt wurde. Die CAP Gruppe wies signifikant niedrigere Keimzahlen auf.

Die bakterizide Wirkung von CAP auf die untersuchten Gewebe wurde in den Studien bestätigt, wobei in Zukunft *in vivo* Studien notwendig sind, um das Potenzial von CAP als mögliche Therapieoption der Parodontitis und Periimplantitis abschätzen zu können.

1.2. Abstract english

The current therapy of periodontitis and periimplantitis is focused on the mechanical debridement of the roots or implants surface. With the help of guided tissue regeneration (GTR), the regeneration of the adjoining alveolar bone can be encouraged. Cold atmospheric plasma (CAP) has proven to have a decontaminating and inducive healing effect in the treatment of chronic wounds. The aim of the present study was therefore to investigate the bactericidal effect of CAP on the tissues involved in periodontitis and periimplantitis, so to study the question of whether CAP might be a new therapeutical approach.

In the first study, the effect of CAP on contaminated implants was investigated. For this purpose the implants had been infected with *Streptococcus mitis* (*S. mitis*) and subsequently treated with either CAP or a diode laser as a comparison group, outside a control group. The following quantification was founded by a standardised gathering of viable bacteria from the implants surface. Both CAP groups (60 s and 120 s) resulted in a significant germ reduction, whereby the laser treatment had not reduce the germ amount significantly.

The purpose of the second study, was to investigate the influence on infected bone. Processed, porcine bone was incubated with *S. mitis* and subsequently treated with either CAP or chlorhexidine gluconate (CHX); whereby a control group was performed. The bone block was separated into three layers, and the viable bacteria were quantified. Throughout all layers the CAP resulted in a significant germ reduction in comparison to the control and CHX groups.

Dentin surfaces have been examined in the third study. In a *ex vivo* approach, extracted and decayed teeth were cut in half so that two congruent lesions were obtained. One was treated with CAP for 60 s and the other half with 1 % CHX gel. The CAP group showed significantly less amounts of germs.

Within the limits of the present studies, the bactericidal effect of CAP on the examined tissues could be proven. There are further *in vivo* studies necessary to evaluate the possible use of CAP as a therapeutical option in the treatment of periimplantitis and periodontitis.

2. Einführung

2.1. Parodontitis und Periimplantitis

Die marginale Parodontitis ist definitionsgemäß eine bakteriell verursachte Entzündung des Zahnhalteapparates, die mit entzündungsbedingtem Alveolarknochenabbau einhergeht. Grundvoraussetzung für ihre Entstehung ist

die Anwesenheit eines Biofilms. In der Vergangenheit wurden zahlreiche Modelle zur Pathogenese der Parodontitis aufgestellt und überarbeitet. Die Entwicklung ging dabei von einem anfangs monokausalem, auf die Pathogenität der anwesenden Bakterien beschränktem, zu einem multifaktoriellen Erklärungsansatz über [1, 2]. Es wurde festgestellt, dass das Vorkommen von parodontalpathogenen Bakterien keinesfalls mit dem Vorliegen einer Parodontitis gleichzusetzen ist [2]. Die Existenz von spezifischen parodontalpathogenen Keimen wurde jedoch in zahlreichen Studien belegt. Die Prävalenz bestimmter Bakterien (*P.gingivalis* (*P.g.*), *T.forsythia* (*T.f.*), *P.intermedia* (*P.i.*), *C.rectus*) im subgingivalen Biofilm ist in parodontal erkrankten Taschen wesentlich größer, als in parodontal gesunden [3, 4]. Zudem existieren zahlreiche Erkenntnisse über ihre spezifischen Virulenzfaktoren [5, 6]. Bei der Betrachtung der Pathogenese der Parodontitis ist es jedoch essenziell, die individuellen Wirts- und Risikofaktoren (Genetik, Stress, Soz. Umfeld, Gewohnheiten wie Rauchen, Alkoholkonsum) einzubeziehen. Diese modulieren auf unterschiedlichsten Wegen die Immunantwort [2].

Analog der Parodontitis sind es auch Bakterien in Form von Biofilmen, welche zu den am häufigsten an Zahnimplantaten beobachteten Komplikationen, der periimplantären Mukositis und Periimplantitis, führen [7]. Setzt man korrekte Planung und Ausführung der Implantation durch den Arzt voraus, und sucht nach verbleibenden Risikofaktoren, so findet man zuerst unzureichende Mundhygiene [7]. Es existiert begrenzte Evidenz dafür, dass die Erkrankung des Patienten mit Parodontitis in der Vergangenheit mit häufigerem Auftreten einer Periimplantitis einhergeht und nur unzureichend belegt ist die Assoziation mit Tabakrauchen [8]. Inwieweit sich das Keimspektrum von gesunden, im Vergleich zu von Periimplantitis befallenen Zahnflächen unterscheidet, lässt sich bisher aufgrund fehlender prospektiver Langzeitstudien nicht abschließend klären. Der Ansatz, dass bestimmte Mikroorganismen, wie die des roten Komplexes bei der Parodontitis, auch bei der Periimplantitis den Wechsel von einer benignen zu einer pathogenen und opportunistische Keime fördernden Flora des Biofilms begünstigen, lässt sich nicht abschließend belegen. Aktuelle Studien zeigen dazu vor allem eine Verschiebung der Zusammensetzung des Biofilms hin zu gramnegativen, anaeroben (*P.g.*, *P.i.*, *T.f.*, *F.nucleatum*), nicht-saccharolytischen Bakterien, wobei sich deren Quantität erhöht [9-11]. Der Gehalt an Entzündungsparametern im Sulkusfluid von Implantaten beim Vorliegen einer Periimplantitis im Vergleich zu dem von gesunden Verhältnissen scheint sich nicht zu unterscheiden, wohingegen er sich beim Vorliegen einer Parodontitis im Vergleich zu gesunden Verhältnissen des Parodonts erhöht [12]. Eine

pathogene Rolle von Viren (insbesondere HCMV-2, EBV-1) scheint möglich, die Studienlage ist jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausreichend [13, 14].

Inzwischen sind einige Genpolymorphismen beschrieben, die mit einem erhöhten Risiko für aggressive und/oder chronische Parodontitis einhergehen [15, 16].

2.2. Behandlung parodontaler und periimplantärer Entzündungen

Die Therapie der nach der heute gültigen Klassifikation von Parodontalerkrankungen unter Parodontitis verstandenen Krankheitsbilder sowie der Periimplantitis, hat die Entfernung/Reduktion des supra- und subgingivalen Biofilms zum Ziel [17, 18]. Während bei der Parodontitis ein weitverbreitetes, einheitliches Therapieverfahren existiert, sind die Therapieverfahren der Periimplantitis zahlreich und ihr Erfolg ist wenig vorhersehbar [19].

Bei der Parodontistherapie erfolgt nach gründlicher Anamnese, Diagnostik, Erfassung systemischer Grunderkrankungen, Diagnosestellung und eventueller Notfalltherapie die kausale Therapie (antiinfektiöse Maßnahmen). Korrektive Maßnahmen im Anschluss sind nach Bedarf zu treffen. Die unterstützende Nachsorgetherapie und Mundhygieneinstruktionen sind jedoch fester Bestandteil jeder Therapie.

In der kausalen Therapie hat sich seit vielen Jahren das Scaling and Rootplaning (SRP) bewährt, welches die mechanische Entfernung aller sub- und supragingivalen harter und weicher Beläge sowie eine Glättung der Wurzeloberfläche zum Ziel hat [18]. Es konnte gezeigt werden, dass die manuelle SRP Therapie positiven Einfluss auf klinische Parameter wie Taschensondierungstiefe, Blutung auf Sondierung sowie Attachmentverlust besitzt [20]. Neben dem manuellen SRP kann das Debridement unterstützt werden durch Ultraschall sowie Laser-Therapie. Der bakterizide Effekt der Lasersysteme beruht auf der thermischen Denaturierung sowie Verdampfung intrazellulärer Flüssigkeit und damit einhergehender Zerstörung der Bakterien des Biofilms.

In der teilweise erforderlichen korrektiven Phase kommen zahlreiche chirurgische Verfahren bei bestehenden Resttaschen, im Anschluss an die SRP-Therapie zur Anwendung. Bei unzuverlässigen Patienten zeigen diese im Vergleich zum SRP jedoch höhere Rezidivraten [21].

Bei der periimplantären Mukositis, bei welcher es zu keinem infektiös bedingten Knochenabbau kommt, ist ausschließlich eine konservative Behandlung mit dem Ziel der Plaqueentfernung und der Prävention einer Periimplantitis indiziert [19].

Die Therapie der Periimplantitis kann konservativ oder chirurgisch erfolgen. Die Verfahren der konservativen Therapie sind zahlreich und zielen auf die Reinigung und/oder Desinfektion der Implantatoberfläche ab.

Im konservativen Rahmen steht die mechanische Reinigung im Vordergrund, welche im Vergleich zum natürlichen Zahn beim Implantat deutlich erschwert ist. Zum einen ist die Zugänglichkeit durch die Gewindestruktur der Implantate eingeschränkt und zum anderen bietet die Mikrostruktur der Implantate optimale Voraussetzungen zur Biofilmanlagerung [22]. Um die Mikrostruktur und somit die Biokompatibilität der Implantatoberfläche zu erhalten, kommen Küretten oder Ultraschallspitzen aus Kunststoff oder Karbon in Verbindung mit CHX Spülung zum Einsatz [23]. Die Verwendung von Pulverstrahlgeräten (Glyzin, Natriumhydrogencarbonat), entweder mit Aufsätzen zur subgingivalen Applikation oder mittels direkter Bestrahlung nach chirurgischem Eröffnen, zeigen in Studien als Alternative dazu gute, erfolgsversprechende Ergebnisse [24-26]. Jedoch ist bei subgingivaler Applikation der Ansatz der Keimverschleppung sowie das Auftreten von subgingivalen Emphysemen zu diskutieren, wobei aktuelle Studien mit leichteren Pulverstrahlgeräten kein Emphysemauftreten zeigen [26, 27]. Auch ein festes Anhaften des Pulvers an der Implantatoberfläche sowie deren Veränderung wurde beobachtet, was jedoch klinisch wahrscheinlich zu vernachlässigen ist [24].

Bei fortgeschrittenem oder unter konservativer Therapie progredientem Knochenverlust, kann eine chirurgische Therapie indiziert sein, welche resektiv oder regenerativ erfolgen kann [28]. Resektive Verfahren sind bei einwandigen, horizontalen sowie umlaufenden Knochendefekten und aus ästhetischen Gründen nur in nicht einsehbaren Bereichen indiziert [29]. Ziele sind die Reduktion der Taschensondierungstiefen, die Etablierung stabiler Weichgewebsverhältnisse und die Sicherstellung der Mundhygienezugänglichkeit [28]. Zusätzlich sollte hierbei eine Implantoplastik bei Vorliegen eines exponierten Implantatgewindes erfolgen, was gute klinische Ergebnisse zeigt [30].

Regenerative Verfahren kommen bei zwei-, drei- und vierwandigen Knochendefekten in Frage und sind bei prothetisch wichtigen Zähnen sowie hohen ästhetischen Ansprüchen indiziert [29, 31]. Es existieren verschiedenste Materialien, wobei resorbierbare Kollagenmembranen, in Verbindung mit bovinem Knochenmaterial, in Langzeitstudien gleichwertige Überlebensraten von Implantaten, in Kombination mit der geführten Knochen- (GBR) oder Geweberegeneration (GTR), zu Implantatsituationen ohne erforderliche GBR/GTR, zeigen [31, 32]. Sofern alle Therapieverfahren ohne Erfolg bleiben, ist die maximalinvasive Explantation mittels Trepanbohrer oder Zange die letzte Therapieoption.

2.3. Probleme bei der parodontalen Heilung

Grundvoraussetzung für eine parodontale Heilung ist die dekontaminierte und saubere Wurzeloberfläche. Das Parodontium, bestehend aus verschiedenen Gewebsarten (Knochen, Zement, Epithel, Bindegewebe), erfährt nach erfolgter SRP-Therapie vor allem eine Reparatur und partielle Regeneration [33]. Dabei bildet sich im Sinne der Reparatur ein langes, befestigtes Saumepithel an der Wurzeloberfläche, wodurch andere Gewebe wie Knochen vom Besiedeln der Wurzeloberfläche abgehalten werden [34]. Im Zuge der Regeneration bilden sich Gewebe entsprechend der ursprünglichen Anteilen des Parodonts wieder aus. Es gibt verschiedene Überlegungen diesen Anteil zu erhöhen. Zuerst kann das Saumepithel in der GBR und GTR Technik mittels Membranen abgehalten werden, nach apikal zu proliferieren. So bekommen verstärkt Fibroblasten und Zementoblasten die Möglichkeit, die Wurzeloberfläche zu besiedeln [34].

Die Faserstruktur des hierbei gebildeten Parodonts unterscheidet sich jedoch von dem des Ursprünglichen. Auf biomolekularer Ebene gibt es Ansätze ein möglichst original strukturiertes Parodont zu erzielen. Hierzu zählt der Einsatz von den Proteinen PRGF, ILGF, TGF- β , BMP, FGF- β , welche natürlich vor allem in mineralisierten Geweben wie Knochen, Dentin und Wurzelzement aber auch im Blut vorkommen [35]. Sie fördern die Zellmigration, -adhäsion, -differenzierung und -teilung sowie die Produktion von Extrazellulärmatrix, wobei letztlich lokale Wundverhältnisse entscheidend sind [36]. Sie können auf unterschiedlichen Wegen gewonnen werden, z.B. PRGF aus autologem Blut [37], Schmelz-Matrix-Proteine (Emdogain[®]) aus porcinen Zahnkeimen. Zelldifferenzierungseffekte von Amelogenin und Ameloblastin (Emdogain[®]) scheinen jedoch zelltypabhängig unterschiedlich zu wirken [35]. Die Studienlage bezüglich des Attachmentgewinns beim Einsatz von Schmelz-matrix-Proteinen (Emdogain[®]) und GTR ist aufgrund großer Heterogenität der Studien nicht eindeutig [38]. So ist auch das Verständnis der Regeneration des Parodonts nicht abschließend geklärt.

2.4. Anwendung von kaltem Plasma in der Wundheilung

Plasma beschreibt ein gasförmiges Teilchengemisch bestehend aus ionisierten Teilchen, den Ionen und Elektronen sowie, bei nicht vollständigem Ionisationsgrad, neutralen Teilchen. Zusätzlich können durch Anregung umliegender Gase, wie Sauerstoff oder Stickstoff, Radikale gebildet werden. Heißes Argon-Plasma ist in der Chirurgie schon länger zur endoskopischen, kontaktfreien, thermischen Blutstillung und Resektion im Einsatz [39].

Die Wirkung von kaltem (30-40°C) Plasma (Cold Atmospheric Plasma, CAP) ist abhängig vom Ausgangs- und Umgebungsgas, der Expositionszeit und der Erzeugungparameter [40]. Die biologische Wechselwirkung beruht auf der Emission von Elektronen, Ionen, reaktiven Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS), Photonen, elektromagnetischer Strahlung und Wärme [41].

In der Wundtherapie kommen die antimikrobielle und heilungsstimulierende Wirkungen des CAP zum Tragen. Die inaktivierende Wirkung auf humanpathogenen Mikroorganismen (Bakterien, Pilze, Viren) beruht auf verschiedenen Mechanismen, wobei Sie bis heute nicht bis ins letzten Detail geklärt sind [41-44]. ROS und RNS (Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies) scheinen eine Hauptaufgabe bei der Sterilisation einzunehmen [45]. Sie erzeugen einen hohen oxidativen Stress, wodurch es, exemplarisch an *E. coli* nachgewiesen, zur Depolarisation der Zellmembran, DNA Schäden und Lipid Peroxidation und somit zur Membranschädigung kommt [44, 46, 47].

Auf die Membranoberfläche auftreffende, beschleunigte, geladene Teilchen erzeugen kumulativ elektrostatische Kräfte, wodurch es zur Perforation oder zumindest kurzzeitigen Permeabilität kommt, ähnlich der Elektroporation [43, 44]. Diese Wirkung ist verstärkt bei gramnegativen Bakterien beobachtet worden [48].

Resistenzen sind bisher nicht bekannt [44], wobei die Effektivität abhängig von der Sensibilität der Mikroorganismen, der Erzeugungparameter und Behandlungszeit ist [40]. Dieser Aspekt spielt eine große Rolle in der Behandlung chronischer, mit multiresistenten Erregern infizierter Wunden [49].

Heilungsstimulierend kommen weitere Effekte der emittierten ROS/RNS zum Tragen. NO, als Teil der RNS, welches direkt vom Plasmastrom nach intrazellulär diffundieren kann oder indirekt in der Zelle durch entsendete Radikale entsteht, ist bekanntermaßen ein endogener angiogenetischer Faktor [41], welcher verschiedene Prozesse der Angiogenese vermittelt [50].

2.5. Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeiten war es, zu untersuchen, inwiefern antiinfektiöse Eigenschaften kalten Plasmas in der parodontalen und periimplantären Therapie nutzbar sind. Die parodontale und periimplantäre Therapie zielt primär auf eine Dekontamination der betroffenen Wurzel- und Implantatoberfläche ab. Daher wurde anhand von *in vitro* und *ex vivo* Modellen untersucht, inwieweit Plasma im Vergleich zu herkömmlichen Methoden geeignet ist beschriebene infizierte Oberflächen effektiv zu dekontaminieren.

3. Methodik

3.1. Herstellung komplexer Oberflächenstrukturmodelle

Es wurden drei Modelle entwickelt, die die an einer Periimplantitis beteiligten Oberflächen repräsentieren.

Zur Untersuchung der Implantatoberfläche wurden 32 identische Zahnimplantate (Tiny Implant, $2,5 \times 13$ mm, BTI Biotechnology Institute, Miñano, Spanien, REF: IRT2513) ausgewählt. Drei weitere ($4,25 \times 15$ mm, REF: IIPU4215) der Firma BTI wurden für die Rasterelektronen- (REM) und Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) ausgewählt, wobei eines für letztere axial mittels Bandsäge (EXAKT 300 CL, EXAKT Advanced Technologies, Norderstedt, Deutschland) in vier plane Teile geteilt und auf Objektträgern fixiert wurde. Fünf weitere Implantate wurden für die Fluoreszenzmikroskopie ausgewählt.

Zur Untersuchung infizierten Knochens wurden mittels Trepanbohrer 72 zylindrische, 4 mm im Durchmesser und 3 mm Höhe messende Knochenblöcke, aus Schweineunterkiefern gewonnen (Knochenqualität D2). Diese wurden nach entsprechender Aufbereitung zur Versuchsdurchführung in gefrästen Technovit 4004 Blöcken mit je 3 Knochenblöcken übereinander zusammengefasst. So ergaben sich drei zu unterscheidende Tiefen: 0-3 mm, 3-6 mm und 6-9 mm. Parallel zu den porcinen wurde je eine Versuchsreihe je Gruppe mit je einem humanen Knochenblock von $6 \times 10 \times 10$ mm durchgeführt, welcher nach Versuchsdurchführung in drei Schichten: 0-2 mm, 2-4 mm und 4-6 mm unterteilt wurde. Zwei weitere porcine Knochenblöcke wurden für die Betrachtung unter dem REM präpariert. Für die Dentinoberflächen wurden bei dem *in vitro* Versuch 24 extrahierte obere Eckzähne mit geraden Wurzeln ausgewählt und koronal bzw. apikal so gekürzt, dass ein vergleichbarer 10 mm Wurzelanteil erhalten blieb, worauf ein Versuchsareal von 4×5 mm definiert wurde. Zwei weitere wurden zur Betrachtung unter dem REM auf die gleiche Weise präpariert. Für den *ex vivo* Versuch wurden von 25 frisch extrahierten Zähnen einer Person, 16 mit annähernd symmetrischen kariösen Läsionen ausgewählt. Diese wurden so halbiert, dass je zwei kongruente Läsionen entstanden.

3.2. Monospezies-Biofilme und *ex vivo* Ansätze

Als Modellkeim wurde *S. mitis* aufgrund seiner Fähigkeit als Initialkeim bei der Bildung eines oralen Biofilms zu fungieren ausgewählt. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen auf Columbia Agar und für die Inkubation der Proben wurden Keim-Suspensionen in Brain-Heart-Infusion (BHI) mit einer ausgewählten optischen Dichte von 1 bei 600 nm hergestellt. Die Kontamination der Implantate erfolgte über 84 h, die der

Knochenproben über 24 h und die der Dentinoberflächen über 48 h, wobei nach je 24 h 25 % der Suspension entnommen, und durch sterile BHI ersetzt wurde.

Die für den *ex vivo* Versuch der Dentinoberflächen ausgewählten Zähne wurden vom Zeitpunkt der Extraktion bis zur Versuchsdurchführung in BHI gelagert, sodass die Mischflora der kariösen Läsionen erhalten blieb.

3.3. Dekontaminationsprotokolle

Zu jedem Oberflächenmodell wurden jeweils verschiedene Testgruppen festgelegt. Die Erzeugung des CAPs erfolgte durch den kiNPen MED[®] (neoplas Tools, Greifswald, Deutschland), welcher Argongas 4.8 bei einem Druck von 4,3 bar und einem Gasfluss von 4.3 slm mittels Hochfrequenzgenerator bei einer Frequenz von 1 Mhz, einer Spannung von 2-6 kV_{pp} und einer Leistung von 3,5 W ionisierte [51].

Implantatoberflächen

Die 32 Implantate wurden zufällig in 4 Gruppen zu je 8 Implantaten aufgeteilt. Zur Durchführung wurde ein Implantat der Suspension entnommen und über einen Eindrehpfosten auf ein Winkelstück der Versuchsbank gespannt. So wurden die vier Gruppen hintereinander achtmal durchlaufen. Das Implantat wurde unter konstanter Drehung mit definiertem Vorschub je nach Gruppe von apikal nach koronal behandelt:

Kontrolle (K): Spülung mit 5 mL 0,9 % NaCl über 60 s bei 60 rpm und 0,22 mm/s Vorschub.

Diodenlaser (DL): Behandlung unter direktem Kontakt (300 µm Glasfaser) mit GaAlAs Diodenlaser ($\lambda = 980 \text{ nm}$) (Lina-10D, Intros Medical Laser, Heilbad Heiligenstadt, Germany) mit 2,0 W (kontinuierliche Welle) über 60 s bei 60 rpm und 0,22 mm/s Vorschub.

CAP60: Behandlung mit CAP über 60 s bei 60 rpm und 0,22 mm/s Vorschub.

CAP120: Behandlung mit CAP über 120 s bei 60 rpm und 0,11 mm/s Vorschub.

Parallel erfolgte bei den Laser sowie CAP Gruppen eine Spülung nach Kontroll-Protokoll. Für die Betrachtung unter dem REM (CamScan Maxim 2040S, CamScan Electron Optics, Cambridgeshire, England) wurde ein Implantat entsprechend inkubiert und eines steril im Vergleich betrachtet. Die vier Teile eines Implantats wurden inkubiert, jeweils entsprechend einer der vier Versuchsgruppen behandelt, und anschließend, nach Zugabe von Fluorescein-Ethidiumbromid Lösung, unter dem CLSM (LSM 700; Zeiss, Jena, Deutschland) betrachtet. Vier weitere inkubierte Implantate wurden nach je einem der vier Gruppen-Protokolle behandelt und anschließend nach aufgebrachtener Fluorescein-Ethidiumbromid Lösung unter

dem Fluoreszenzmikroskop (Olympus Vanox-T, Olympus, Hamburg, Deutschland) betrachtet.

Knochenproben

Die porcinen Knochenproben wurden randomisiert in drei Gruppen zu je acht Proben aufgeteilt und zu jeder Gruppe wurde zusätzlich ein humaner Knochenblock randomisiert zugeteilt. Die Behandlung bestand aus:

Kontrolle: Spülung der Proben mit 5 mL 0,9 % NaCl im Abstand von 8 mm über 60 s, senkrecht zur Probenoberfläche.

CHX: Spülung der Proben mit 5 mL 0,2 % CHX im Abstand von 8 mm über 60 s, senkrecht zur Probenoberfläche.

CAP: Anwendung des CAPs im Abstand von 8 mm senkrecht zur Probenoberfläche.

Ein inkubierter und ein steriler porciner Knochenblock wurden unter dem REM betrachtet.

Dentinoberflächen

Die Dentinoberflächen wurden nach *ex vivo* und *in vitro* getrennt und wie folgt verfahren:

In vitro: Kontrolle: Spülung der Oberfläche mit 5 mL 0,9 % NaCl über 30 s.

SRP: Spülung nach Kontrollprotokoll und zusätzlich erfolgte ein SRP.

SRP+CAP: Behandlung wie SRP-Protokoll, danach erfolgt die Anwendung des CAPs über 60 s.

Zusätzlich wurden zwei inkubierte Wurzeloberflächen vor und nach erfolgtem SRP unter dem REM betrachtet.

Ex vivo: Kontrolle: Es erfolgte die Applikation eines 1 % CHX Gels für 30 s, welches anschließend mit 5 mL NaCl abgespült wurde.

CAP: Es wurde wie bei der Kontrollgruppe verfahren und anschließend erfolgte die Applikation des CAPs über 60 s.

3.4. Probengewinnung

Die Probengewinnung erfolgte je Modell unterschiedlich. Das letztlich gewonnene Material wurde in definierten Mengen BHI gelöst, über eine Verdünnungsreihe verdünnt, auf Agar-Platten ausgestrichen und über eine Zählung der koloniebildenden Einheiten (CFU) erfolgte die Quantifizierung.

Implantatoberflächen

Die Implantate wurden von den Eindrehpfosten abgenommen, das Lumen mit 70 % Ethanol für 10 s gereinigt und anschließend unter Einbringung einer Stahlkanüle mittels lighthärtendem Kunststoff (Tetric Flow A1, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein)

verschlossen. Zuerst wurde das Implantat nun in BHI gelegt, und unter direktem Ultraschalleinfluss (VDW Ultra, VDW, München, Deutschland) über die Kanüle sowie definiertem Rütteln wurde eine Bakteriensuspension gewonnen (direkt Ultraschall). Anschließend wurde das Implantat auf einen Eindremposten aufgebracht und mittels Zellsammelbürste (Orcellex Brush, Rovers Medical Devices, KV Oss, Niederlande) wurde standardisiert die Oberfläche über 3 min abgefahren. Der Bürstenkopf sowie das Implantat, nach Lumenverschluss mittels Kunststoff, wurden in BHI gelegt. Beide wurden mittels indirektem Ultraschallbad und definiertem Rütteln behandelt und ergaben nach Entnahme des Bürstenkopfs (Abstrich) und Implantats (indirekt Ultraschall) zwei weitere Bakteriensuspensionen.

Knochenproben

Die Knochenblöcke wurden den Zylindern entnommen und jeweils unter standardisierten Bedingungen mit senkrechtem Krafteinfluss von 20 N in je vier Durchläufen zerkleinert. Der humane Knochenblock wurde zuvor in drei Blöcke gemäß den Schichten zersägt.

Dentinoberflächen

Bei dem *in vitro* Ansatz wurde die oberste Zellschicht mittels Skalpell abgetragen. Für den *ex vivo* Ansatz wurden die Kavitäten mit einem 018 Rosenbohrer vollständig exkaviert.

3.5. Auswertungsstrategien

Die CFU Auszählung der mit Bakteriensuspension bestrichenen Agar Platten erfolgte nach 24 h Inkubation unter 37 °C und aneroben Bedingungen unter Beachtung der Verdünnungsreihen. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mittels IBM SPSS Statistics® 21.0 (IBM Corp., Armonk, IL, USA) unter Verwendung des Kruskal-Wallis- und Mann Whitney U Test, wobei ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ gewählt wurde. Logarithmische Reduktionsfaktoren (log RF) wurden aus der Differenz der logarithmierten CFU Mittel- bzw. Medianwerte der Kontroll- und jeweiligen Testgruppe errechnet.

Zur Visualisierung und Qualifizierung der adhärenen Bakterien dienten REM, CLSM sowie die Fluoreszenzmikroskopie.

4. Ergebnisse

4.1. Implantatstrukturen

Zum Vergleich der Testgruppen kamen die log RF sowie die Mikroskopiemethoden zum Einsatz. Alle Versuchsgruppen zeigten positive mittlere log RF gegenüber der Kontrollgruppe (DL=0,59 CAP60=2,21 CAP120=1,93). Beide CAP Gruppen zeigten signifikant niedrigere

CFU Mittelwerte gegenüber der Kontrollgruppe (CAP60 gegenüber K $p=0,012$; TTP120 gegenüber K $p=0,024$), wobei sie sich die unterschiedliche Behandlungszeit nicht signifikant auswirkte. Die Behandlung mit dem Diodenlaser zeigt keine signifikante Reduktion der CFU Zahl gegenüber der Kontrollgruppe. Von den Methoden der Bakterienquantifizierung zeigte sich der Abstrich am effektivsten, gefolgt von der direkten Ultraschallmethode. Die niedrigsten CFU Werte wurden, bis auf in der CAP60 Gruppe, von der indirekten Ultraschallmethode erzielt, welche nach Behandlung des Implantats zuerst angewendet wurde.

Mit Hilfe des CLSM konnten vitale Bakterien (Mitosestadien sichtbar) auf inkubierten Implantaten nachgewiesen werden. Diese kamen bei Betrachtung mit dem REM scheinbar vermehrt auf den mikrorauen Anteil, dem Gewinde, als dem polierten Implantatthals vor. Die Fluoreszenzmikroskopie zeigte vorwiegend grüne Emissionen der inkubierten unbehandelten Implantate, und zusätzlich Bereiche roter Emission bei den behandelten Implantaten. Mit DL behandelte Implantate zeigten hierbei weniger rote Emission als die der CAP Gruppen, wobei sich die CAP Gruppen untereinander nicht auffallend unterschieden. Die sterilen Implantate zeigten keine adhärenen Bakterien unter REM und CLSM sowie keine Emission bei der Fluoreszenzmikroskopie.

4.2. Kavitierte und nicht-kavitierte Dentinoberflächen

Die inkubierten Wurzeloberflächen der *in vitro* Versuche zeigten unter dem REM vor dem SRP eine reiche Bakterien-schicht und nach erfolgtem SRP verbleibende Bakterien, vorwiegend in Nischen. Die CFU Medianwerte der Gruppen waren in der Kontrollgruppe am höchsten mit $3,85 \log \text{CFU/mL}$ gefolgt von der SRP Gruppe mit $2,98 \log \text{CFU/mL}$ und der SRP+CAP Gruppe mit $0 \log \text{CFU/mL}$.

Der *ex vivo* Versuch zeigte Durchschnittswerte von $4,45 \log \text{CFU/mL}$ für die CHX Gruppe und signifikant ($p=0,002$) niedrigere von $2,67 \log \text{CFU/mL}$ für die Gruppe CHX kombiniert mit CAP.

4.3. Knochenoberflächen

Der inkubierte porcine Knochenblock zeigte unter dem REM runde bis ovale, den Trabekeln aufliegende, als Bakterien identifizierte Strukturen, welche der sterile Knochenblock nicht aufwies. Die CFU Medianwerte der Kaltplasmagruppe waren in allen Schichten niedriger als die der CHX- und Kontrollgruppe. Dieser Unterschied war in der oberflächlichsten Schicht I (0-3 mm) nicht signifikant, in der mittleren Schicht II (3-6 mm) signifikant, und in der tiefen

Schicht III (6-9 mm) gegenüber der CHX-Gruppe signifikant und gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant ($p > 0,05$). Über alle Schichten gesehen (0-9 mm) war der Unterschied zu beiden Gruppen signifikant (gegenüber CHX $p = 0,004$; gegenüber C $p = 0,008$). Der Unterschied der CFU Medianwerte der CHX Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe war in keiner Schicht signifikant. Der resultierende logarithmische Reduktionsfaktor der Median CFU Werte über Schicht I-III gegenüber der Kontrollgruppe der CHX Gruppe betrug 0,04 und der der CAP Gruppe 0,24.

Innerhalb einer Gruppe nahmen die Median CFU Werte von der oberflächlichen zur mittleren und zur tiefen Schicht jeweils zu. Die Werte unterschieden sich innerhalb der CHX Gruppe von der oberflächlichsten im Vergleich zur tiefen Schicht (I gegenüber III) signifikant. Die CAP Gruppe zeigte zwischen den Schichten I-III keine signifikanten Unterschiede.

Die Ergebnisse der CFU Werte des humanen Knochens zeigten ähnliche Tendenzen, waren aufgrund der kleinen Versuchsgröße $n=4$ jedoch statistisch nicht signifikant.

5. Diskussion

5.1. Bewertung der Ergebnisse

Auf allen in der vorliegenden Arbeit *in vitro* untersuchten Oberflächen des Parodonts zeigte Kaltplasma eine bakterizide Wirkung. Kaltplasma zeigte auf der alloplastischen Implantatoberfläche gegenüber der Vergleichsgruppe mit dem DL einen mehr als dreimal so hohen logarithmischen Reduktionsfaktor. Hierbei scheint die komplexe dreidimensionale Oberfläche des Implantats den Ausschlag zu geben. Beide Verfahren zeigten in Studien bakterizide Wirkungen [41-44, 52, 53], und es ist anzunehmen, dass der Unterschied vor allem auch aus der verschiedenen guten Erreichbarkeit der Oberfläche resultiert. So besitzt Kaltplasma die Eigenschaft, sich beim Auftreffen auf Hindernisse allseitig auf der Oberfläche auszubreiten und eventuelle Poren zu penetrieren. Im Gegensatz dazu ist das Wirkspektrum des Diodenlasers auf die direkt vom Laserstrahl erfasste Fläche oder zumindest der vom Hitzeeinfluss betroffenen Gebiete beschränkt. Denkbar wäre, dass Bakterien im Schatten vom Laserstrahl nicht erfasst werden. Eine Energiedichtenerhöhung und somit Erhöhung des Einflusses der bakteriziden Hitzeentwicklung steht im Gegensatz zu einer, bei hohen Energiedichten auftretenden, ungewünschten Veränderung der Implantatoberfläche [54] sowie einem vermehrten subgingivalem Emphyseauftreten. Die im Versuch verwendeten 2 W entsprechen einer relativ hohen Leistung. Im Vergleich zeigte eine Split-mouth Studie bei adjuvanter Diodenlaser Behandlung (GaAlAs, 809 nm) mit 1 W Leistung einen

signifikant erhöhten klinischen Attachmentgewinn sowie verringerte Sondierungstiefen, wobei die klinische Relevanz gering scheint [55].

Die Fluoreszenzmikroskopie zeigte nach Diodenlaserbehandlung mehr Bereiche grüner Emission, also vitaler Bakterien, als bei Kaltplasmabehandlung, was die Beobachtungen unterstützt. Die Behandlungszeit von 60 Sekunden mittels CAP schien, trotz der komplexen Implantatoberfläche, ausreichend zu sein (keine signifikanten Unterschiede der CFU Mittelwerte zwischen CAP60 und CAP120). Dies entspricht der Empfehlung des Herstellers für die Behandlungszeit von 1 cm² chronischer Wunden, wobei die Implantatoberfläche, ohne Berücksichtigung der Komplexität, knapp darunterlag (ca. 0,8 cm²).

Das Modell der Dentinoberflächen konnte die Effektivität der bakteriziden Wirkung von CAP auch auf natürliche Wurzeloberflächen zeigen. Dass die mechanische Biofilmreduktion (SRP) bei der Parodontitistherapie unabdingbar ist, haben zahlreiche Studien belegt, doch zeigt die vorliegende Arbeit eine signifikante Wirkungssteigerung bei der Kombination von SRP mit CAP im *in vitro* Versuch. Auch im *ex vivo* Versuch scheint Kaltplasma in Kombination mit der CHX Therapie bei einer Mischflora effektiver gegenüber alleiniger CHX Anwendung zu sein.

Vor allem intraossär verankerte Implantate stehen in direktem Kontakt zum Alveolarkamm, doch auch bei Parodontitis kommt es zum Knochenabbau. Hier zeigte die Behandlung mit Kaltplasma im *in vitro* Versuch der infizierten Knochenoberflächen signifikante Reduktionsfaktoren, wobei die CHX Behandlung in keinen signifikanten Reduktionen resultierte. Die stärkste Wirkung war hier in der oberflächlichsten Schicht zu beobachten.

Insgesamt waren die Reduktionen im Vergleich zu den ersten beiden Modellen geringer. Jedoch ist zu überlegen, dass Kaltplasma im Knochengewebe andere, im *in vitro* Versuch nicht untersuchte, Prozesse der Regeneration und Reparation fördern könnte. Dabei wären die Förderung der Neoangiogenese, die Erhöhung der Hydrophilie sowie die insgesamt entzündungshemmende Wirkung zu nennen [41, 56].

5.2. Kritische Betrachtung der Strukturmodelle

Die vorliegenden Versuche entsprechen lediglich *in vitro* bzw. *ex vivo* Modellen, wobei deren Ergebnisse sich später von *in vivo* Ergebnissen unterscheiden mögen. Jedoch stellen sie mögliche Wirkmechanismen anhand von Modellkeimen klar heraus.

Bei der Periimplantitis bzw. Parodontitis vorliegende Biofilme unterscheiden sich von dem hier verwendeten Modellkeim. Es bilden sich dabei antagonistische aber auch synergistische Wechselbeziehungen zwischen verschiedenen Bakterien heraus und sezernierte extrazelluläre

Matrix bietet Schutz vor äußeren Einflüssen. Diese bleiben somit im *in vitro* Versuch größtenteils unbeachtet. Die bakterizide Wirkung von Kaltplasma ist jedoch unabhängig von bakteriellen Resistenzen [44], was die Unterscheidung nach Bakterienart weniger wichtig macht. Der Einfluss der UV-Strahlung des Niederdruckplasmas an der Sterilisation ist umstritten. Viele Autoren sehen keinen, oder nur sehr geringen Einfluss [47], da die Wellenlänge der emittierten UV-Strahlen größer seien als die für eine Sterilisation benötigten 150-250 nm [45, 57, 58]. Andere zählen die UV-Strahlen jedoch zu den Wirkmechanismen des CAP, wobei die Erzeugungsparameter entscheidend scheinen [59].

In den Versuchen waren die Oberflächen den Dekontaminierungsmethoden frei zugänglich, wohingegen *in vivo* bei tiefen subgingivalen Taschen die Zugänglichkeit eingeschränkt wäre. Dies betrifft jedoch alle Agenzien in ähnlicher Weise. Möglicherweise könnten durch eine kontinuierliche Veränderung des Auftreffwinkels des Lasers auf die Implantatoberfläche das Implantatgewinde besser erfasst, und somit effektiver dekontaminiert werden. Im vorliegenden Versuch wurde aufgrund der Standardisierbarkeit hierauf verzichtet.

Die Quantifizierung vitaler Bakterien auf den Implantatoberflächen erfolgte neben der Ultraschallablösemethode, wie diese für Prothesen etabliert ist [60], aufgrund der dabei erhaltenen relativ niedrigen CFU Werte, auch mittels Zellsammelbürste. Die Reproduzierbarkeit ist hierbei zu hinterfragen, wobei diese in umfangreichen Vorversuchen als hinreichend genau geprüft wurde.

Bei dem *ex vivo* Versuch der Dentinoberflächen musste auf eine Kontrollgruppe aufgrund des Versuchsaufbaus (zwei kongruente Kavitäten) verzichtet werden, und somit konnte die Nullhypothese, dass keine der untersuchten Methoden wirksam ist, nicht eindeutig widerlegt werden.

Die CFU Werte der oberflächlichen Schicht der infizierten Knochenproben unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Das kann daraus resultieren, dass hier der Spüleffekt den größten Beitrag in der Bakterienelimination leistete, da die Kontrollgruppe niedrigere Werte als die CHX Gruppe zeigte.

5.3. Konsequenzen für die Klinik

Die Ergebnisse zeigen ein mögliches Potential von Kaltplasma in der Periimplantitis- und Parodontitistherapie auf. Eine alleinige Therapie scheint aufgrund der insuffizienten Ablösung etablierter Biofilme nicht indiziert. Hier übertreffen mechanische Ablöseverfahren die Ergebnisse des Kaltplasmas [61]. Auch die hier gezeigten logarithmischen Reduktionsfaktoren des Implantatmodells von bis zu 2,21 reichen nicht für die zu einer

Desinfektion erforderlichen 5. Eine adjuvante CAP Therapie in Kombination mit Verfahren, welche die Eigenschaften von Implantaten oder Wurzeloberflächen nicht negativ beeinflussen, scheint das Potential der nahezu vollständigen Biofilmentfernung zu besitzen. Denkbar wäre hier der Einsatz nach vorheriger Biofilmentfernung durch Pulverstrahlgeräte. Somit würde das derzeitige Problem der negativen Oberflächenbeeinflussung bei der SRP und Laser-Therapie vermieden werden und so eine schonende Therapiealternative geschaffen werden.

5.4. Ausblick / Fazit

Da Kaltplasma weder in den vorliegenden Versuchen, noch in bisherigen veröffentlichten Studien, eine negative Beeinflussung der behandelten Zahnwurzel- und Implantatoberflächen zeigte, scheint es ein vielversprechender, schonender Ansatz in der Therapie von Periimplantitis und Parodontitis werden zu können. Die Wirkmechanismen des Plasmas beeinflussen die Gewebe des gesamten Parodonts. Neben der hier aufgezeigten Dekontaminierung resultiert zudem eine Hydrophilisierung der Oberflächen in einer verbesserten Anheftung von Gewebszellen. Anhand von Titanscheiben konnte nach Kaltplasmabehandlung ein verkleinerter Kontaktwinkel sowie ein Anstieg der Zellgröße und des Ausbreitungsverhaltens von Osteoblasten festgestellt werden [62]. Dies wäre entscheidend für eine Regeneration des Alveolarkamms und wäre mit *in vivo* Studien zukünftig zu belegen.

Die heilungsstimulierende Komponente von CAP wurde, wie eingangs beschrieben, bisher bei chronischen Wunden gezeigt [41], wobei zu untersuchen wäre inwieweit dies auch für das Parodont gilt. Denkbar wären hier Untersuchungen der Auswirkung auf die Sulkusfluidzusammensetzung oder Zellkulturüberstände mit Betrachtung der Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie eine Studie an Mäusen so positive Effekte zeigte [63].

Denkbar wäre auch der Einsatz in Kombination mit GTR, wobei man die dabei verwendeten Materialien mit CAP vorbehandeln könnte, und so deren Integration fördern könnte.

Gelänge es in Zukunft die klinische Wirksamkeit von CAP weiter zu bekräftigen, wäre damit eine schonende, die Selbstheilung des Körpers fördernde Alternative zu den heutigen Therapieverfahren der Periimplantitis denkbar. Gerade die Kombination mit Pulverstrahlgeräten hätte das Potenzial einer effektiven, minimalinvasiven und somit auch prophylaktisch anwendbaren Therapie.

Literaturverzeichnis

1. Loe H, Theilade E and Jensen SB, *Experimental Gingivitis in Man*. J Periodontol, 1965. **36**: p. 177-87.
2. Clarke NG and Hirsch RS, *Personal risk factors for generalized periodontitis*. J Clin Periodontol, 1995. **22**(2): p. 136-45.
3. Dibart S, Skobe Z, Snapp KR, Socransky SS, Smith CM and Kent R, *Identification of bacterial species on or in crevicular epithelial cells from healthy and periodontally diseased patients using DNA-DNA hybridization*. Oral Microbiol Immunol, 1998. **13**(1): p. 30-5.
4. Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RL, Jr. and Socransky SS, *Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects*. J Clin Periodontol, 1998. **25**(5): p. 346-53.
5. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP and Brissette C, *Virulence factors of Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Periodontol 2000, 1999. **20**: p. 136-67.
6. Palaska I, Gagari E and Theoharides TC, *The effects of P. gingivalis and E. coli LPS on the expression of proinflammatory mediators in human mast cells and their relevance to periodontal disease*. J Biol Regul Homeost Agents, 2016. **30**(3): p. 655-664.
7. Smeets R, Henningsen A, Jung O, Heiland M, Hammacher C and Stein JM, *Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis--a review*. Head Face Med, 2014. **10**: p. 34.
8. Stacchi C, Berton F, Perinetti G, Frassetto A, Lombardi T, Khoury A, Andolsek F and Di Lenarda R, *Risk Factors for Peri-Implantitis: Effect of History of Periodontal Disease and Smoking Habits. A Systematic Review and Meta-Analysis*. J Oral Maxillofac Res, 2016. **7**(3): p. e3.
9. Rakic M, Grusovin MG and Canullo L, *The Microbiologic Profile Associated with Peri-Implantitis in Humans: A Systematic Review*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2016. **31**(2): p. 359-68.
10. de Waal YC, Eijsbouts HV, Winkel EG and van Winkelhoff AJ, *Microbial Characteristics of Peri-Implantitis: A Case-Control Study*. J Periodontol, 2017. **88**(2): p. 209-217.
11. Perez-Chaparro PJ, Duarte PM, Shibli JA, Montenegro S, Lacerda Heluy S, Figueiredo LC, Favari M and Feres M, *The Current Weight of Evidence of the Microbiologic Profile Associated With Peri-Implantitis: A Systematic Review*. J Periodontol, 2016. **87**(11): p. 1295-1304.
12. Mousavi Jazi M, Sadeghi Pour Rodsari HR and Mirmiran F, *Level of Oxidative Stress Markers in Peri-Implant Crevicular Fluid and Their Correlation with Clinical Parameters*. J Dent (Tehran), 2015. **12**(5): p. 340-6.
13. Jankovic S, Aleksic Z, Dimitrijevic B, Lekovic V, Milinkovic I and Kenney B, *Correlation between different genotypes of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus and peri-implant tissue status*. Aust Dent J, 2011. **56**(4): p. 382-8.
14. Jankovic S, Aleksic Z, Dimitrijevic B, Lekovic V, Camargo P and Kenney B, *Prevalence of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in subgingival plaque at peri-implantitis, mucositis and healthy sites. A pilot study*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2011. **40**(3): p. 271-6.
15. Shusterman A, Munz M, Richter G, Jepsen S, Lieb W, Krone B, Hoffman P, Laudes M, Wellmann J, Berger K, Kocher T, Offenbacher S, Divaris K, Franke A, Schreiber S, Dommisch H, Weiss E, Schaefer AS, Houry-Haddad Y and Iraqi FA, *The PF4/PPBP/CXCL5 Gene Cluster Is Associated with Periodontitis*. J Dent Res, 2017. **96**(8): p. 945-952.

16. Munz M, Willenborg C, Richter GM, Jockel-Schneider Y, Graetz C, Staufenbiel I, Wellmann J, Berger K, Krone B, Hoffmann P, van der Velde N, Uitterlinden AG, de Groot L, Sawalha AH, Direskeneli H, Saruhan-Direskeneli G, Guzeldemir-Akcakanat E, Keceli G, Laudes M, Noack B, Teumer A, Holtfreter B, Kocher T, Eickholz P, Meyle J, Doerfer C, Bruckmann C, Lieb W, Franke A, Schreiber S, Nohutcu RM, Erdmann J, Loos BG, Jepsen S, Dommisch H and Schaefer AS, *A genome-wide association study identifies nucleotide variants at SIGLEC5 and DEFA1A3 as risk loci for periodontitis*. Hum Mol Genet, 2017. **26**(13): p. 2577-2588.
17. Lindhe J, Meyle J and Group DoEWoP, *Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology*. J Clin Periodontol, 2008. **35**(8 Suppl): p. 282-5.
18. Isidor F and Karring T, *Long-term effect of surgical and non-surgical periodontal treatment. A 5-year clinical study*. J Periodontal Res, 1986. **21**(5): p. 462-72.
19. Jepsen S, Berglundh T, Genco R, Aass AM, Demirel K, Derks J, Figuero E, Giovannoli JL, Goldstein M, Lambert F, Ortiz-Vigon A, Polyzois I, Salvi GE, Schwarz F, Serino G, Tomasi C and Zitzmann NU, *Primary prevention of peri-implantitis: managing peri-implant mucositis*. J Clin Periodontol, 2015. **42 Suppl 16**: p. S152-7.
20. Van der Weijden GA and Timmerman MF, *A systematic review on the clinical efficacy of subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis*. J Clin Periodontol, 2002. **29 Suppl 3**: p. 55-71; discussion 90-1.
21. Costa FO, Cota LO, Cortelli JR, Cortelli SC, Cyrino RM, Lages EJ and Oliveira AP, *Surgical and Non-Surgical Procedures Associated with Recurrence of Periodontitis in Periodontal Maintenance Therapy: 5-Year Prospective Study*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0140847.
22. Schou S, Berglundh T and Lang NP, *Surgical treatment of peri-implantitis*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2004. **19 Suppl**: p. 140-9.
23. Matarasso S, Quaremba G, Coraggio F, Vaia E, Cafiero C and Lang NP, *Maintenance of implants: an in vitro study of titanium implant surface modifications subsequent to the application of different prophylaxis procedures*. Clin Oral Implants Res, 1996. **7**(1): p. 64-72.
24. Lupi SM, Granati M, Butera A, Collesano V and Rodriguez YBR, *Air-abrasive debridement with glycine powder versus manual debridement and chlorhexidine administration for the maintenance of peri-implant health status: a six-month randomized clinical trial*. Int J Dent Hyg, 2016.
25. Tastepe CS, van Waas R, Liu Y and Wismeijer D, *Air powder abrasive treatment as an implant surface cleaning method: a literature review*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2012. **27**(6): p. 1461-73.
26. Petersilka GJ, Tunkel J, Barakos K, Heinecke A, Haberlein I and Flemmig TF, *Subgingival plaque removal at interdental sites using a low-abrasive air polishing powder*. J Periodontol, 2003. **74**(3): p. 307-11.
27. Moene R, Decaillet F, Andersen E and Mombelli A, *Subgingival plaque removal using a new air-polishing device*. J Periodontol, 2010. **81**(1): p. 79-88.
28. Ata-Ali J, Candel-Marti ME, Flichy-Fernandez AJ, Penarrocha-Oltra D, Balaguer-Martinez JF and Penarrocha Diago M, *Peri-implantitis: associated microbiota and treatment*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2011. **16**(7): p. e937-43.
29. Aljateeli M, Fu JH and Wang HL, *Managing peri-implant bone loss: current understanding*. Clin Implant Dent Relat Res, 2012. **14 Suppl 1**: p. e109-18.
30. Romeo E, Lops D, Chiapasco M, Ghisolfi M and Vogel G, *Therapy of peri-implantitis with resective surgery. A 3-year clinical trial on rough screw-shaped oral implants. Part II: radiographic outcome*. Clin Oral Implants Res, 2007. **18**(2): p. 179-87.

31. Schwarz F, Sculean A, Bieling K, Ferrari D, Rothamel D and Becker J, *Two-year clinical results following treatment of peri-implantitis lesions using a nanocrystalline hydroxyapatite or a natural bone mineral in combination with a collagen membrane*. J Clin Periodontol, 2008. **35**(1): p. 80-7.
32. Jung RE, Fenner N, Hammerle CH and Zitzmann NU, *Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12-14 years*. Clin Oral Implants Res, 2013. **24**(10): p. 1065-73.
33. Karring T and Warrer K, *Regenerative capacity of periodontal tissues*. Dtsch Zahnarztl Z, 1988. **43**(6): p. 635-45.
34. McCulloch CA, *Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration*. Periodontol 2000, 1993. **1**: p. 16-25.
35. Arzate H, Zeichner-David M and Mercado-Celis G, *Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration*. Periodontol 2000, 2015. **67**(1): p. 211-33.
36. Grzesik WJ and Narayanan AS, *Cementum and periodontal wound healing and regeneration*. Crit Rev Oral Biol Med, 2002. **13**(6): p. 474-84.
37. Anitua E, *Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1999. **14**(4): p. 529-35.
38. Esposito M, Grusovin MG, Papanikolaou N, Coulthard P and Worthington HV, *Enamel matrix derivative (Emdogain(R)) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects*. Cochrane Database Syst Rev, 2009(4): p. CD003875.
39. Thosani N, Rao B, Ghouri Y, Batra S, Raju G, Shafi M and Guha S, *Role of argon plasma coagulation in management of bleeding GI tumors: evaluating outcomes and survival*. Turk J Gastroenterol, 2014. **25 Suppl 1**: p. 38-42.
40. Han L, Patil S, Keener KM, Cullen PJ and Bourke P, *Bacterial inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma: influence of process parameters and effects on cell leakage and DNA*. J Appl Microbiol, 2014. **116**(4): p. 784-94.
41. Haertel B, von Woedtke T, Weltmann KD and Lindequist U, *Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing*. Biomol Ther (Seoul), 2014. **22**(6): p. 477-90.
42. Lackmann JW, Schneider S, Edengeiser E, Jarzina F, Brinckmann S, Steinborn E, Havenith M, Benedikt J and Bandow JE, *Photons and particles emitted from cold atmospheric-pressure plasma inactivate bacteria and biomolecules independently and synergistically*. J R Soc Interface, 2013. **10**(89).
43. Hoffmann C, Berganza C and Zhang J, *Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology*. Med Gas Res, 2013. **3**(1): p. 21.
44. Klampfl TG, Isbary G, Shimizu T, Li YF, Zimmermann JL, Stolz W, Schlegel J, Morfill GE and Schmidt HU, *Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest*. Appl Environ Microbiol, 2012. **78**(15): p. 5077-82.
45. Gregory Fridman GF, Alexander Gutsol, Anatoly B. Shekhter, Victor N. Vasilets, Alexander Fridman, *Applied plasma medicine*. Plasma Processes Polym, 2008. **3**: p. 503–533.
46. Joshi SG, Cooper M, Yost A, Paff M, Ercan UK, Fridman G, Friedman G, Fridman A and Brooks AD, *Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(3): p. 1053-62.
47. Perni S SG, Hobman JL, Lund PA, Kershaw CJ, Hidalgo-Arroyo GA, *Probing bactericidal mechanisms induced by cold atmospheric plasmas with Escherichia coli mutants*. Applied Physics Letters, 2007: p. 90.

48. Laroussi M, *Nonthermal Decontamination of Biological Media by Atmospheric-Pressure Plasmas: Review, Analysis and Prospects*. IEEE TRANSACTIONS ON PLASMA SCIENCE, 2002.
49. Isbary G, Heinlin J, Shimizu T, Zimmermann JL, Morfill G, Schmidt HU, Monetti R, Steffes B, Bunk W, Li Y, Klaempfl T, Karrer S, Landthaler M and Stolz W, *Successful and safe use of 2 min cold atmospheric argon plasma in chronic wounds: results of a randomized controlled trial*. Br J Dermatol, 2012. **167**(2): p. 404-10.
50. Cooke JP, *NO and angiogenesis*. Atheroscler Suppl, 2003. **4**(4): p. 53-60.
51. Weltmann KD, Kindel E, Brandenburg R, Meyer C, Bussiahn R, Wilke C and von Woedtke T, *Atmospheric Pressure Plasma Jet for Medical Therapy: Plasma Parameters and Risk Estimation*. Contributions to Plasma Physics, 2009. **49**(9): p. 631-640.
52. Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R and Monaco A, *Efficacy of Er:YAG laser in the treatment of chronic periodontitis: systematic review and meta-analysis*. Lasers Med Sci, 2012. **27**(3): p. 661-73.
53. Zhao Y, Yin Y, Tao L, Nie P, Tang Y and Zhu M, *Er:YAG laser versus scaling and root planing as alternative or adjuvant for chronic periodontitis treatment: a systematic review*. J Clin Periodontol, 2014. **41**(11): p. 1069-79.
54. Kreisler M, Gotz H and Duschner H, *Effect of Nd:YAG, Ho:YAG, Er:YAG, CO₂, and GaAIAs laser irradiation on surface properties of endosseous dental implants*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2002. **17**(2): p. 202-11.
55. Kreisler M, Al Haj H and d'Hoedt B, *Clinical efficacy of semiconductor laser application as an adjunct to conventional scaling and root planing*. Lasers Surg Med, 2005. **37**(5): p. 350-5.
56. Duan Y, Huang C and Yu QS, *Cold plasma brush generated at atmospheric pressure*. Rev Sci Instrum, 2007. **78**(1): p. 015104.
57. Munakata N, Hieda K, Kobayashi K, Ito A and Ito T, *Action spectra in ultraviolet wavelengths (150-250 nm) for inactivation and mutagenesis of Bacillus subtilis spores obtained with synchrotron radiation*. Photochem Photobiol, 1986. **44**(3): p. 385-90.
58. Choi JH HI, Baik HK, Lee MH, Han DW, Park JC, Lee IS, Song KM, Lim YS, *Analysis of sterilization effect by pulsed dielectric barrier discharge*. Journal of Electrostatics, 2006(3): p. 17-22.
59. Park BJ LD, Park JC, Lee IS, Lee KY, Hyun SO, Chun MS, Chung KH, *Sterilization using a microwave-induced argon plasma system at atmospheric pressure*. Phys Plasmas, 2003: p. 4539-4544.
60. Portillo ME, Salvado M, Trampuz A, Plasencia V, Rodriguez-Villasante M, Sorli L, Puig L and Horcajada JP, *Sonication versus vortexing of implants for diagnosis of prosthetic joint infection*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(2): p. 591-4.
61. Rupf S, Idlibi AN, Marrawi FA, Hannig M, Schubert A, von Mueller L, Spitzer W, Holtmann H, Lehmann A, Rueppell A and Schindler A, *Removing biofilms from microstructured titanium ex vivo: a novel approach using atmospheric plasma technology*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25893.
62. Duske K, Koban I, Kindel E, Schroder K, Nebe B, Holtfreter B, Jablonowski L, Weltmann KD and Kocher T, *Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals*. J Clin Periodontol, 2012. **39**(4): p. 400-7.
63. Arndt S, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Heinlin J, Li YF, Thomas HM, Morfill GE, Zimmermann JL, Bosserhoff AK and Karrer S, *Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression of key molecules of the wound healing machinery and improves wound healing in vitro and in vivo*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79325.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Henrik Carl Benjamin Wirtz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung neuer Methoden zur Dekontamination komplexer oraler Strukturen im Rahmen der parodontalen Regeneration“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift _____

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Henrik Carl Benjamin Wirtz hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Bactericidal efficacy of tissue tolerable plasma on microrough titanium dental implants: An in-vitro-study.

Preissner S#, Wirtz HC#, Tietz AK, Abu-Sirhan S, Herbst SR, Hartwig S, Pierdzioch P, Schmidt-Westhausen AM, Dommisch H, Hertel M.

J Biophotonics. 2016 Jun;9(6):637-44. doi: 10.1002/jbio.201500189.

IF: 4,328

Beitrag im Einzelnen: # geteilte Erstautorenschaft

- Umfassende Einarbeitung in den Stand der Literatur hinsichtlich Plasmaanwendungen und Therapie der Parodontitis und Periimplantitis
- Einarbeitung in die mikrobiologischen Untersuchungsmethoden im Labor
- Mitarbeit bei der Formulierung der Fragestellung
- Aufbau des Experimental Designs, dabei vor allem
 - o Durchführung zahlreicher und aufwändiger Vorversuche zu Ultraschallablösemethoden
 - o umfangreiche Vorversuche zur Ermöglichung der Standardisierung der *in vitro* Therapie
- Durchführung der Hauptversuche
- Mitarbeit bei der Auswertung der Ergebnisse und Aufarbeitung der Daten
- Mitarbeit beim Verfassen des Manuskriptes

Publikation 2: Cold plasma: a novel approach to treat infected dentin-a combined ex vivo and in vitro study.

Pierdzioch P, Hartwig S, Herbst SR, Raguse JD, Dommisch H, Abu-Sirhan S, Wirtz HC, Hertel M, Paris S, Preissner S.

Clin Oral Investig. 2016 Dec;20(9):2429-2435. doi: 10.1007/s00784-016-1723-5.

IF: 2,308

Beitrag im Einzelnen:

- regelmäßige Teilnahme an wöchentlichen Arbeitsgruppentreffen, Mitarbeit bei der Entwicklung des Experimental Designs, insbesondere beim *in vitro* Ansatz und bei der logistischen Planung und Umsetzung des *ex vivo* Ansatzes, Unterstützung im mikrobiologischen Labor bei der Durchführung der Hauptversuche, Mitarbeit beim Verfassen des Manuskriptes.

Publikation 3: Bactericidal efficacy of cold plasma in processed bone. A new approach for adjuvant therapy of medication-related osteonecrosis of the jaw?

Abu-Sirhan S, Hertel M, Preissner S, Wirtz HC, Herbst SR, Pierdzioch P, Raguse JD, Hartwig, S

Clinical Plasma Medicine. 2016 Feb;4(1):9-13. doi: 10.1016/j.cpme.2015.12.001.

Beitrag im Einzelnen:

Mitarbeit bei der Entwicklung des Experimental Designs, Unterstützung im mikrobiologischen Labor bei der Durchführung der Vorversuche, dabei insbesondere Untersuchung verschiedener Knochenmaterialien mit Prüfung auf Eignung, Mitarbeit an den Hauptversuchen, Mitarbeit bei der Auswertung der Daten, insbesondere bei der grafischen Aufarbeitung und beim Verfassen des Manuskriptes.

Unterschrift des Doktoranden

Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

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

Preissner S#, Wirtz HC#, Tietz AK, Abu-Sirhan S, Herbst SR, Hartwig S, Pierdzioch P, Schmidt-Westhausen AM, Dommisch H, Hertel M.

J Biophotonics. 2016 Jun;9(6):637-44

<https://doi.org/10.1002/jbio.201500189>

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

Pierdzioch P, Hartwig S, Herbst SR, Raguse JD, Dommisch H, Abu-Sirhan S, Wirtz HC, Hertel M, Paris S, Preissner S.

Clin Oral Investig. 2016 Dec;20(9):2429-2435

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

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

Abu-Sirhan S, Hertel M, Preissner S, Wirtz HC, Herbst SR, Pierdzioch P, Raguse JD, Hartwig S.

Clinical Plasma Medicine. 2016 Feb;4(1):9-13

<https://doi.org/10.1016/j.cpme.2015.12.001>

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

Publikationsliste

1. Bactericidal efficacy of tissue tolerable plasma on microrough titanium dental implants: An in-vitro-study.
Preissner S#, Wirtz HC#, Tietz AK, Abu-Sirhan S, Herbst SR, Hartwig S, Pierdzioch P, Schmidt-Westhausen AM, Dommisch H, Hertel M.
J Biophotonics. 2016 Jun;9(6):637-44. doi: 10.1002/jbio.201500189.
2. Cold plasma: a novel approach to treat infected dentin-a combined ex vivo and in vitro study.
Pierdzioch P, Hartwig S, Herbst SR, Raguse JD, Dommisch H, Abu-Sirhan S, Wirtz HC, Hertel M, Paris S, Preissner S.
Clin Oral Investig. 2016 Dec;20(9):2429-2435. doi: 10.1007/s00784-016-1723-5.
3. Bactericidal efficacy of cold plasma in processed bone. A new approach for adjuvant therapy of medication-related osteonecrosis of the jaw?
Abu-Sirhan S, Hertel M, Preissner S, Wirtz HC, Herbst SR, Pierdzioch P, Raguse JD, Hartwig, S
Clinical Plasma Medicine. 2016 Feb;4(1):9-13. doi: 10.1016/j.cpme.2015.12.001.
4. Bactericidal Efficacy of Cold Plasma at Different Depths of Infected Root Canals In Vitro.
Herbst SR, Hertel M, Ballout H, Pierdzioch P, Weltmann KD, Wirtz HC, Abu-Sirhan S, Kostka E, Paris S, Preissner S.
Open Dent J. 2015 Dec 31;9:486-91. doi: 10.2174/1874210601509010486.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Priv.-Doz. Dr. Saskia Preissner. Ihre Unterstützung und ständige Bereitschaft bei offenen Fragen zu helfen haben maßgeblich zum Gelingen beigetragen. Die Zusammenarbeit hat mir neben zahlreichen fachlichen Erkenntnissen auch sehr viel Freude bereitet.

Zudem möchte ich mich bei der gesamten Plasma-Arbeitsgruppe für die konstruktive Zusammenarbeit und die schöne Zeit bedanken.

Meiner Familie möchte ich für die fortwährende Unterstützung und das mir entgegengebrachte Verständnis danken.