

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

DISSERTATION

Kaltes atmosphärisches Plasma zur Elimination
therapieresistenter Mikroorganismen zur adjuvanten Behandlung
Medikamenten-assoziiierter Knochennekrosen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Shady Abu-Sirhan

aus Hamburg

Datum der Promotion: 02.03.2018

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract	3
2. Einführung	5
2.1 Einsatz antiresorptiver Medikamente	5
2.2 Entstehung Medikamenten-assoziiertes Knochennekrosen	6
2.3 Therapeutische Konzepte und ihre Grenzen	7
2.4 Wirkungsprinzip kalten atmosphärischen Plasmas	8
2.5 Zielstellung	9
3. Methodik	9
3.1 Modelle infizierter dentaler und ossärer Strukturen	9
3.2 Bakterielle Besiedelung	10
3.3 Behandlung mit kaltem atmosphärischen Plasma	11
3.4 Probengewinnung in unterschiedlichen Tiefen	12
3.5 Bildgebende Verfahren	13
3.6 Quantitative Auswertung	14
4. Ergebnisse	14
4.1 Oberflächendekontaminationswirkung.....	14
4.2 Tiefenwirkung in dentalen und ossären Strukturen	15
5. Diskussion	15
5.1 Bewertung der Oberflächendekontamination	15
5.2 Probleme in der Tiefenwirkung	16
5.3 Limitationen der Modelle	16
5.4 Zukünftige klinische Relevanz	17
6. Literatur	18
7. Eidesstattliche Versicherung	21
8. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	23
9. Lebenslauf	44
10. Publikationsliste	45
11. Danksagung	46

1. Abstract

Deutsch

Einleitung: Die Therapie Medikamenten-assoziiertes Knochennekrosen stellt Kliniker vor umfangreiche Herausforderungen, insbesondere vor dem Hintergrund der Superinfektion dieser Areale. Die bakterizide Wirkung von kaltem atmosphärischen Plasma (CAP) auf der Haut ist in zahlreichen Studien belegt worden. Im Mund-, Kiefer-, Gesichtsbereich fehlen zum Teil noch geeignete Methoden zur Biofilmbekämpfung. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wirkung von CAP auf komplexen dentalen, ossären und alloplastischen Strukturen *in vitro* überprüft werden.

Methodik: Zunächst erfolgte die Herstellung von Modellen aus porcinen Knochen, Implantaten und Wurzelkanälen mit anschließender Kultivierung von Biofilmen auf deren Oberflächen. In der ersten Versuchsreihe wurde die bakterizide Wirkung von CAP in verschiedenen Knochentiefen untersucht. Je drei infizierte Knochenproben wurden vertikal gestapelt und anschließend behandelt (Kontrollgruppe: Spülung mit 5 ml 0,9% NaCl, CHX-Gruppe: Spülung mit 5 ml Chlorhexidindigluconatlösung (CHX), CAP-Gruppe: CAP-Anwendung für 60 s). Die zweite Versuchsreihe bestand in der Behandlung von inkubierten Implantaten. Auch hier wurden die Implantate mit verschiedenen Dekontaminationsmethoden (Kontrollgruppe: Spülung mit 5 ml 0,9% NaCl, Laser-Gruppe: Behandlung der Proben mit einem Dioden-Laser für 60 s, CAP-Gruppen: CAP-Anwendung für 60 s bzw. 120 s) behandelt. Ziel der letzten Versuchsreihe war die Wirkung von CAP in verschiedenen Tiefen infizierter Dentintubuli. Es erfolgte die Behandlung der Wurzelkanäle in der Kontrollgruppe (Spülung mit 5 ml 0,9% NaCl), der CHX-Gruppe (Spülung mit 5 ml CHX), der CAP-Gruppe (CAP-Anwendung für 60 s) sowie einer Kombinationsgruppe (CAP+CHX). Die quantitative Auswertung erfolgte mittels Auszählung Kolonie bildender Einheiten (CFUs).

Ergebnisse: Insgesamt waren die logarithmierten medianen CFU/ml-Werte in allen Versuchen (Knochen: 0-9000 μm , Implantate, Wurzelkanäle: 0-800 μm) im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant niedriger ($p \leq 0,05$, Mann-Whitney U / Kruskal-Wallis Test). Ergebnisse zeigten signifikante Unterschiede in der mittleren Knochenschicht (3000-6000 μm), bei Vergleich der CAP-Gruppe zu den anderen Gruppen (CAP vs. CHX: $p = 0,007$, CAP vs. C: $p = 0,035$). Auch in der tiefen Schicht (6000-9000 μm) zeigten sich signifikante Unterschiede (CAP vs. CHX: $p = 0,027$). Die Ergebnisse der Implantatversuche zeigen eine signifikante Keimreduktion der CAP-Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe (CAP60 vs. C: $p = 0,012$, CAP120 vs. C: $p = 0,024$). Letztlich waren die Werte der Kombinationsgruppe (CAP+CHX) in der oberflächlichen (0-300 μm) und tiefen Dentinschicht (500-800 μm) signifikant effektiver als die, der restlichen Gruppen ($p \leq 0,01$). In allen anderen Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Schlussfolgerung: CAP stellt eine vielversprechende Ergänzung in der Dekontamination komplexer Oberflächen im Mund-, Kiefer-, Gesichtsbereich dar und sollte daher in klinischen Studien weiter untersucht werden.

English

Introduction: The therapy of medication-related osteonecrosis remains a challenge for clinicians, especially regarding superinfection of affected areas. The bactericidal efficacy of cold atmospheric plasma (CAP) on skin has been proven in many studies. In the oral and maxillofacial region, appropriate methods for biofilm control are still missing. The aim of this work was to evaluate the effect of CAP on complex surfaces of the oral cavity *in vitro*.

Methods: Specimen of porcine bone, implants, root canals were produced and biofilms were cultivated on their surfaces. The aim of the first investigation was to study the bactericidal efficacy of CAP in different depths of bone. Three samples were vertically stacked and subsequently treated (control group: rinsing with 5 ml 0,9% NaCl, CHX group: rinsing with 5 ml Chlorhexidine digluconate (CHX), CAP group: CAP application for 60 s). In the second study infected implant surfaces were treated with different decontamination methods (control group: rinsing with 5 ml 0,9% NaCl, Laser group: diod laser applicator for 60 s, two CAP groups: CAP application for 60 s and 120 s). In the third study the effect of CAP in different depths of infected dentinal tubules was examined. The infected root canals were treated in different groups (control group: rinsing with 5 ml 0,9% NaCl, CHX group: rinsing with 5 ml CHX, CAP group: CAP application for 60 s, combination group: rinsing with 5 ml CHX and 60 s CAP application). Colony-forming units were counted to estimate bacterial reduction.

Results: Overall, log median CFU/ml of CAP were significantly lower in all experiments (bone: 0-9000 μm , implants, root canals: 0-800 μm) when compared to the control groups ($p \leq 0,05$, Mann-Whitney U / Kruskal-Wallis Test). In the mid bone layer (3000-6000 μm), the results of the CAP group were significantly different compared to the other groups (CAP vs. CHX: $p = 0,007$, CAP vs. C: $p = 0,035$). Also the deep layer (6000-9000 μm) showed significant differences compared to the CHX group (CAP vs. CHX: $p = 0,027$). The results of the implant trials revealed a significant bacterial reduction compared to the control group (CAP60 vs. C: $p = 0,012$, CAP120 vs. C: $p = 0,024$). Significant differences in the results of the root canal trial in the superficial (0-300 μm) and deep layer (500-800 μm), compared to the other groups, ($p \leq 0,01$) were observed. Among the other groups, no significant differences were observed.

Conclusion: CAP appears to be a promising approach in the decontamination of complex surfaces in the oral and maxillofacial region. Therefore, CAP should be further investigated in clinical trials.

2. Einführung

2.1 Einsatz antiresorptiver Medikamente

Die Gruppe der antiresorptiven Medikamente besteht im Wesentlichen aus zwei großen Substanzgruppen. Auf der einen Seite die zu den Pyrophosphat-Analoga gehörenden Bisphosphonate (BP), die wiederum in Aminobisphosphonate (z.B. Alendronat, Zoledronat) und Nicht-Aminobisphosphonate (z.B. Etidronat, Tiludronat) eingeteilt werden [1]. Auf der anderen Seite Denosumab, ein monoklonales Antikörperpräparat, welches mit hoher Affinität an RANKL (receptor activator of NF- κ B) bindet und dadurch positiv in den Knochenstoffwechsel eingreift [2-4].

Der Einsatz von Bisphosphonaten umfasst die Behandlung von Knochenstoffwechselstörungen wie der Osteoporose, Morbus Paget, malignen Erkrankungen in Form des multiplen Myeloms, sowie skelettalen Komplikationen maligner Tumoren und der damit verbundenen Hyperkalziämie [5-7]. Chemisch gesehen unterscheiden sich Bisphosphonate von Diphosphonaten durch die Substituierung des zentralen Sauerstoffatoms durch ein Kohlenstoffatom in der P-O-P Bindung. Dadurch kann es nicht mehr durch die enzymatische ATP-Hydrolyse gespalten werden. Dies erklärt die lange Halbwertszeit der Bisphosphonate im Knochen von bis zu elf Jahren [8]. Die biologischen und biochemischen Eigenschaften der verschiedenen Bisphosphonate kommen durch die Anlagerung der Basiskette an das zentrale Kohlenstoffatom zustande. Diese kann aliphatische Seitenketten, Halogene, Aminogruppen oder stickstoffhaltige Heterozyklen enthalten. Der zweite Rest am C-Atom ist eine Hydroxylgruppe. Enthält die Basiskette Stickstoffgruppen, wird die Wirksamkeit des Bisphosphonats gesteigert, jedoch auch dessen Toxizität und damit die Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer Osteonekrose [9, 10]. Bisphosphonate können oral oder intravenös verabreicht werden. Die intravenöse Gabe erzielt eine höhere Effizienz, jedoch steigt auch die Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer Medikamenten-assoziierten Konchennekrose der Kiefer (MRONJ). Die Inzidenz bei intravenöser Gabe liegt bei 5-10% [7], bei oraler Gabe bei 0,1% [11].

BP lagern sich bevorzugt, bedingt durch die hohe Affinität zu Hydroxylapatit, an der Knochenoberfläche im Bereich der Resorptionslakunen von Osteoklasten an, besonders in Regionen mit hoher Knochenumbaurate, wie zum Beispiel dem Kieferknochen. Werden diese Bereiche durch die Osteoklasten abgebaut, gelangen die BP in das Zellinnere und entfalten ihre Wirkung. Bisphosphonate hemmen die Funktion und Rekrutierung, sowie die Adhäsion der Osteoklasten. Dadurch kommt es zu einer verminderten

Knochenresorption. Unterschieden werden die Wirkungen aminohaltiger und Nicht-aminohaltiger Bisphosphonate. Die Nicht-Aminobisphosphonate werden weiter abgebaut, deren toxische Zwischenprodukte beeinflussen den Zellmetabolismus und induzieren die Apoptose der Osteoklasten. Nicht-Aminobisphosphonate wirken nur auf reife Osteoklasten. Die Wirkung der Aminobisphosphonate ist komplexer und eher dosisabhängig. Ihre Wirkung beruht auf der Hemmung der Farnesyl-Pyrophosphat-Synthetase, einem Schlüsselenzym, des Mevalonsäure-Stoffwechsels. Sie wirken sich auch auf die Differenzierung, Proliferation und Migration von unreifen Osteoklasten aus [1, 12, 13]. Der therapeutische Nutzen der BP resultiert in einer positiven Bilanz im Knochenstoffwechsel („bone remodeling“) und die dadurch höhere Knochendichte. Voranschreitende Osteolysen werden in ihrer Entwicklung eingedämmt und die tumorbedingte Osteoklastenaktivität normalisiert sich [4, 14].

2.2 Entstehung Medikamenten-assoziiertes Knochennekrosen

Der Zusammenhang zwischen BP und dem Auftreten von Knochennekrosen in Ober- und Unterkiefer wurde erstmals 2003 beschrieben [15].

Die MRONJ wird definiert als mehr als acht Wochen freiliegender, nicht verheilender Knochen in der Mundhöhle, welcher im zeitlichen Zusammenhang mit einer antiresorptiven Therapie unter Ausschluss einer Radiotherapie im Kiefer- Gesichtsbereich steht [11, 16, 17].

Die Ätiopathogenese der MRONJ ist nicht eindeutig geklärt. Die meisten Studien sehen den Zusammenhang in der Wirkung der BP auf Osteoklasten und der damit reduzierten Umbaurate des Knochens. Des Weiteren wird der Zusammenhang zwischen BP und dem Epithel der Oralmukosa diskutiert [18]. Die im Knochen eingelagerten BP sollen eine toxische Wirkung auf das Epithel der Mukosa haben und dadurch die Wundheilung inhibieren. Der freiliegende Knochen bleibt exponiert und wird nekrotisch.

In anderen Studien wurde der antiangiogenetische Effekt der BP untersucht, welcher eine mögliche Erklärung für die Entstehung der MRONJ beschreibt [19, 20]. Es wird angenommen, dass die fehlende Vaskularisierung die Entstehung von Knochennekrosen begünstigt.

Weitere Risikofaktoren könnten Komorbiditäten (z.B. Diabetes), Rauchen, Alkoholabusus, mangelnde Mundhygiene und Immunsuppression unter Chemo- und Glukokortikoidtherapie sein [21]. Auch ein Zusammenhang zwischen bestimmten Erregergrup-

pen (Actinomyceten) und der MRONJ wird diskutiert. Vor allem *Actinomyces israelii* Spezies wurde bei vielen Patienten mit MRONJ nachgewiesen [22]. Jedoch stellt sich die Frage, ob diese zur Entstehung von Osteonekrosen beitragen oder sich erst im Verlauf der Erkrankung in den nekrotischen Gebieten anlagern [22, 23].

2.3 Therapeutische Konzepte und ihre Grenzen

Bevor man beim klinischen Befund konkrete Hinweise auf eine Osteonekrose findet, können sich bereits bestimmte Symptome manifestieren. Zu diesen gehören diffuse Zahnschmerzen, Zahnbeweglichkeit, Schleimhautschwellungen, Rötungen der Schleimhaut und Ulzerationen. Diese Symptome treten oft nach oralchirurgischen Eingriffen ein, können aber auch spontan entstehen [25]. Im weiteren Verlauf können sich weitere Symptome manifestieren wie z.B. foeter ex ore, intra- und extraorale Fisteln, pathologische Frakturen der Maxilla und/oder Mandibula bis hin zu Sensibilitätsstörung der Unterlippe durch Kompression des Nervus alveolaris inferior [15-17].

Die amerikanische Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (AAMOS) teilt die MRONJ in verschiedene Stadien (Stadium 0-3) ein und gibt adäquate Therapiemaßnahmen für jedes Stadium. Die Unterteilung orientiert sich an der Größe der Läsion und hat direkten Einfluss auf die Behandlungsmaßnahmen.

Stadium 0 wird beschrieben durch keine sichtbaren Läsionen. Jedoch weisen oben beschriebene unspezifische klinische Symptome und Befunde, röntgenologische Aufnahmen auf Osteonekrosen hin. Behandlungsmittel der Wahl ist in diesem Fall ein systemisches Management unter Verwendung von Schmerzmitteln sowie Antibiotika. Das Stadium 1 weist freiliegenden, nekrotischen Knochen und/oder Fisteln auf. Die Patienten reagieren auf Sondierung asymptomatisch und es zeigen sich keine Anzeichen einer Infektion. Hier sollte eine antibakterielle Mundspüllösung eingesetzt werden. Zudem sollte eine regelmäßige Nachsorge alle 3 Monate und Aufklärung des Patienten erfolgen, sowie die Indikation der BP-Therapie evaluiert werden. Im Stadium 2 klagen die Patienten zusätzlich über Schmerzen wegen der bestehenden Entzündung und es kann zu Pusaustritt kommen. In diesem Stadium gehört zu der Behandlungsstrategie die systemische Behandlung, antibakterielle Mundspüllösung und ein chirurgisches Debridement, um eine Linderung der Infektion zu erreichen. Das Stadium 3 umfasst die gleichen Symptome, wie im vorigen Stadium und weist zusätzlich eines der folgenden Kriterien auf: pathologische Fraktur, extraorale Fistel, Mund-Antrum-Verbindung oder Os-

teolyse, die sich bis zum unteren Rand des Unterkiefers oder Sinusbodens ausbreitet. Therapeutisch sollte auch in diesem Stadium eine antibakterielle Mundspülung, Antibiotikagabe und Schmerztherapie erfolgen. Zudem ist ein chirurgisches Debridement angezeigt. Um eine langfristige Linderung der Schmerzen und Infektion zu erreichen, sollte eine Resektion des betroffenen Knochenareals in Erwägung gezogen werden [25].

Der Einsatz von Antibiotika in den verschiedenen Stadien der MRONJ zielt auf die Elimination der sekundär auftretenden Infektion des nekrotischen Knochens hin. Infiziert sich der nekrotische Knochen, erschwert dies die Behandlung und verstärkt die auftretenden Symptome.

Einige Studien haben ergeben, dass sich am nekrotischen Knochen strukturierte Biofilme bilden, welche für das Versagen von Antibiotika verantwortlich gemacht werden [27-29]. Das chirurgische Vorgehen umfasst Debridement, marginale und segmentale Resektionen. Oft ist es schwierig, gesunden von kranken Knochen zu unterscheiden, wodurch sich die Rezidivrate erhöht und eine adäquate Wundheilung erschwert [26].

2.4 Wirkungsprinzip kalten atmosphärischen Plasmas

Physikalisches Plasma stellt neben fest, flüssig und gasförmig den vierten Aggregatzustand dar und wird definiert als ein partiell oder vollständig ionisiertes Gas. Erstmals wurde ionisiertes Gas von Irvine Langmuir (1928) als „Plasma“ bezeichnet. Plasmen enthalten Elektronen, geladene sowie ungeladene Ionen und Moleküle. Des Weiteren werden Plasmen über ihre Temperatur, verschiedene Arten emittierter Strahlung (z.B. UV-Strahlung, sichtbares Licht), des vorherrschenden Drucks und der Fähigkeit zur Induktion elektrischer Felder charakterisiert [30]. Eingeteilt werden Plasmen in thermisches bzw. heißes Plasma und nicht-thermisches bzw. kaltes Plasma. Bei weitgehender bis vollständiger Ionisation entsteht thermisches bzw. heißes Plasma. Erfolgt nur eine partielle Ionisierung, entsteht nicht-thermisches bzw. kaltes Plasma. Zur Erzeugung eines Plasmas können entweder Umgebungsluft, künstliche Gasgemische (Ar/O₂) oder reine Gase (Ar, He, Ne) benutzt werden [30]. Die Wirkung des Plasmas scheint nicht nur durch die chemische Zusammensetzung des eingesetzten Gases zu variieren, sondern ist auch von der Applikationsdauer, der Applikationsform, dem untersuchten Gewebe und dem umgebenden Milieu (Suspension/adhärente Zellschicht) abhängig [30].

Es kommt zu einer Interaktion zwischen Materie und den entstehenden aktiven Komponenten des Plasmas. Vorrangig wären die UV-Strahlung sowie reaktiven Sauerstoff-

und Stickstoffspezies (ROS, NOS) zu nennen. Studien haben die hohe Effektivität von CAP in der Inaktivierung von Mikroorganismen gezeigt [31-34]. Resistenzen sind keine bekannt, jedoch unterscheidet sich die Wirksamkeit zwischen verschiedenen Erregern [35, 36]. Demensprechend hat sich sogar die Wirksamkeit im Einsatz gegen multiresistente Erreger gezeigt [37, 38].

Das in unseren Versuchen verwendete Plasmagerät kINPen-Med® (neoplas tools, Greifswald, Deutschland), erzeugt CAP über eine indirekte Quelle, einen so genannten Plasma-Jet und ist für die Benutzung am Menschen zugelassen. Zwischen zwei Elektroden wird ein Plasma durch zugefügten hochfrequenten Wechselstrom ($U = 2-6 \text{ kV}$, $f = 1,1 \text{ MHz}$) erzeugt und über ein Gas (Argon), welches von extern über eine Kapillare zugeführt wird, weitergeleitet. Der Gasstrom liegt bei $4,3 \text{ sl/min}$ und die vorgeleitete Energie liegt bei $60 \text{ J / cm}^2 \cdot \text{min}$ [30].

2.5 Zielstellung

Ziel der Untersuchung war Überprüfung der Anwendungsmöglichkeiten von CAP im Mund-, Kiefer-, Gesichtsbereich in der Therapie Biofilm-assoziiertes oraler Erkrankungen *in vitro*.

Hierfür wurden Hartgewebe (Wurzelkanäle und porciner Alveolarknochen), sowie alloplastisches Material (Implantatoberflächen) ausgewählt. Dabei sollte die bakterizide Wirkung auf der Oberfläche und in der Tiefe evaluiert werden.

3. Methodik

3.1 Modelle infizierter dentaler und ossärer Strukturen

Knochenproben

Die Gewinnung der zylinderförmigen, im Durchmesser 4 mm langen, xenogenen, kortiko-spongiösen Knochenproben (D2 Qualität, nach Mosch et al. [39]) erfolgte mittels eines Trepanbohrers (Trepanbohrer $\varnothing 4,0 \text{ mm}$, USTOMED Instrumente, Tuttlingen, Deutschland) aus sieben Unterkieferhälften von vier industriell geschlachteten, sieben Monate alten Schweinen unter ständiger Kühlung mit 0,9% NaCl-Lösung. Anschließend wurden alle Proben für 18 Stunden in 100 ml 30% H_2O_2 überführt um das Knochenmark zu entfernen. Danach wurden die Proben gespült (50 ml, 0,9% NaCl, 120 s), in 3 mm lange Stücke gesägt und letztlich alle 72 Knochenproben bei 121°C autoklaviert. Die

Proben wurden dann in 30 ml *S. mitis* Kulturen über 24 Stunden bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen inkubiert um einen Biofilm entstehen zu lassen. Für den Versuchsaufbau wurden Schablonen aus Kunststoffblöcken (Technovit 4071, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland) mit den Maßen 1,5 x 5 x 8 cm angefertigt.

Implantate

Insgesamt zweiunddreißig, zweiteilige Titanimplantate mit einer sandgestrahlten, Säurebehandelten, hydrophilen Oberfläche und einem 0,5 mm maschinellen Gewinde (Tiny Implantat, 2,5 x 13 mm, BTI Biotechnology Institute, Minão, Spain, REF: IRT2513) wurden in je 1 ml *S. mitis* Kultur bei 37 °C über 84 Stunden unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Jedes Implantat wurde anschließend mit einem Einsetzpfosten versehen und anschließend an ein Handstück befestigt (Sirona Implant, Sirona, Wals bei Salzburg, Österreich), welches wiederum an einem justierbaren Arbeitstisch befestigt ist. Mit diesem Tisch lassen sich die Implantate kontrolliert rotieren und Vorwärtsbewegen.

Wurzelkanäle

Insgesamt 32 Unterkiefer-Prämolaren mit geradem Wurzelverlauf und runder Wurzelform, ohne Risse, Karies oder Obliterationen, mit einem minimalen Kanaldurchmesser von 0,3 mm wurden ausgewählt. Zu Beginn wurden die Proben apikal 3 mm gekürzt und dekontaminiert, wodurch 8 mm lange Wurzelkanäle entstanden. Der minimale apikale Wurzeldurchmesser sollte 1 mm nicht unterschreiten. Um einen standardisierten Abtrag zu gewährleisten, wurden die Kanäle mittels Gates-Glidden Bohrer Nr. I (0,5 mm) aufbereitet. Anschließend wurden die Proben in durchsichtigen Acryl-Kunststoff eingebettet, um eine geschlossene Wurzeloberfläche zu simulieren. Letztlich erfolgte die Versiegelung der apikalen und koronalen Oberfläche der Proben mittels eines Adhäsives.

3.2 Bakterielle Besiedelung

Ossäre Strukturen & Implantate

Für die Versuche am Knochen und an den Implantaten wurde zu Beginn die Kultivierung von *Streptococcus mitis* (DSM 12643) auf Columbia Agarplatten (Sifin, Berlin, Deutschland) über 24 Stunden bei 37°C unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Anschließend erfolgte die Übertragung von *S. mitis* in ein flüssiges Medium, einer Herz-Hirn-Boullion (BHI) (Sifin, Berlin, Deutschland). Die BHI wurde mit 5g/l Hefeextrakt (Yeast Extract Sevrabacter, Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) und 1g/l L-Cystein (Sigma Aldrich, St. Louis. MO, USA) vor dem Autoklavieren und 100mg/l L-

Hemin sowie 100mg/l Vitamin K danach supplementiert. Die Übertragung von *S. mitis* in die BHI erfolgte schrittweise bis photometrisch (Novaspec II Visible Spectrophotometer, GE Healthcare, Solingen, Deutschland) eine optische Dichte von 1.0 bei 600 nm erreicht war. Die flüssige Kultur wurde dann in anaeroben Behältern, welche mit Gasbildenden Systemen (Oxoid, AnaeroGen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) ausgestattet und bei 37°C gelagert. Die Kontrolle der anaeroben Bedingungen erfolgte mittels Sauerstoff-Indikatorstreifen (Oxoid Anaerobic Indicator, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

Dentale Strukturen

Zu Beginn wurden *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212, DMSZ, Braunschweig, Deutschland) Kulturen auf Columbia Agarplatten über 24 Stunden und bei 37°C unter sterilen, anaeroben Bedingungen kultiviert. Zur Herstellung einer flüssigen Kultur erfolgte die Übertragung von *E. faecalis* in eine sterile BHI bis eine optische Dichte von 0,5 bei 600 nm photometrisch gemessen wurde. Die darauffolgende Lagerung erfolgte in anaeroben Behältern bei 37°C.

3.3 Behandlung mit kaltem atmosphärischen Plasma

Knochenproben

Drei Gruppen je acht Proben:

- I. C (Kontrollgruppe): Spülen der Probe mittels 0,9 % NaCl (5 ml) für 60 s
- II. CHX: Spülen der Probe mittels 0,2% Chlorhexidin (CHX; Chlorhexamed Forte, GlaxoSmithKline, Bühl, Deutschland) (5 ml) für 60 s
- III. CAP: Behandlung der Probe mittels Plasmajet (KINPen Med, Neoplas Tools, Greifswald, Deutschland) mit 4,3 bar/Argon Flussrate 4,3 slm für 60 s

Implantate

Vier Gruppen je acht Proben:

- I. C (Kontrollgruppe): Spülen der Probe mittels 0,9 % NaCl (5 ml) für 60s,
- II. Dioden-Laser (DL): Behandlung der Probe mittels GaAlAs Dioden-Laser ($\lambda = 980 \text{ nm}$) (Lina-10D, Intros Medical Laser, Heilbad Heiligenstadt, Deutschland)
- III. CAP60: Behandlung der Probe mittels Plasma für 60 s
- IV. CAP120: Behandlung der Probe mittels Plasma für 120 s

Während der Applikation von Laser und Plasma wurden die Proben kontinuierlich mit 1% NaCl (5ml) gespült um eine Austrocknung der Implantatoberflächen zu vermeiden.

Wurzelkanäle

Initial wurden die Wurzelkanäle aller Proben mit jeweils 5 ml 0,9 % NaCl gespült.

Vier Gruppen je acht Proben:

- I. C (Kontrollgruppe): keine weitere Behandlung
- II. CHX: Spülen der Probe mit 2% CHX (5 ml), 30 s Ultraschallaktivierung
- III. CAP: Behandlung der Probe mittels Plasmajet für 60 s
- IV. CAP + CHX: Spülen der Probe mit 2% CHX (5 ml), 30s Ultraschallaktivierung, anschließend Behandlung der Probe mittels Plasmajet für 60 s

3.4 Probengewinnung in unterschiedlichen Tiefen

Knochenproben

Nach Beendigung der Probenbehandlung in den verschiedenen Gruppen erfolgte die Entfernung der in den Slots vertikal gestapelten Proben (drei Proben je Slot), welche die verschiedenen Tiefen darstellen (I 0-3000 µm, II 3000-6000 µm, III 6000-9000 µm). Jede Probe wurde anschließend mit einer definierten Kraft von 20 N viermal zerkleinert und die gewonnenen Knochenpartikel in je einen 1 ml BHI überführt und dann für 60s gevortext um die Bakterien aus den Knochenpartikeln in die flüssige Suspension zu überführen.

Implantate

Zur Gewinnung des Biofilms fanden folgende Methoden Einsatz: direkte Ultraschallbehandlung (VDW Ultra, VDW, München, Deutschland), Bürsten der Implantatoberfläche (Orcellex Brush Rovers Medical Devices KV Oss, Niederlande) und indirekte Ultraschallbehandlung (Bactosonic, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland).

Wurzelkanäle

Nach Behandlung der Proben erfolgte die schritt weise Gewinnung von Dentin in verschiedenen tiefen wie folgt:

1. Zirkulärer Abtrag von 300 µm Dentin mit einem Peeso reamer Nr. III (Ø 1,1 mm)
2. Zirkulärer Abtrag bis 500 µm Dentin mit einem Peeso reamer Nr. V (Ø 1,5 mm)
3. Zirkulärer Abtrag bis 800 µm Dentin mit einem Rosenbohrer (Ø 2,1 mm)

3.5 Bildgebende Verfahren

Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM)

Proben aller Versuche wurden unter dem Raster-Elektronen-Mikroskop (REM) (CamScan Maxim 2040S, CamScan Electron Optics, Cambrigeshire, UK) dargestellt. Alle Aufnahmen wurden mit einer Beschleunigungsspannung von 15 kV und einer bis zu 3000-fachen Vergrößerung aufgenommen. Zudem wurden alle Proben vor den Aufnahmen mit Goldpartikel bestäubt. Zur Beurteilung der adhärennten Bakterien auf Knochenoberflächen wurden zwei porcine Knochenproben untersucht. Eine Probe vor bzw. nach Inkubation in der *S. mitis* Bouillon wie oben beschrieben. Zur Visualisierung adhärennter Bakterien auf Implantatoberflächen wurden je ein steriles und ein inkubiertes Implantat (4,25 × 15 mm, BTI Biotechnology Institute, Minão, Spanien, REF: IIPU4215) dargestellt. Letztlich wurde zur Darstellung der Penetrationstiefe von Bakterien in Dentintubuli zwei Zähne der Längsachse nach halbiert und unter dem REM betrachtet.

Konfokale Laser Raster Mikroskopie (CLSM)

Zur exemplarischen Darstellung bakterieller Besiedlung der Implantatoberfläche nach Inkubation in einer *S. mitis* Bouillon wurde ein duales Fluoreszenz- und Konfokales Laser-Raster-Mikroskop (LSM 700, Jena, Deutschland) (CLSM) eingesetzt. Eine flache 3,5 × 1 mm große Probe, welche von einem Implantat gewonnen wurde, diente als Untersuchungsobjekt. Nach Fixierung der Probe auf einen Objektträger, erfolgte die Inkubation wie oben beschrieben. Vor der Darstellung unter dem Mikroskop wurde die inkubierte Probe mit 50 µl eines Flourescein-Ethidium Bromid Farbstoffes beträufelt. Die Darstellung erfolgte unter 50-facher Vergrößerung.

Fluoreszenzmikroskopie

Das Fluoreszenzmikroskop wurde zur Darstellung von vier Implantaten, welche entsprechend der Versuchsgruppen (1-4) inkubiert und behandelt wurden, angewandt. Ein fünftes steriles Implantat diente als Kontrolle. Nach Fixierung der Implantate auch Objektträgern, wurde jedes Implantat mit eine live/dead Farbstoff (Flourescein-Ethidium Bromid) behandelt. Die Darstellung unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte nach fünfminütiger Wartezeit mit 40-facher Vergrößerung.

3.6 Quantitative Auswertung

CFU count

Anschließend wurde für jede Probe eine Verdünnungsreihe angelegt und je 100 µl jeder Verdünnung auf eine Agarplatte ausgestrichen. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen erfolgte ein CFU-count der Agarplatten um eine quantitative Aussage zur Bakterienzahl treffen zu können. Die Identifikation von *S. mitis* und *E. faecalis* wurde durch eine Gram-Färbung und ein biochemisches Identifikationssystem (API Rapid ID32 Strep, bio Mérieux, Nürtingen, Deutschland) bestätigt.

Statistik

Die Medianwerte der Kolonie bildenden Einheiten (CFU/ml) wurden bestimmt und anschließend logarithmiert. Statistische Analysen wurden mittels Kruskal-Wallis und Mann-Whitney U Test (IBM SPSS ® 21,0, IBM Armonk, IL, USA) durchgeführt, um Signifikanzen zu bestimmen. Werte mit $p \leq 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Oberflächendekontaminationswirkung

Der mediane CFU/ml Wert für CAP weist in der oberflächlichen Knochenschicht (0 – 3000 µm) (I) niedrigere Werte im Vergleich zur CHX- bzw. Kontrollgruppe (C) auf. Jedoch weisen die Werte keine signifikanten Unterschiede auf (CAP vs. CHX: $p = 0,494$, CAP vs. C: $p = 0,461$). Auch zwischen Werten der CHX- und Kontrollgruppe besteht keine Signifikanz (CHX vs. C: $p = 0,958$). Im Implantatversuch zeigen sich signifikante Unterschiede der CFU/ml-Werte, in den mittels CAP behandelten Proben (CAP60 vs. C: $p = 0,012$, CAP120 vs. C: $p = 0,024$). Die unterschiedlichen Behandlungszeiten zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Keimreduktion (CAP60 vs. CAP120: $p = 0,958$). Die Werte der Lasergruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe sind nicht signifikant unterschiedlich (DL vs. C: $p = 0,674$). Die Ergebnisse des Wurzelkanalversuchs zeigten in der oberflächlichen Schicht (0-300 µm) eine signifikant höhere Effektivität im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p \leq 0,01$). Die Werte der Kombinationsgruppe (CAP+CHX) sind in der oberflächlichen Schicht signifikant effektiver als die, der CAP bzw. CHX Gruppe ($p \leq 0,01$). In allen anderen Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

4.2 Tiefenwirkung in dentalen und ossären Strukturen

Die mediale log CFU/ml CAP-Werte nach Eradikation in der mittleren Knochenschicht (3000-6000 µm) (II) zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Werten der anderen Gruppen (CAP vs. CHX: $p = 0,007$, CAP vs. C: $p = 0,035$). Hingegen sind die Werte zwischen CHX und C nicht signifikant (CHX vs. C: $p = 0,833$). Wie in den anderen Schichten sind die medianen CFU-Werte der CAP-Gruppe auch in der tiefen Schicht (6000-9000 µm) am niedrigsten. Hier zeigten die Ergebnisse, dass die medianen log CFU/ml-Werte von CAP im Vergleich zur CHX-Gruppe (CAP vs. CHX: $p = 0,027$) signifikant sind. In der mittleren Dentinschicht (300 – 500 µm) ergab sich, dass CAP+CHX und CHX eine ähnlich hohe Effektivität aufweisen ($p \leq 0,01$). Letztlich sind die Werte in der tiefen Schicht (500 – 800 µm), ähnlich in ihrer Signifikanz zur oberflächlichen Schicht. Die Werte aller Versuchsgruppen weisen signifikante Unterschiede zu den Werten der jeweiligen Kontrollgruppen auf ($p \leq 0,01$).

5. Diskussion

5.1 Bewertung der Oberflächendekontamination

Die Ergebnisse des Knochen- und Implantatversuchs in der oberflächlichen Schicht haben gezeigt, dass die medianen CFU/ml-Werte im Vergleich zu den anderen Testgruppen am niedrigsten waren. Im Dentin übertraf die Kombination von CAP+CHX die anderen Gruppen (CAP, CHX, C). Besonders die Werte im Dentin (CAP+CHX) und an der Implantatoberfläche (CAP) zeigten signifikante Unterschiede zu den Werten der jeweiligen Vergleichsgruppen. Vergleicht man die mittlere Dentinschicht von Proben, die mittels CAP alleine und in Kombination mit CHX behandelt wurden mit der oberflächlichen Schicht, so ergeben sich bis 43-mal höhere CFU-Werte. Auch im Knochen weisen die Werte der oberflächlichen Schicht (0-3000 µm) aller Gruppen (CAP, CHX, C) vergleichsweise niedriger CFU-Werte auf als in den tieferen Schichten. Die ähnlichen Werte zwischen CHX und 1% NaCl sind eher auf eine Spülwirkung der Lösungen zurück zu führen, als auf eine antibakterielle Wirkung von CHX. Ein anderer Grund könnte die verminderte Wirkung von CHX auf Bakterien in strukturierten Biofilmen sein. Eine *in vitro* Studie zeigt die verminderte Effektivität von CHX auf verschiedene in Biofilmen eingebettete Bakterien [40]. Im Implantatversuch übertraf CAP die Dioden-Laser Gruppe in der antibakteriellen Wirkung im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant. So zeigen auch die Aufnahmen des Fluoreszenzmikroskops

auf dem Kontrollimplantat überwiegend grüne Bereiche, was für eine dichte Besiedlung lebender Bakterien auf dem Implantat hinweist. Im Gegensatz dazu weisen die behandelten Implantate jedoch eher Bereiche roter Fluoreszenz auf, wobei die mit CAP behandelten Implantate das mit Laser behandelte Implantat übertreffen. Zusammenfassend zeigte sich in allen Versuchen eine gute antibakterielle Wirkung in der oberflächlichen Schicht nach Behandlung mittels CAP.

5.2 Probleme in der Tiefenwirkung

Anders als in der oberflächlichen Dentinschicht, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den tieferen (300-800 µm) Schichten, bei Vergleich der Gruppen von CAP+CHX, CAP und CHX. Jedoch ergaben die Werte aller Gruppen in der tiefen Schicht signifikanten Unterschiede in ihren Werten, verglichen mit den Werten der Kontrollgruppe. Auch die medianen log CFU/ml-Werte aller Versuchsgruppen zeigen insgesamt höhere Werte an, als in der oberflächlichen Schicht. Gründe für die niedrigeren Reduktionsfaktoren von CAP alleine und in Kombination mit CHX in den tieferen Dentinschichten können interindividuelle anatomische Unterschiede der Proben und eine in der Tiefe stärker vorangeschrittene Sklerosierung der Dentintubuli sein [41-43]. Im Gegensatz zu den Dentinproben ergab CAP signifikant niedrigere Werte in tieferen Schichten der Knochenproben, vor allem in der mittleren Schicht (3000-6000 µm). So sind auch hier die medianen log CFU/ml-Werte aller Versuchsgruppen in den tieferen Schichten höher als in der oberflächlichen Schicht. Im Vergleich zu CHX waren die Werte signifikant effektiver in ihrer Tiefenwirkung. Die komplexe dreidimensionale Struktur des Knochens mit seiner porösen Anatomie, könnte die Penetration von Flüssigkeiten erschweren und folglich die antibakterielle Wirkung von CHX in der Tiefe reduzieren. Ein weiterer Grund ist, wie in der oberflächlichen Schicht, die Biofilmbildung [40].

5.3 Limitationen der Modelle

Die Mundhöhle mit ihrer einzigartigen und stark variablen Mundflora, anatomischen Strukturen, dem komplexen Zusammenspiel von verschiedenen Flüssigkeiten (Blut, Speichel, Pus) sowie der immunologischen Antwort des Organismus erschweren die Schaffung von annähernd identischen Bedingungen in experimentellen *in vitro* Versuchen. Damit weitere Erkenntnisse zur antibakteriellen Wirkung von CAP

gewonnen werden können, sind *in vivo* Versuche unumgänglich. Um jedoch eine möglichst weitgehende Annäherung an die realen Gegebenheiten der Mundhöhle zu erzielen wurde zum Beispiel im Knochenversuch darauf geachtet, ausschließlich kortiko-spongiöse Knochenproben (D2 Qualität, nach Misch et al. [39]) zu verwenden, da in der Mandibula primär D1 bzw. D2 Knochen vorkommt.

Natürlich sind die jeweils ausgewählten Modelkeime nicht repräsentativ für die komplexen Biofilme, welche ein weites und sehr variables Keimspektrum beherbergen. Jedoch hat sich in Studien gezeigt, dass CAP unabhängig von mikrobiellen Resistenzen wirkt [30, 44]. Ein weiterer Punkt ist die Erreichbarkeit der zu behandelnden Flächen. Im Implantatversuch zeigten sich keine Unterschiede in den verschiedenen Behandlungszeiten mittels CAP in Bezug auch Effektivität. *In vivo* gilt es zu verifizieren ob die vom Hersteller Angegeben Parameter zu zufriedenstellenden Ergebnissen führen, oder ob durch die schlechte Erreichbarkeit eine längere Behandlungsdauer gewählt werden muss. Auch die im Wurzelkanalversuch verwendeten Proben sind nicht repräsentativ für die mannigfaltigen Variationen verschiedener Wurzelformen, Kanalquerschnitte und -konfigurationen.

5.4 Zukünftige klinische Relevanz

Anhand der gewonnenen Daten, mit Limitation der Versuchsmodelle, scheint die Applikation von CAP ein vielversprechender Ansatz zu Dekontamination von Oberflächen in der Mundhöhle zu bieten. Vor allem unterstützend zu den etablierten Therapieformen kann der Einsatz von CAP in naher Zukunft die Prognose, in Bezug auf Keimreduktion, verbessern. Zum Beispiel in der Behandlung der MRONJ. Dort könnte CAP intraoperativ nach erfolgter Nekrektomie adjuvant eingesetzt werden, um vor Wundverschluss die oberflächlichen Knochenschichten zu Dekontaminieren. In der Endodontie könnte CAP vor allem in Kombination von CHX Einsatz finden. Letztlich müssten um einen Einsatz von CAP in der Periimplantitis-Behandlung zu etablieren *in vivo* Versuche folgen, um die Wirkung auf klinisch relevante Parameter wie z.B. Blutung auf Sondieren (BOP) oder Taschentiefen zu überprüfen. Nicht nur die bakterizide Wirkung ist richtungsweisend für die Etablierung von CAP in klinischen Alltag, sondern auch der positive Effekt auf Wundheilung, Neoangiogenese und Fibroblastenaktivierung [30, 45, 46].

6. Literatur

1. Pfammatter C, Kühl S, Filippi A, and JT. Lambrecht, *Patienten unter Bisphosphonattherapie. Teil 1: Bisphosphonate – chemische Formel, Wirkungsmechanismus, Nebenwirkungen und Risikofaktoren*. Quintessenz, 2011. **62**: p. 795-801.
2. Lacey D. L., Boyle W. J., Simonet W. S., Kostenuik P. J., Dougall W. C., Sullivan J. K., San Martin J., and Dansey R., *Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab*. Nat Rev Drug Discov, 2012. **11**(5): p. 401-19.
3. Stopeck A. T., Lipton A., Body J. J., Steger G. G., Tonkin K., de Boer R. H., Lichinitser M., Fujiwara Y., Yardley D. A., Viniegra M., Fan M., Jiang Q., Dansey R., Jun S., and Braun A., *Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study*. J Clin Oncol, 2010. **28**(35): p. 5132-9.
4. Van den Wyngaert T., Huizing M. T., and Vermorcken J. B., *Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: cause and effect or a post hoc fallacy?* Ann Oncol, 2006. **17**(8): p. 1197-204.
5. Ruggiero S. L. and Mehrotra B., *Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: diagnosis, prevention, and management*. Annu Rev Med, 2009. **60**: p. 85-96.
6. Abu-Id M. H., Acil Y., Gottschalk J., and Kreuzsch T., *[Bisphosphonate-assoziierte Osteonekrose des Kiefers]*. Mund Kiefer Gesichtschir, 2006. **10**(2): p. 73-81.
7. Ryan P., Saleh I., and Stassen L. F., *Osteonecrosis of the jaw: a rare and devastating side effect of bisphosphonates*. Postgrad Med J, 2009. **85**(1010): p. 674-7.
8. Fabio Saccardin Andreas Filippi, Sebastian Kühl, *Antiresorptive Medikamente: Oralmedizinische Konsequenzen und Therapieansätze bei Osteonekrosen des Kiefers*. Quintessenz 2015: p. 691-700.
9. Kathryn L. Kavanagh Kunde Guo, James E. Dunford†, Xiaoqiu Wu, Stefan Knapp, Frank H. Ebetino, Michael J. Rogers, R. Graham G. Russell, and Udo Oppermann, *The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs*. PNAS, 2006. **103**(20): p. 7829–7834.
10. Russell R. Graham G., *Determinants of structure–function relationships among bisphosphonates*. Bone, 2007. **40**(5): p. 21-25.
11. Lo J. C., O’Ryan F. S., Gordon N. P., Yang J., Hui R. L., Martin D., Hutchinson M., Lathon P. V., Sanchez G., Silver P., Chandra M., McCloskey C. A., Staffa J. A., Willy M., Selby J. V., Go A. S., and Predicting Risk of Osteonecrosis of the Jaw with Oral Bisphosphonate Exposure Investigators, *Prevalence of osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure*. J Oral Maxillofac Surg, 2010. **68**(2): p. 243-53.
12. Fleisch Herbert, *Bisphosphonates: Mechanisms of Action*. The Endocrine Society, 1998.
13. Koy S., Schubert M., Koy J., Ney M., Lauer G., and Sabatowski R., *[Bisphosphonate-assoziierte Osteonekrose des Kiefers]*. Schmerz, 2015. **29**(2): p. 171-8.
14. Rogers M. J., Gordon S., Benford H. L., Coxon F. P., Luckman S. P., Monkkonen J., and Frith J. C., *Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates*. Cancer, 2000. **88**(12 Suppl): p. 2961-78.
15. Marx Robert E., *Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic*. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2003. **61**(9): p. 1115-1117.

16. Ruggiero S. L., Dodson T. B., Assael L. A., Landesberg R., Marx R. E., Mehrotra B., American Association of Oral, and Maxillofacial Surgeons, *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--2009 update*. J Oral Maxillofac Surg, 2009. **67**(5 Suppl): p. 2-12.
17. Cesar A Migliorati Michael A Siegel, Linda S Elting, *Bisphosphonate-associated osteonecrosis: a long-term complication of bisphosphonate treatment*. Lancet Oncol, 2006. **7**: p. 508-14.
18. Reid I. R., Bolland M. J., and Grey A. B., *Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity?* Bone, 2007. **41**(3): p. 318-20.
19. Wood J., Bonjean K., Ruetz S., Bellahcene A., Devy L., Foidart J. M., Castronovo V., and Green J. R., *Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **302**(3): p. 1055-61.
20. Pabst A. M., Ziebart T., Ackermann M., Konerding M. A., and Walter C., *Bisphosphonates' antiangiogenic potency in the development of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: influence on microvessel sprouting in an in vivo 3D Matrigel assay*. Clin Oral Investig, 2014. **18**(3): p. 1015-22.
21. Advisory Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws*. J Oral Maxillofac Surg, 2007. **65**(3): p. 369-76.
22. Allen M. R. and Burr D. B., *The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data*. J Oral Maxillofac Surg, 2009. **67**(5 Suppl): p. 61-70.
23. Aghaloo T., Hazboun R., and Tetradis S., *Pathophysiology of Osteonecrosis of the Jaws*. Oral Maxillofac Surg Clin North Am, 2015. **27**(4): p. 489-96.
24. Zahrowski J. J., *Comment on the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons statement on bisphosphonates*. J Oral Maxillofac Surg, 2007. **65**(7): p. 1440-1.
25. Ruggiero S. L., *Diagnosis and Staging of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw*. Oral Maxillofac Surg Clin North Am, 2015. **27**(4): p. 479-87.
26. Williams W. B. and O'Ryan F., *Management of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw*. Oral Maxillofac Surg Clin North Am, 2015. **27**(4): p. 517-25.
27. Wanger G., Gorby Y., El-Naggar M. Y., Yuzvinsky T. D., Schaudinn C., Gorur A., and Sedghizadeh P. P., *Electrically conductive bacterial nanowires in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw biofilms*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2013. **115**(1): p. 71-8.
28. Sedghizadeh P. P., Kumar S. K., Gorur A., Schaudinn C., Shuler C. F., and Costerton J. W., *Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy*. J Oral Maxillofac Surg, 2008. **66**(4): p. 767-75.
29. Kumar S. K., Gorur A., Schaudinn C., Shuler C. F., Costerton J. W., and Sedghizadeh P. P., *The role of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaw associated with bisphosphonate therapy*. Curr Osteoporos Rep, 2010. **8**(1): p. 40-8.
30. Haertel B., von Woedtke T., Weltmann K. D., and Lindequist U., *Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing*. Biomol Ther (Seoul), 2014. **22**(6): p. 477-90.
31. Hong Y. F., Kang J. G., Lee H. Y., Uhm H. S., Moon E., and Park Y. H., *Sterilization effect of atmospheric plasma on Escherichia coli and Bacillus subtilis endospores*. Lett Appl Microbiol, 2009. **48**(1): p. 33-7.

32. Ahlfeld B., Li Y., Boulaaba A., Binder A., Schotte U., Zimmermann J. L., Morfill G., and Klein G., *Inactivation of a foodborne norovirus outbreak strain with nonthermal atmospheric pressure plasma*. MBio, 2015. **6**(1).
33. Rutger Matthes Sander Bekeschus, Claudia Bender, , Ina Koban, and Kramer Nils-Olaf Hübner1 Axel, *Pilot-study on the influence of carrier gas and plasma application (open resp. delimited) modifications on physical plasma and its antimicrobial effect against Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus*. GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär, 2012. **7**.
34. Koban I., Holtfreter B., Hubner N. O., Matthes R., Sietmann R., Kindel E., Weltmann K. D., Welk A., Kramer A., and Kocher T., *Antimicrobial efficacy of non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs in vitro - proof of principle experiment*. J Clin Periodontol, 2011. **38**(10): p. 956-65.
35. Han L., Patil S., Keener K. M., Cullen P. J., 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.
36. Klampfl T. G., Isbary G., Shimizu T., Li Y. F., Zimmermann J. L., Stolz W., Schlegel J., Morfill G. E., and Schmidt H. U., *Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest*. Appl Environ Microbiol, 2012. **78**(15): p. 5077-82.
37. Maisch T., Shimizu T., Li Y. F., Heinlin J., Karrer S., Morfill G., and Zimmermann J. L., *Decolonisation of MRSA, S. aureus and E. coli by cold-atmospheric plasma using a porcine skin model in vitro*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e34610.
38. Daeschlein G., Scholz S., Ahmed R., Majumdar A., von Woedtke T., Haase H., Niggemeier M., Kindel E., Brandenburg R., Weltmann K. D., and Junger M., *Cold plasma is well-tolerated and does not disturb skin barrier or reduce skin moisture*. J Dtsch Dermatol Ges, 2012. **10**(7): p. 509-15.
39. Misch C. E., Hoar J., Beck G., Hazen R., and Misch C. M., *A bone quality-based implant system: a preliminary report of stage I & stage II*. Implant Dent, 1998. **7**(1): p. 35-42.
40. Hope C. K. and Wilson M., *Analysis of the Effects of Chlorhexidine on Oral Biofilm Vitality and Structure Based on Viability Profiling and an Indicator of Membrane Integrity*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004. **48**(5): p. 1461-1468.
41. Dong X., Ritts A. C., Staller C., Yu Q., Chen M., and Wang Y., *Evaluation of plasma treatment effects on improving adhesive-dentin bonding by using the same tooth controls and varying cross-sectional surface areas*. Eur J Oral Sci, 2013. **121**(4): p. 355-62.
42. Ivancik J. and Arola D. D., *The importance of microstructural variations on the fracture toughness of human dentin*. Biomaterials, 2013. **34**(4): p. 864-74.
43. Lo Giudice G., Cutroneo G., Centofanti A., Artemisia A., Bramanti E., Militi A., Rizzo G., Favalaro A., Irrera A., Lo Giudice R., and Cicciu M., *Dentin Morphology of Root Canal Surface: A Quantitative Evaluation Based on a Scanning Electronic Microscopy Study*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 164065.
44. Daeschlein G., Napp M., Lutze S., Arnold A., von Podewils S., Guembel D., and Junger M., *Skin and wound decontamination of multidrug-resistant bacteria by cold atmospheric plasma coagulation*. J Dtsch Dermatol Ges, 2015. **13**(2): p. 143-50.
45. Arndt S., Unger P., Wacker E., Shimizu T., Heinlin J., Li Y. F., Thomas H. M., Morfill G. E., Zimmermann J. L., Bosserhoff A. K., 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.
46. Brun P., Pathak S., Castagliuolo I., Palu G., Brun P., Zuin M., Cavazzana R., and Martines E., *Helium generated cold plasma finely regulates activation of human fibroblast-like primary cells*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e104397.

7. Eidesstattliche Versicherung

Ich, Shady Abu-Sirhan, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Kaltes atmosphärisches Plasma zur Elimination therapieresistenter Mikroorganismen zur adjuvanten Behandlung Medikamenten-assoziiertes Knochennekrosen“ selbstständig und ohne nicht offenlegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Shady Abu-Sirhan hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: **Abu-Sirhan S#**, Hertel M#, Preissner S, Wirtz HC, Herbst SR, 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 4(1), 2016, 9-13, doi: 10.1016/j.cpme.2015.12.001

Beitrag im Einzelnen: # geteilte Erstautorenschaft

Mitarbeit bei der Konzeptionierung des Experimental Designs, ausführliche Literaturrecherche, Durchführung der Vorversuche, dabei insbesondere Gewinnung und Testung unterschiedlicher Knochenmaterialien verschiedenen Ursprungs zur Determinierung der endgültigen Knochenproben. Durchführung der Hauptversuche, Mitarbeit bei der Vorbereitung der Proben für bildgebende Auswertung (Färbungen, Entwässerung), Mitarbeit bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse, der Rasterelektronenmikroskopie, der Erstellung von Grafiken und der Verfassung des Papers.

Publikation 2: Herbst SR, Hertel M, Ballout H, Pierdzioch P, Weltmann KD, Wirtz HC, **Abu-Sirhan S**, Kostka E, Paris S und Preissner S, **Bactericidal Efficacy of Cold Plasma at Different Depths of Infected Root Canals In Vitro**, The Open Dentistry Journal, (9), 2015, 486-91, doi: 10.2174/1874210601509010486.

Beitrag im Einzelnen:

Mitarbeit bei der Entwicklung des Experimental Design, der Literaturrecherche, der Durchführung der Vor- und Hauptversuche, insbesondere im mikrobiologischen Labor und bei den Plasmaanwendungen.

Publikation 3: 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**, 9(6), 2016, 637-44, doi: 10.1002/jbio.201500189.

Beitrag im Einzelnen:

Mitarbeit bei der Entwicklung des Experimental Design, der Literaturrecherche, der Durchführung der Vorversuche, dabei insbesondere Untersuchung verschiedener Ablösetechniken, Mitarbeit bei den Hauptversuchen, insbesondere Unterstützung im mikrobiologischen Labor und bei den Plasmaanwendungen.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden

8. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

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

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

Clinical Plasma Medicine, 2015, 2212-8166

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

„Bactericidal efficacy of cold plasma at different depths of infected root canal in vitro.“

Sascha R. Herbst, Moritz Hertel, Husam Ballout, Philipp Pierdzioch, Klaus-Dieter Weltmann, Henrik C. Wirtz, Shady Abu-Sirhan, Eckehard Kostka, Sebastian Paris, Saskia Preissner

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

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

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

Saskia Peissner, Henrik C. Wirtz, Anne-Kristin Tietz, Shady Abu-Sirhan, Sascha R. Herbst, Stefan Hartwig, Philipp Pierdzioch, Andrra Maria Schmidt-Westhausen, Henrik Dommisch, Moritz Hertel

Journal of Biophotonics, 2016, 637-44

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

9. Lebenslauf

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

10. Publikationsliste

Publikationen

1. 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 Jun;4(1), 9-13. doi: 10.1016/j.cpme.2015.12.001
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.
3. 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.
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.

11. Danksagung

Als erstes möchte ich mich herzlichst bei Priv.-Doz. Dr. Saskia Preissner, für die Möglichkeit diese Arbeit zu realisieren, bedanken. Es war eine spannende Zeit mit vielen neuen Erkenntnissen, aber vor allem für die uneingeschränkte Unterstützung, danke ich dir.

Des Weiteren gilt mein Dank Dr. Stefan Hartwig, Priv.-Doz. Dr. Moritz Hertel und allen anderen der AG Plasma. Neben der fachlichen Zusammenarbeit, war es mir eine Freude diese Erfahrung mit euch geteilt zu haben.

Letztlich danke ich meiner lieben Familie. Ohne euch Unterstützung hätte ich es niemals geschafft.