

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR DERMATOLOGIE
PROF. DR. MED. MARK BERNEBURG
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Inaktivierung von unterschiedlichen Biofilmen mittels
Niedrigtemperaturplasma und Untersuchungen zur DNA-Freisetzung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Larissa Singer

2018

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR DERMATOLOGIE
PROF. DR. MED. MARK BERNEBURG
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Inaktivierung von unterschiedlichen Biofilmen mittels
Niedrigtemperaturplasma und Untersuchungen zur DNA-Freisetzung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Larissa Singer

2018

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	apl. Prof. Dr. rer. nat. Tim Maisch
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Wolfgang Buchalla
Tag der mündlichen Prüfung:	03.05.2018

Meinem verstorbenen Papa.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG	4
1.1 Das Phänomen Biofilm	4
1.2 Steckbrief <i>Enterococcus faecalis</i>	5
1.3 Steckbrief <i>Candida albicans</i>	7
1.4 Cold Atmospheric Plasma – was ist das?.....	9
1.5 Anwendung von CAP	11
2 FRAGESTELLUNG	13
3 MATERIAL.....	15
3.1 Mikroorganismen	15
3.2 Kulturmedien.....	15
3.3 Agarplatten	16
3.4 Reagenzien und Chemikalien	16
3.5 Technische Geräte und Hilfsmittel	18
4 METHODEN.....	21
4.1 Kultivierungsverfahren für <i>E. faecalis</i> und <i>C. albicans</i>	21
4.2 Bestimmung der Bakterien-OD und Auszählen von <i>C. albicans</i>	21
4.3 Biofilm-Herstellung.....	23

4.4	Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE)	24
4.5	Toxizitäts-Versuche an <i>E. faecalis</i>	25
4.5.1	CAP	26
4.5.2	CHX	27
4.5.3	UVC.....	27
4.6	Toxizitäts-Versuche an <i>C. albicans</i>	27
4.6.1	CAP	28
4.6.2	CHX	28
4.6.3	UVC.....	28
4.6.4	CAP – Agarplatten-Versuch	28
4.7	Nanodrop-Versuche	29
4.8	Datenanalyse	30
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	32
5.1	Inaktivierung von <i>E. faecalis</i>	32
5.1.1	CAP-Versuche	32
5.1.2	CHX-Versuche	37
5.1.3	UVC-Versuche.....	44
5.1.4	Diskussion der Ergebnisse in Abhängigkeit des Biofilmalters	50
5.2	Inaktivierung von <i>C. albicans</i>	51
5.2.1	CAP-Versuche	51
5.2.1.1	Agarplatten-Versuche	51
5.2.1.2	Biofilm-Versuche.....	52
5.2.2	CHX-Versuche.....	56
5.2.3	UVC-Versuche.....	60
5.3	Überprüfung der mikrobiologischen Vorgänge nach CAP-Behandlung mittels Nanodrop-Versuch	64
5.3.1	Standard-DNA-Reihe	64
5.3.2	Nanodrop bei CAP-behandelten Proben von <i>E. faecalis</i>	65
5.3.3	Einfluss von CHX	67
5.3.4	Diskussion der Ergebnisse	69

6	ZUSAMMENFASSUNG	70
7	AUSBLICK.....	73
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
	LITERATURVERZEICHNIS	V
	DANKSAGUNG.....	
	LEBENS LAUF.....	
	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG.....	

1 Einleitung

1.1 Das Phänomen Biofilm

Es ist hinreichend bekannt, dass der menschliche Körper von einer Vielzahl von Mikroorganismen besiedelt ist. Diese finden sich auf Haut und Schleimhäuten, besonders im Darmtrakt und der Mundhöhle. Sie stellen keinen Zustand von Unreinlichkeit dar – ganz im Gegenteil: es besteht eine enge gegenseitige Nutzbeziehung zwischen dem menschlichen Organismus und seinen sogenannten Kommensalen [1]. Als Kommensalen werden diejenigen Mikroorganismen bezeichnet, die es gelernt haben, einen Wirt zu besiedeln, ohne ihm jedoch Schaden zuzufügen [2]. Gerät die sogenannte Normalflora des Menschen allerdings aus dem Gleichgewicht und dringen pathogene Erreger in den Organismus ein, können Bakterien schnell zu Krankheiten führen [3].

Eine Fähigkeit, die die meisten Bakterien in ihrer Wirkweise verstärkt, ist die Möglichkeit zur Biofilmbildung. Studien haben gezeigt, dass Bakterien in diesem komplexen Zusammenschluss eine weitaus höhere Virulenz aufweisen, als in planktonischem Vorkommen [4]. Schon im 17. Jahrhundert beschrieb der Forscher *van Leeuwenhock* die erste Entdeckung von Biofilmbildung: in der abgekratzten Plaque seiner eigenen Zähne fand er kleine "dierkens" (Tierchen) [5], die er unter einem selbstgebaute Mikroskop näher untersuchte [6]. Die heutige Definition des Begriffs Biofilm lautet wie folgt: eine sessile Gemeinschaft von Mikroorganismen, die dadurch charakterisiert ist, dass Zellen irreversibel an ein Substrat, an eine Oberfläche oder aneinander geheftet sind. Die Mikroorganismen sind in eine von ihnen selbst produzierte Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet und können aus unterschiedlichen Spezies zusammengesetzt sein [7]. Die Ausbildung eines Biofilms ist ein komplexer Prozess, der laut Dunne grob in vier Stufen unterteilt werden kann [8]: Zu Beginn erfolgt die primäre, reversible Adhäsion von Bakterien an eine organische oder eine anorganische Grenzfläche. Die zweite Stufe der Biofilmbildung besteht aus dem irreversiblen Verankern der Mikroorganismen an der Oberfläche und der festen Haftung untereinander durch Adhäsine. Im dritten Abschnitt wächst der Biofilm und bezieht immer mehr frei flottierende planktonische Zellen in seinen Haftverbund mit ein. Im letzten Schritt kann es dazu kommen, dass sich Fragmente des reifen Biofilms ablösen

(„sloughing“) [9] und sich an anderer Stelle niederlassen, um dort einen neuen Biofilm heranwachsen zu lassen. Jede dieser Phasen wird durch Expression eines oder mehrerer Genprodukte initiiert [8]. Ausgereifte Biofilme können eine beachtliche Dicke in der Größenordnung mehrerer Millimeter erreichen und schützen somit allein durch diese physikalische Barriere die in ihrer Tiefe befindlichen Bakterien vor der Wirkweise von Antibiotika oder des menschlichen Immunsystems [10]. Die Bakterien eines Biofilms haben die Fähigkeit, durch Ausschüttung verschiedener Signalmoleküle untereinander zu kommunizieren. Dieser Informationsaustausch wird als „Quorum sensing“ bezeichnet. Bei Überschreiten einer bestimmten Schwellenkonzentration an Signalmolekülen werden die Bakterien zur Produktion spezifischer Genprodukte angeregt [9]. Diese nehmen Einfluss auf Größe und Wachstumsbedingungen und modifizieren das Verhalten des Bakterienverbundes, um Attacken, Verteidigung und Dichte des Biofilms zu optimieren [11].

1.2 Steckbrief *Enterococcus faecalis*

Die zu den Enterokokken gehörenden Bakterien umfassen eine ganze Liste, darunter *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. malodoratus*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. raffinosus*, *E. solitarius* und *E. pseudoavium*. Wirklich klinisch relevant sind davon aber nur die beiden Erstgenannten [12]. Von diesen zwei Stämmen wiederum bildet das Bakterium *E. faecalis* mit ca. 85% den überwiegenden Anteil, im Gegensatz zu *E. faecium* mit ca. 10% [13]. Die meisten *Enterococcus*-Gattungen weisen folgende Charakteristika, die Sherman im Jahre 1937 zusammenfasste, auf: sie sind fähig, sich in einem Medium von 6,5%igem NaCl bei einem pH-Wert von 9,6, sowie Temperaturen zwischen 10 bis 45°C zu vermehren. Ferner können sie Temperaturen von 60°C für eine Dauer von 30 Minuten aushalten, ohne dabei zugrunde zu gehen [14].

Enterococcus faecalis ist ein grampositiver, fakultativ anaerober Organismus, der in kurzen Ketten, gepaart oder einzeln vorkommt. Es handelt sich bei diesem Bakterium um einen kommensalen Besiedler des Intestinaltraktes von Mensch und Tier [12]. Bis Mitte der 1970er Jahre wurde *E. faecalis* als ein zur gesunden Darmflora gehörender Mikroorganismus für klinisch wenig wichtig gehalten. In der Folge wurde *E. faecalis* dann jedoch als opportunistisch pathogener Keim erkannt, der ernsthafte Krankheiten auslösen kann,

darunter die infektiöse Endokarditis, Bakteriämien, intraabdominelle Infektionen, chronische Wundentzündungen und Harnwegsinfekte [15]. Zudem ist *E. faecalis* neben koagulase-negativen Staphylokokken und *Staphylococcus aureus* der häufigste Auslöser nosokomialer Infektionen. Für die Zahnmedizin ist vor allem das Vorkommen von *E. faecalis* im Mundraum von Interesse. Insbesondere die Ausbreitung multiresistenter Stämme, die unempfindlich gegenüber gebräuchlichen Antibiotika geworden sind, ist besorgniserregend [16]. *Komiyama et al.* machen die Mundhöhle als bedeutsames Reservoir für virulente Enterokokkenstämme verantwortlich [17]. In dieser Studie aus dem Jahr 2016 zeigte sich, dass transiente orale Enterokokken mit steigendem Patientenalter immer häufiger auszumachen und die Stämme zum Großteil gegen Antibiotika resistent waren (53.8% der Isolate waren resistent gegen Tetracyclin, 12.3% gegen Amoxicillin, 16.0% gegen Ampicillin, 20.8% gegen Chloramphenicol und 43.4% gegen Erythromycin) [17]. Vor allem in der Endodontologie gilt *E. faecalis* als Problemkeim und wird als Haupterreger für missglückte Wurzelkanalbehandlungen angesehen [18, 19]. Durch seine anpassungsfähigen Eigenschaften kann der fakultative Anaerobier *E. faecalis* mehrere Jahre in einem wurzelkanalbehandelten Zahn überleben. Dabei helfen ihm die Möglichkeit zur Biofilmbildung und zwei weitere Schutzmaßnahmen während der endodontischen Behandlung: zum Ersten kann er sich in die Dentintubuli zurückziehen und ist so außer Reichweite bei der mechanischen und chemischen Säuberung des Wurzelkanals [18, 9, 20]. Zum Zweiten ist *E. faecalis* weitgehend resistent gegen die herkömmlichen Desinfektionsmittel des Wurzelkanals [9]. *In vitro* sind NaOCl, Octenisept® und CHX laut *Bukhary et al.* in absteigender Reihenfolge als antimikrobielle Spülflüssigkeit wirksam, gegen *E. faecalis* kann jedoch keine davon die gewünschte Wirkung erzielen [21].

Auch im parodontal geschädigten Gebiss rückt *E. faecalis* mehr und mehr in den Fokus. Eine Studie aus dem Jahr 2017 zeigte, dass in den Zahnfleischtaschen von Patienten mit chronischer Parodontitis eine bedeutend höhere Anzahl an *E. faecalis* vorhanden war, als bei der Patientengruppe mit erfolgreich behandelter Parodontitis [16]. Im Übrigen war die Taschenbesiedlung mit *E. faecalis* bei Rauchern und bei Patienten mit unzureichender Mundhygiene erhöht [16].

1.3 Steckbrief *Candida albicans*

Unter den medizinisch relevanten Pilzen nehmen die Hefepilze einen großen Bereich ein, vor allem die der Gattung *Candida*. Dazu zählen die Unterarten *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. kruzei* und *C. guilliermondii*. Den größten Anteil an humanen *Candida*-Infektionen jedoch hat *Candida albicans* mit 65% [22]. Dabei reicht der Schweregrad der Erkrankung von einer oberflächlichen mukokutanen Besiedlung bis hin zur invasiven Candidose, die in schlimmen Fällen tödlich enden kann [23, 24]. Genau wie *E. faecalis* ist *C. albicans* beim Gesunden als kommensaler Besiedler des Organismus, im Besonderen in der oralen und dermalen Flora, zu finden [24]. Im Rahmen ihrer Studie aus dem Jahr 1962 untersuchten *Bartels et al.* Speichelproben von 160 gesunden Probanden im Alter von 20 bis 30 Jahren. Bei 40% der Proben wurden Hefepilze im Speichel diagnostiziert, 60% davon entfielen auf *C. albicans* [25]. Auch andere Studien belegen ein Vorkommen von *Candida* in der Mundhöhle von 15 bis 80% beim Gesunden [26, 27].

C. albicans ist aber auch ein opportunistischer, fakultativ pathogener Keim: herrscht kein Gleichgewicht mehr zwischen Wirt und Gast, kommt es zur einem übermäßigen Wachstum von *C. albicans* und somit zum Krankheitsbild der Candidiasis [28]. Dabei ist weniger die Virulenz des Besiedlers ausschlaggebend, als vielmehr die Milieuveränderungen des Wirtsorganismus durch lokale oder systemische Auslöser [29]. Zu den lokalen Ursachen zählen das Tragen einer Prothese, Rauchen, reduzierter Speichelfluss oder die Anwendung von inhalativen Steroiden. Systemische Faktoren sind etwa die Einnahme von Breitband-Antibiotika, ein extrem junges oder hohes Alter, Mangelernährung, Alkoholismus und sonstiger Drogenmissbrauch, endokrine Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder Immunsuppression, zum Beispiel bei HIV oder Leukämie [27, 23]. Daher stammt auch die Bezeichnung „disease of the diseased“ („Krankheit der Kranken“) [30] für die Infektion mit *Candida*.

Candida siedelt sich vorzugsweise in Körperrischen an, die warm, dunkel und feucht sind. Beispiele dafür sind Hautfalten bei adipösen Menschen, Zehen- und Fingerzwischenräume, die Mundhöhle und der Vaginaltrakt [28]. Rund 75% aller Frauen erkranken in ihrem Leben mindestens einmal an einer vulvovaginalen Candidose, konstatierten *Sobel et al.* im Jahr 2007 [31]. Als prädisponierende Faktoren erkannte die Forschungsgruppe um *Sobel* unter

anderem eine Antibiotikatherapie, Schwangerschaft, hormonelle Kontrazeption und genetische Veranlagung [31].

Auf dem Gebiet der Zahnmedizin ist vor allem der Befall der Mundschleimhaut von Bedeutung, das Krankheitsbild des sogenannten „Soor“. Da Soor ein erster Hinweis auf schwere systemische Erkrankungen wie Leukämie oder HIV sein kann, spielt die Sorgfalt des Zahnarztes bei der Inspektion der Mundhöhle eine besonders wichtige Rolle [32]. Man unterscheidet vier verschiedene klinische Erscheinungsbilder der oralen Candidiasis (siehe Abb. 1).

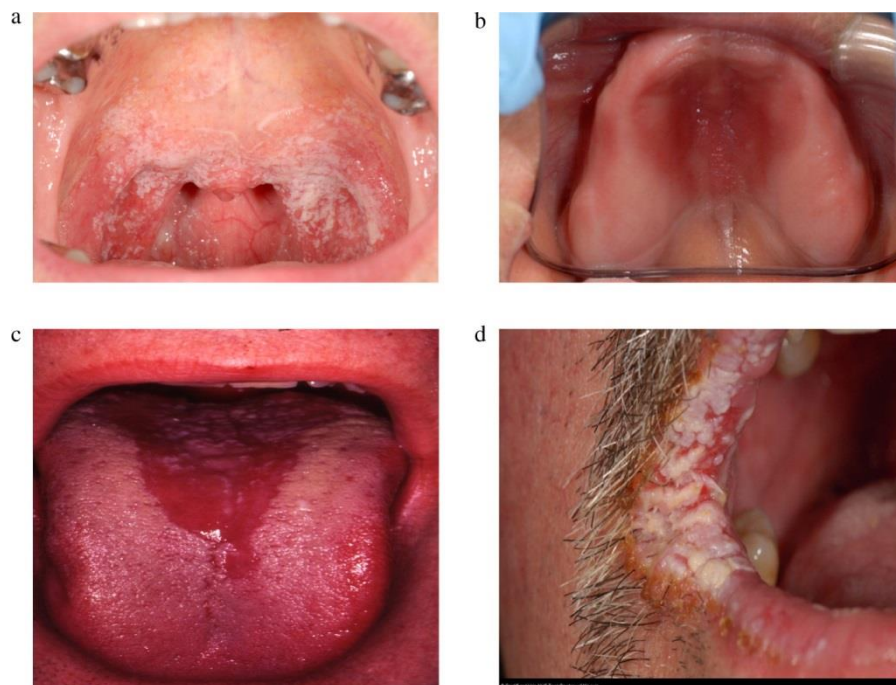


Abb. 1 Die vier Formen der oralen Candidose: akute pseudomembranöse Candidose (a), chronische erythematöse Candidose (b), akute erythematöse Candidose (c), chronische hyperplastische Candidose (d) [27]

„Mundsoor“ ist eine andere Bezeichnung für die akute pseudomembranöse Candidose (vgl. Abb. 1a). Charakteristisch für dieses Krankheitsbild sind weiße bis gelbliche konfluierende Läsionen, die aus desquamativen epithelialen Zellen, Fibrin und Pilzhyphen bestehen. Die Beläge sind leicht abwischbar und legen gerötete Stellen offen, die sich schnell zu blutigen Blasen entwickeln können. Prädilektionsstellen bilden die Oberflächen der bukkalen und labialen Schleimhaut, des harten und weichen Gaumens, der Zunge und des Oropharynx [33, 34]. Eine weitere prominente *Candida*-Erkrankung des Mundraumes ist die

Prothesenstomatitis. Studien belegen, dass bis zu 65% der Prothesenträger eine Candidose unter ihrem herausnehmbaren Zahnersatz aufweisen [35, 36].

Mittel der Wahl bei einer Candidose sind topische oder systemische Antimykotika wie zum Beispiel Fluconazol aus der Wirkstoffgruppe der Azole, jedoch weisen auch Pilze immer mehr Resistenzen gegenüber den herkömmlichen Medikamenten auf [37, 38].

1.4 Cold Atmospheric Plasma – was ist das?

Landläufig bekannt sind die drei physikalischen Aggregatzustände flüssig, fest, gasförmig. Man muss diese Aufzählung jedoch um eine vierte Zustandsform erweitern: das sogenannte Plasma [39]. Abgeleitet aus dem Griechischen „Plassein“ bedeutet das Wort so viel wie „das Formbare“. Bis heute hat sich dieser Begriff, der 1928 vom amerikanischen Chemiker und Physiker *Irving Langmuir* eingeführt wurde, gehalten [40]. Namensgebend war die stark ionisierte Zusammensetzung des Gases, das ihn an die ebenso in Ionen vorliegende Form von Flüssigkeiten wie Blutplasma erinnerte. Ansonsten haben diese zwei Substanzen jedoch nichts miteinander zu tun. Plasma begegnet uns sowohl in der Natur, als auch in der Technik überall: Sterne und Sonnen sind physikalische Plasmen, wie auch Blitze oder die Polarlichter. Künstlich erzeugte Plasmen werden in Fernsehgeräten, Handydisplays oder Leuchtstoffröhren verwendet [41].

Physikalisch gesehen sind Plasmen teilweise oder vollständig ionisierte Gase, die aus einer großen Anzahl geladener Teilchen wie Ionen, Elektronen, freien Radikalen, aus Molekülen und neutralen Atomen bestehen [39]. Der Unterschied zum Gas ist das Wirken von Kräften auf diese und zwischen diesen genannten Partikeln, wodurch Schwingungen und elektrische Leitfähigkeit entstehen können. Abhängig von der Temperatur der Ionen, der Elektronen und des umgebenden neutralen Gases muss man zwischen „kalten“ und „heißen“ Plasmen unterscheiden [39]. Bei der Entstehung eines kalten Plasmas durch Energiezufuhr heizen sich die abgespalteten Elektronen sehr viel schneller auf als die in ihrer Masse viel schwereren Ionen. Durch ihre geringe Masse haben die Elektronen jedoch einen wesentlich kleineren Einfluss auf die Gesamttemperatur als die schweren Moleküle und Ionen, die im ständig wechselnden elektrischen Feld weniger stark beschleunigt werden. Diesen Effekt einer hohen Elektronen- aber geringen Ionen- Temperatur nutzt man bei der Erzeugung von

„kaltem“ Plasma, bei dem die Temperatur in Summe niedrig bleibt [42]. Aufgrund der Temperaturunterschiede innerhalb des Gases wird häufig auch der Begriff „ungleichgewichtetes Plasma“ verwendet [42]. In „heißen“ Plasmen stehen die Temperaturen von Elektronen und Ionen im Gleichgewicht, somit haben alle Teilchen dieselbe Temperatur von bis zu tausenden von Grad. Ein Beispiel dafür stellt unserer Sonne dar, die nichts anderes ist als ein großer „Plasmaball“ [43].

Zusammenfassend sind die Vorteile „kalten“ Plasmas (im Folgenden „CAP“ genannt, nach der Abkürzung des englischen „cold atmospheric plasma“), dass es bei atmosphärischem Druck hergestellt werden kann, dass je nach gewünschter Zusammensetzung die Mischung eines individuellen chemischen „Plasma-Cocktails“ generiert werden kann [44] und dass die niedrigen Temperaturen die Anwendung am lebenden Organismus oder auf hitzeempfindlichen Materialien ermöglicht [45]. Die Gase, die als „Grundsubstanz“ für die Plasmaherstellung verwendet werden, sind üblicherweise die Edelgase Argon und Helium oder aber einfache Umgebungsluft [39, 45]. Neben den schon genannten geladenen Partikeln bestehen CAPs außerdem aus reaktiven Sauerstoff- und Nitrogenspezies (NO, NO₂, O₃, OH⁻, etc.) sowie aus ultravioletter Strahlung und sichtbarem Licht [46, 47].

CAP kann, seiner Anwendung entsprechend, in drei verschiedene Typen eingeteilt werden: in eine direkte, eine indirekte oder eine Hybridform. Beim direkten Plasma dient die behandelte Oberfläche selbst als Elektrode, sodass hierbei elektrischer Strom durch das Gewebe fließt. Das Plasmagerät darf dabei einen Abstand von 1mm nicht überschreiten [43]. Bei den indirekten Systemen wird das Plasma zwischen zwei Elektroden erzeugt und als Transportmedium wird ein Gas benötigt, das die reaktiven Agenzien zur gewünschten Stelle befördert. Hybridplasma kombiniert diese beiden beschriebenen Varianten: es wird wie direktes Plasma hergestellt, aber dank eines in das Plasmagerät eingebauten geerdeten Metallgitters fließt kein Strom durch die Oberfläche des behandelten Organismus. Das Metallnetz hat einen geringeren elektrischen Widerstand als zum Beispiel Haut, deshalb wird der Strom hier entladen [39, 48].

1.5 Anwendung von CAP

Schon bevor die Medizin das „kalte“ Plasma für sich entdeckte, hat sich die Anwendung von „heißen“ Plasmen etabliert: die hohen thermischen Eigenschaften mit einer Temperaturentwicklung von 80°C und mehr ermöglichen einen vielseitigen Einsatz dieser Plasmen. Sie werden unter anderem angewendet bei der Kauterisierung von Geweben, der Sterilisation von hitzestabilen medizinischen Instrumenten und sogar bei kosmetischen Rekonstruktionen [41, 39, 41].

Mit der Entdeckung von CAP hat sich das Anwendungsfeld der Plasmen jedoch beträchtlich erweitert. Zum Beispiel ist es jetzt möglich, auch hitzeempfindliche Materialien wie beispielsweise medizinische Produkte aus Kunststoff auf schonende Weise zu sterilisieren, ohne dass der Effekt der Keimabtötung verloren geht [49]. Im Rahmen einer randomisierten *In-Vivo*-Studie konnte in der Dermatologie bei der Behandlung von Hautkrankheiten und chronischer Wunden bereits ein beschleunigender Effekt von CAP auf die Heilung beobachtet werden [48, 50]. Die positiven Aspekte der CAP-Behandlung sind in unabhängigen *In-vitro*-Studien mehrfach gezeigt worden: diese Alternative zu herkömmlichen Therapiemöglichkeiten könnte eine kontaktfreie, für den Patienten schmerzlose und das gesunde Gewebe schonende Anwendung bieten, die eine Inaktivierung von Viren, Bakterien, Pilzen, Sporen und womöglich weiterer Pathogene bewirkt [39, 47, 50–52]. Neben der klinischen Anwendung am Patienten gibt es weitere Beispiele für den möglichen Einsatz von CAP: interessante Forschungsbereiche sind unter anderem die mögliche Keimreduzierung in der Nahrungsmittelindustrie oder in der Krankenhaushygiene [50].

Auch in der Zahnmedizin ist die Erforschung von CAP von großem Interesse. Eine Studie von *Tominami et al.* aus dem Jahr 2017 zeigte die Fähigkeit von CAP, die Osteoblastendifferenzierung anzuregen. Im parodontal stark geschädigten Gebiss hätte eine nicht-invasive Möglichkeit zur Anregung des Knochenwachstums zahlreiche Vorteile für Patient und Behandler [53]. Doch vor allem im Bereich der Endodontologie gibt es Bestrebungen, CAP in die Therapie von wurzelkanalinfizierten Zähnen zu integrieren. Wie in Kap. 1.2 erwähnt, ist *E. faecalis* ein Problemkeim bei der Wurzelkanalentzündung, der unter der zusätzlichen Behandlung mit CAP besser eliminierbar scheint. Die bisher durchgeführten *In-Vitro*-Studien bestätigen gegenwärtig die schonende Wirkweise von CAP: unerwünschte

Mikroorganismen werden innerhalb kürzester Zeit abgetötet, ohne umliegende Gewebe wie das Dentin in Mitleidenschaft zu ziehen [54, 55].

2 Fragestellung

Ein großes Problem in der Medizin stellt die zunehmende Widerstandsfähigkeit von Bakterien gegen bewährte Antibiotika und Desinfektionsmittel dar. Insbesondere der sorglose Einsatz von Breitband-Antibiotika bei bakteriellen Infektionen hat in den letzten Jahren zu immer häufiger auftretenden Resistenzen verschiedener Bakterienstämme geführt. Eine Folge ist die immer größere Verbreitung und zunehmend schwierige Bekämpfung nosokomialer Infektionen. Um die dringend notwendige Reduktion in der Anwendung von Breitband-Antibiotika zu erreichen, ist die Erforschung alternativer Behandlungsmöglichkeiten zwangsläufig notwendig. Ziel sollte sein, bei bestimmten Krankheitsbildern auf die systemische Antibiotikagabe verzichten zu können und an deren Stelle ähnlich effektive topische Therapieoptionen einzusetzen.

Es gibt derzeit verschiedene Ansätze, solche Alternativen zu erforschen. Einer davon ist die sogenannte antimikrobielle photodynamische Therapie, die eine effektive Wirkung gegen Bakterien und Pilze verspricht [56, 57]. Ein anderes Konzept, welches in dieser Dissertation näher untersucht werden soll, liegt in der Anwendung „kalter“ Plasmen, die ebenfalls in bisherigen Studien einen vielversprechenden Einfluss sowohl gegen Bakterien als auch gegen Pilze gezeigt haben. In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung von CAP mit den herkömmlichen antimikrobiellen Agenzien Chlorhexidin und UVC-Strahlung verglichen. Studien zeigten, dass UVC einen hohen desinfizierenden Effekt gegenüber jenen Mikroorganismen zeigt, die auch in der vorliegenden Doktorarbeit untersucht wurden (siehe Kapitel 5.1.3). Allerdings schädigt UVC-Strahlung auch eukaryotische Zellen, was einen Einsatz *in vivo* unmöglich macht. Chlorhexidin ist ein in der Zahnmedizin sehr gängiges Antiseptikum, das in verschiedenen Konzentrationen angeboten wird. Als gewöhnliche Mundspüllösung wird dem Patienten 0,6%iges CHX verordnet, der Zahnarzt benutzt in der Praxis jedoch höher konzentrierte Lösungen. Für die chemische Reinigung der Zahnfleischtaschen bei einer Parodontitistherapie ist eine Konzentration von 0,2% üblich, bei der Spülung eines oder mehrerer Wurzelkanäle bei einer endodontischen Behandlung werden Konzentrationen von bis zu 2% benutzt [9, 58, 59].

Im Rahmen dieser Dissertation beschäftigt sich der erste Teil mit der Inaktivierung von *E. faecalis*. Hierbei soll ein besonderer Fokus auf das Alter des Biofilms gelegt werden, um

Rückschlüsse darauf ziehen zu können, wie die Durchdringung einer von Tag zu Tag dicker werdenden Bakteriensicht mittels CAP gelingt. Die Ergebnisse werden mit parallel dazu durchgeführten Experimenten mit CHX und UVC verglichen.

Im zweiten Abschnitt folgen dem ersten Versuchsaufbau ähnliche Untersuchungen, jedoch mit dem Hefepilz *C. albicans*. Ein wesentlicher Unterschied liegt hierbei in der Unterscheidung zwischen Biofilmuntersuchungen und Experimenten mit einer planktonischen Lösung des Pilzes.

Im dritten Teil dieser Promotionsarbeit soll unter der Hypothese der Zellwandzerstörung der Wirkmechanismus von CAP auf *E. faecalis*-Biofilme untersucht werden. Dafür wurden Nanodrop-Versuche mit CAP-behandelten Proben von *E. faecalis* durchgeführt, um im Vergleich mit einer angefertigten DNA-Standardreihe eine eventuelle DNA-Freisetzung der behandelten Biofilme feststellen zu können.

3 Material

3.1 Mikroorganismen

3.1.1 *Enterococcus faecalis*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Bakterienstamm ATCC-29212 verwendet. Bei Bedarf wurde dieser auf Müller-Hinton-Agarplatten mit einer sterilen Impfschlinge ausgestrichen und nach 24 Stunden Bebrütungsdauer im Kühlschrank aufbewahrt.

3.1.2 *Candida albicans*

Für die Versuche mit Pilzen wurde *Candida albicans* des Stammes MYA-273 in gleicher Vorgehensweise wie für Bakterien ausgestrichen und aufbewahrt, allerdings auf Sabouraud-Agar.

3.2 Kulturmedien

3.2.1 BHI-Medium

37 g BHI-Pulver (Brain Heart Infusion Broth der Firma Fluka Analytical/Sigma-Aldrich Chemie GmbH mit Sitz in Steinheim, Deutschland) wurden auf der Feinwaage abgewogen und in 1 Liter Millipore-Wasser gelöst, bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert und nach Abkühlen im Kühlschrank aufbewahrt.

3.2.2 Künstliches Speichelmedium

Für die Herstellung des künstlichen Speichelmediums wurden benötigt: 1 g Lab-Lemco, 5 g Protease-Peptide, 2 g yeast extract, 2,5 g Mucin Typ III, 0,5 g NaCl, 0,3 g CaCl₂, 1 g Saccharose. Nach Abwiegen wurden die verschiedenen Pulver wiederum in einem Liter Millipore-Wasser aufgelöst, autoklaviert und in den Kühlraum gebracht. Vor der erstmaligen Benutzung einer Flasche wurden noch 1,25 ml/l einer 0,2 µM sterifiltrierte 40%igen Urea-Lösung dazugegeben (Herstellung: 4 g Harnstoff in 10 ml Millipore-Wasser).

3.2.3 Sabouraud-Bouillon

Für die Pilzkultivierung wurden 30 g Sabouraud-Pulver (Firma Fluka Analytical/Sigma-Aldrich) in einem Liter Millipore-Wasser gelöst, autoklaviert und gekühlt.

3.3 Agarplatten

3.3.1 Müller-Hinton-Agarplatten

Der Müller-Hinton-Agar für die Bakterienversuche wurde freundlicherweise vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg angefertigt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

3.3.2 Sabouraud-Agarplatten

Auch die verwendeten Sabouraud-Agarplatten für die Experimente mit *C. albicans* wurden vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene des UKR hergestellt.

3.4 Reagenzien und Chemikalien

3.4.1 PBS

Die Pufferlösung DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), im Folgenden PBS genannt, wurde von der Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) bezogen.

3.4.2 Millipore-Wasser

Das verwendete Wasser, vor allem für die Herstellung der Nährmedien, wurde mit der Reinstwasseranlage Milli-Q® Reference System gereinigt.

3.4.3 CHX

Das in den Experimenten benutzte CHX (Chlorhexidin) wurde in 0,2%iger und 2%iger Konzentration von der Apotheke des Universitätsklinikums Regensburg erworben.

3.4.4 FKS

Das Fetale Kälberserum (Firma Pan-Biotech GmbH aus Aidenbach, Deutschland) wurde vor Anwendung für 30 Minuten in ein 60°C warmes Wasserbad gelegt, um die Komplementfaktoren zu inaktivieren. Danach wurde es ausschließlich unter der Sterilbank geöffnet und verwendet, um Verunreinigungen zu vermeiden.

3.4.5 Gereinigte Herings-DNA

Für die Nanodrop-Versuche wurde doppelsträngige DNA verwendet, isoliert aus Herings-Sperma (Sigma-Aldrich, Deutschland). Die Konzentration an DNA beträgt laut Hersteller zwischen 9 und 12 mg/ml.

3.4.6 Lysozym und Proteinase K

Ebenfalls für die Experimente mittels Nanodrop wurde Lysozym aus Hühnereiklar (L6876) sowie bakterielle Proteinase K aus dem Mikroorganismus *Bacillus licheniformis* (P8038) verwendet. Gemäß der Firma Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland), Hersteller beider Substanzen, hat Lysozym in der pulverisierten Form einen Anteil von mehr als 40.000 Einheiten/mg und Proteinase K einen Anteil von 7,0-14,0 Einheiten/mg.

3.5 Technische Geräte und Hilfsmittel

3.5.1 Derma-Care-Plasmaquelle

Die Derma-Care-Plasmaquelle wurde von der Firma terraplasma GmbH (Garching bei München, Deutschland) als Prototyp im Rahmen der Niedrig-Temperatur-Plasma-Projekte (BayMed Projekt: Förderbescheid Nr. 07 03/686 68/19/16/3/17/4/18) zur Inaktivierung von Mikroorganismen zu Verfügung gestellt (siehe Abb. 2). Die Plasmaquelle hatte einen Innendurchmesser von 40,2 mm und somit eine Fläche von 12,7 cm².

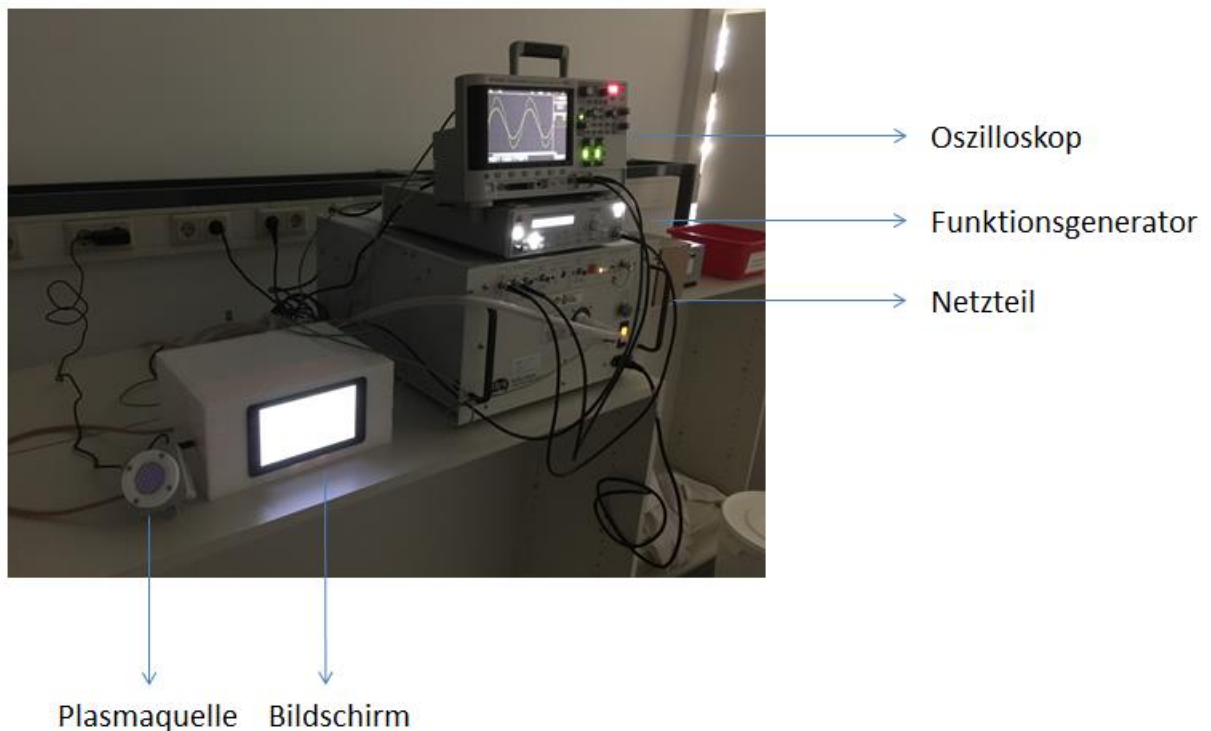


Abb. 2 Aufbau der Derma-Care-Plasmaquelle

3.5.2 UVC-Lampe

Zur Bestrahlung mit UVC wurde der Transilluminator *FLX-20M* der Firma Vilber Lourmat (Eberhardzell, Deutschland) benutzt. Dabei wurde für UVC immer eine Wellenlänge von 254 nm eingestellt (siehe Abb. 3).

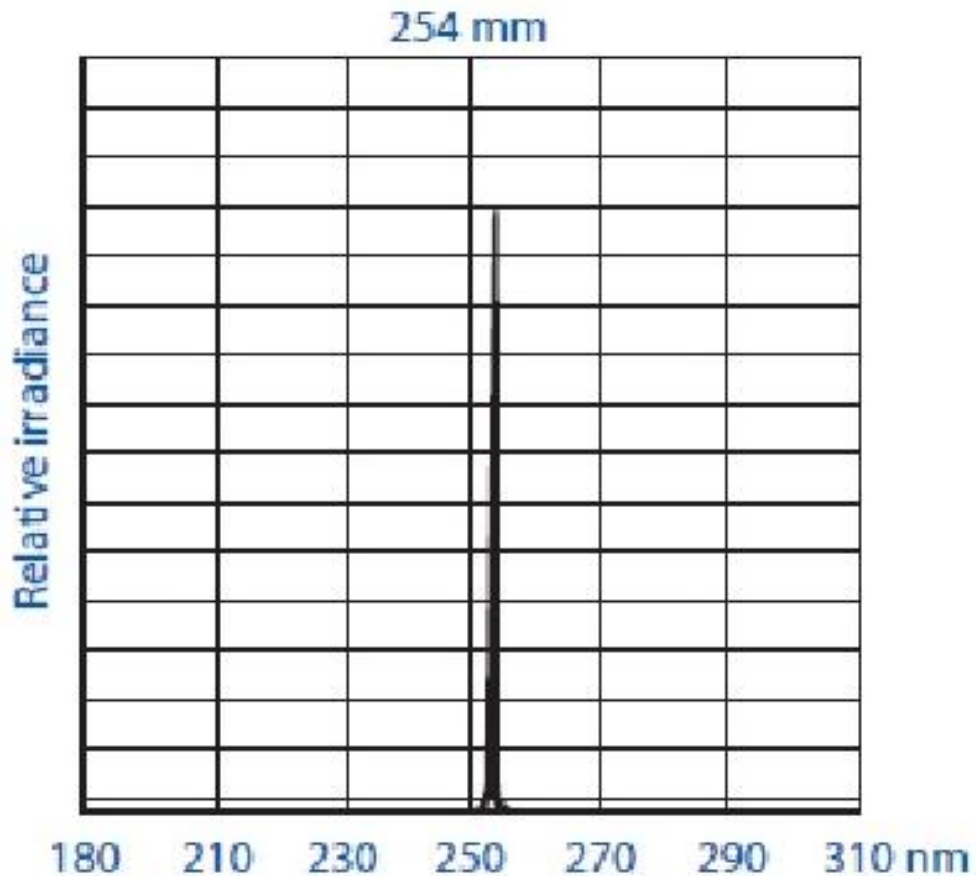


Abb. 3 Spektrum einer UV-Lampe bei 254nm (Spezifikation laut Herstellerangaben)

3.5.3 Zentrifugen

Für größere Falcons wurde die Zentrifuge *Universal 320 R* der Firma Hettich eingesetzt (Tuttligen, Deutschland). Als kleinere Tischzentrifuge für Eppendorf-Cups fand die *Centrifuge 5415 C* der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) Verwendung.

3.5.4 Spektralphotometer

Für die Messung der optischen Dichte von Bakterien wurde das Photometer *Specord50 plus* der Firma Analytik Jena AG (Jena, Deutschland) benutzt. Die dazugehörige Software *WinASPECT® PLUS* wurde ebenfalls von der Analytik Jena AG entwickelt.

3.5.5 Küvetten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Einmal-Küvetten aus Acryl der Firma Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland) mit den Maßen 10x4x45 mm verwendet.

3.5.6 Waage

Zum Abwiegen der Pulver für die Nährmedien wurde die Feinwaage *Sartorius LC 6200 D* eingesetzt (Sartorius AG aus Göttingen, Deutschland).

3.5.7 Sterilbank

Für möglichst sterile Bedingungen wurden einige Arbeitsschritte unter der Sicherheitswerkbank *Hera Safe* der Firma Kendro Laboratory Products GmbH (Hanau, Deutschland) durchgeführt.

3.5.8 Biofilmschälchen

Die Zellkulturschalen *Corning® Primaria™* wurden von der Firma Corning Incorporated – Lieve Sciences (New York, USA) bezogen und haben einen Durchmesser von 35 mm, d.h. eine Wachstumsoberfläche von 9,6 cm².

3.5.9 Sterile Zellschaber

Zum Ablösen des Biofilms aus den Schälchen wurden sterile Einmal-Zellschaber der Firma Sarstedt AG & Co. mit einer Länge von 16 cm verwendet.

3.5.10 Neubauer-Zählkammer

Candida albicans wurde mit der Neubauer-Zählkammer *Neubauer improved bright-line* der Firma Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, Deutschland) unter dem Mikroskop ausgezählt.

3.5.11 Lichtmikroskop

Das verwendete Lichtmikroskop *Axiostar plus* stammt von der Carl Zeiss Microscopy GmbH mit Hauptsitz in Jena (Deutschland).

3.5.12 Nanodrop

Die Versuche zur Bestimmung des DNA-Gehalts wurden mit dem *Nanodrop Spectrometer 2000* der Firma Peqlab (Erlangen, Nürnberg) ausgeführt.

3.5.13 Auswertungssoftware

Die gewonnenen Daten wurden mit der Software *SPSS version 23* der Firma SPSS Inc. (Chicago, USA) ausgewertet.

4 Methoden

4.1 Kultivierungsverfahren für *E. faecalis* und *C. albicans*

Für die Herstellung einer Über-Nacht-Kultur wurden 5 ml des jeweiligen Nährmediums in einen 15 ml-Falcon mit Membran gegeben, das heißt 5 ml BHI-Medium für *Enterococcus faecalis* und 5 ml Sabouraud-Bouillon für *Candida albicans*. Danach wurde mit einer sterilen Impföse eine Kolonie von der bebrüteten Agarplatte aus dem Kühlschrank aufgenommen und unter rüttelnden Bewegungen in den Falcon mit Nährlösung eingebracht. Dieser wurde dann für mindestens 12 Stunden über Nacht in den Bebrütungsraum bei 37°C auf einen Horizontalschüttler gestellt. Als Kontrolle wurde außerdem jeweils ein Falcon ohne Bakterien- oder Pilzzugabe inkubiert, um sicherzustellen, dass das Medium keine Verunreinigung aufwies.

4.2 Bestimmung der Bakterien-OD und Auszählen von *C. albicans*

Die tags zuvor angeimpften Röhrchen wurden 10 Minuten bei 3000 rpm („rounds per minute“) zentrifugiert und dann der Überstand abgenommen. Anschließend wurde das verbliebene Bakterien-/ Pilz-Pellet mit 10 ml PBS durch Resuspension aufgelöst. Nun folgte ein jeweils unterschiedliches Verfahren für *E. faecalis* und *C. albicans*:

Für *E. faecalis* wurde die optische Dichte (OD) mittels Spektralphotometers bei 600 nm bestimmt. Hierfür wurden im ersten Schritt 1 ml PBS als „Blank“ (Referenzwert) gemessen und danach 1 ml der Bakterienlösung 1:10 mit PBS verdünnt. Um die gewünschte OD von 0,13 zu erreichen, wurde der Verdünnungsfaktor wie folgt berechnet:

$$VF = \frac{\text{gemessene OD} \times 10}{0,13}$$

Mit Hilfe des ermittelten Verdünnungsfaktors wurde die Ausgangslösung mit PBS verdünnt, die neue OD ein weiteres Mal mittels Spektralphotometer überprüft und gegebenenfalls nochmals nachverdünnt. Nach Erreichen der erforderlichen OD von 0,13 wurde die Lösung wieder 10 Minuten zentrifugiert, das überstehende PBS mit der Pipette abgenommen und das gleiche Volumen mit künstlichem Speichelmedium aufgefüllt und resuspendiert.

Anders als bei *E. faecalis* kann mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer die Anzahl von *C. albicans* unter dem Mikroskop direkt ausgezählt werden. Hierfür wurde ein Deckglas auf die Zählkammer aufgeschoben. Durch vorheriges Anhauchen beider Flächen hafteten diese durch Kapillarkräfte aneinander, überprüfbar an der Entstehung regenbogenfarbiger Interferenz-Linien (Newton-Ringe). In diesen Kapillarspalt wurden nun 10 µl der Candida-Lösung eingebracht und unter dem Mikroskop ausgezählt. Gezählt wurden dabei zwei gegenüberliegende der kleinen Quadrate des Zählrasters (siehe Abb. 4) und die Gesamtanzahl mit folgender Formel berechnet:

$$N = \frac{n_1 + n_2}{2} \times 25 \times 10^4 \times 10$$

N = Anzahl der *Candida*-Zellen in 10 ml Ausgangslösung

n_1 = Anzahl der Zellen im 1. Quadrat

n_2 = Anzahl der Zellen im 2. Quadrat

Faktor 25 = Anzahl der Quadrate

Faktor 10^4 = Kammerfaktor

Faktor 10 = Anzahl in 10 ml

Das Ergebnis sollte sich bei einer Anzahl von 1 bis 4×10^6 Zellen/ml einstellen, ansonsten wurde weiter verdünnt.

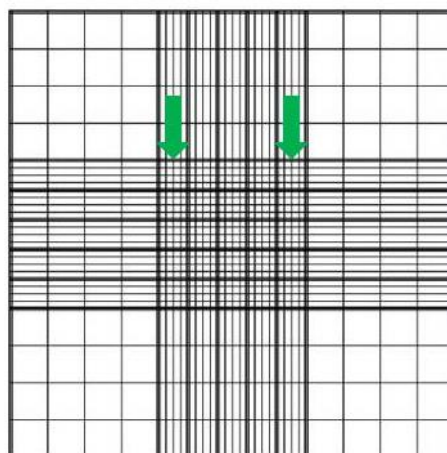


Abb. 4 Schematische Abbildung des Zählrasters einer Neubauer-Zählkammer. Die mit grünen Pfeilen markierten Quadrate wurden unter dem Mikroskop ausgezählt [60].

Nach dem Auszählen wurde die Lösung erneut zentrifugiert, der Überstand an PBS abgezogen und durch das gleiche Volumen an Sabouraud-Medium ersetzt.

4.3 Biofilm-Herstellung

4.3.1 *E. faecalis*-Biofilm

Für den Bakterien-Biofilm (siehe Abb. 5) wurden jeweils 2 ml der im vorausgegangenen Schritt resuspendierten Speichelmedium-Bakterien-Lösung (vgl. Kap. 4.2) in ein Biofilmschälchen gegeben und je nach Versuch 24, 48 oder 72 Stunden im Brutraum bei 37°C inkubiert. Bei Schälchen, die länger als 24 Stunden bebrütet werden sollten, wurde jeden Tag das Medium gewechselt. Hierfür wurde mit einer Pipette das künstliche Speichelmedium vorsichtig am Rand des gekippten Schälchens abgesaugt und durch 2 ml frisches Speichelmedium ersetzt. Somit war eine dauerhafte Bereitstellung von genügend Nährmedium für die Bakterien gewährleistet.

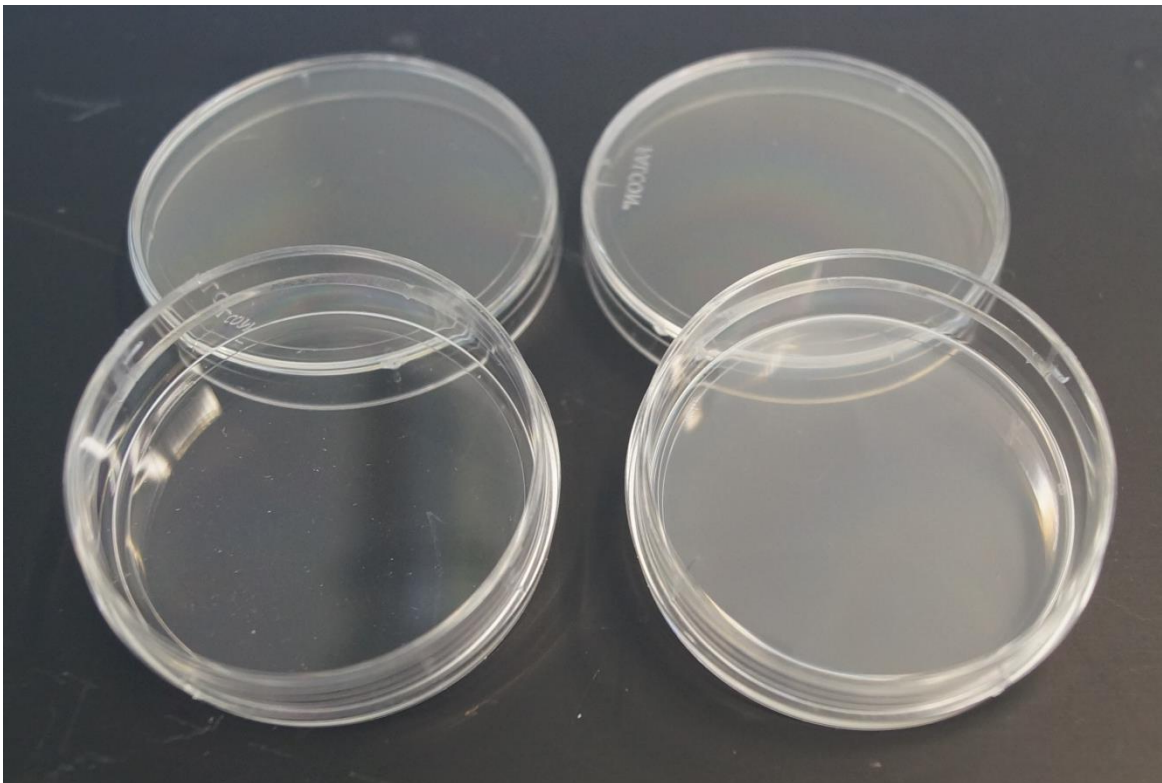


Abb. 5 Dargestellt ist auf der linken Seite ein leeres Biofilmschälchen und auf der rechten Seite ein ausgereifter 48h-Biofilm *E. faecalis*. Im Vergleich ist visuell die milchige Trübung des bakteriell bewachsenen Schälchens erkennbar. Durchmesser pro Schälchen 35mm.

4.3.2 *C. albicans*-Biofilm

Um eine optimale Anheftung von *C. albicans* an die Zellschälchen zu erreichen, wurden die Biofilmschälchen im ersten Schritt mit 1 ml inaktiviertem FKS benetzt. Hierauf wurde im Anschluss 1 ml des vorbereiteten *Candida*-Sabouraud-Gemisches dazugegeben. Die Schälchen wurden für die Dauer des gewünschten Biofilmalters (6, 12 oder 24 Stunden) bei 37°C inkubiert (siehe Abb. 6).

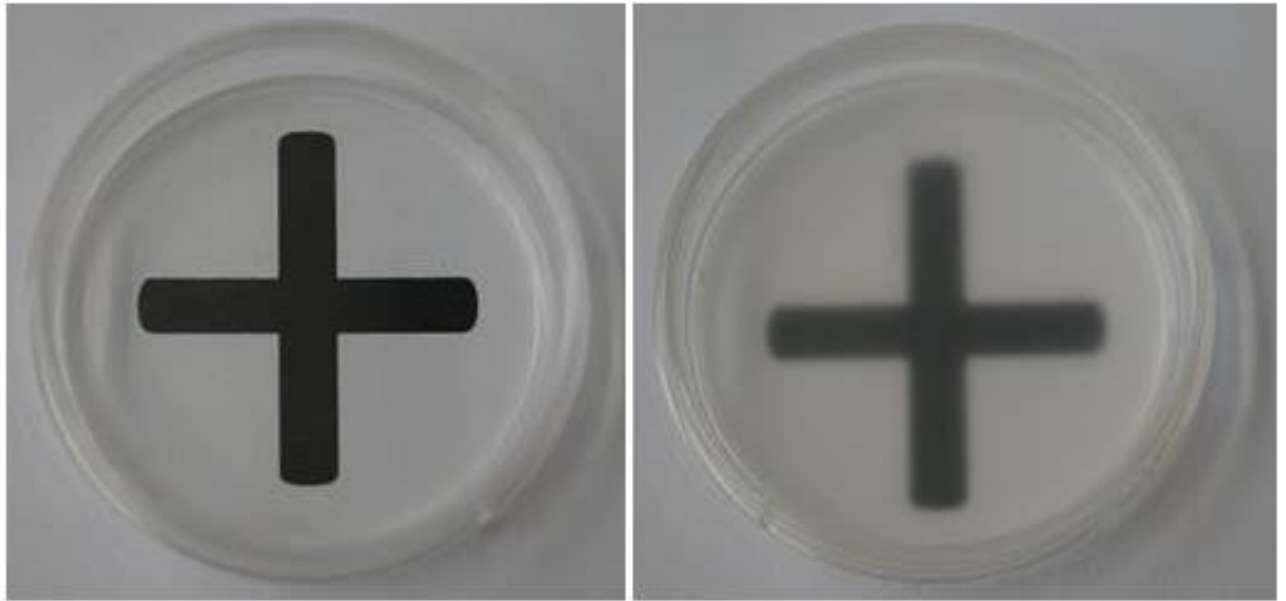


Abb. 6 Auch bei *Candida albicans* ist ein deutlicher Unterschied zwischen unbewachsenem Schälchen (links) und kolonisierter Oberfläche (rechts) zu erkennen: bei der mit *Candida* bewachsenen Schale (hier 12 Stunden inkubiert) ist das schwarze Kreuz verschwommen sichtbar. Durchmesser pro Schälchen 35mm.

4.4 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE)

Zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten wurde bei *E. faecalis* und *C. albicans* in gleicher Weise verfahren. Die Agarplatten wurden in sechs gleich große Kompartimente eingeteilt und mit den jeweiligen sechs letzten Verdünnungsstufen des betreffenden Versuchs beschriftet. Aus den letzten sechs Eppendorf-Cups der Verdünnungsreihe wurden je 60 µl mit der automatischen Pipette entnommen und pro Kompartiment wurden jeweils drei Tropfen à 20 µl aufgebracht, das heißt jede Agarplatte beinhaltete zum Schluss 18 Tröpfchen (siehe Abb. 7). Dies stellt eine abgewandelte Form der Ausplattierungsmethode nach Miles, Misra & Irwin dar [61]. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, am nächsten Tag manuell ausgezählt und die Werte dokumentiert. Da die Tropfen ab einer

gewissen Anzahl an Kolonien, vor allem bei den Kontrollversuchen, unzählbar wurden, wurde ein Wert bestimmt, der mit der Zählung „unendlich“ gleichgesetzt wurde. In der vorliegenden Dissertation entspricht dieser Wert bei *E. faecalis* $\infty = 150$ Kolonien und bei *C. albicans* $\infty = 100$ Kolonien.

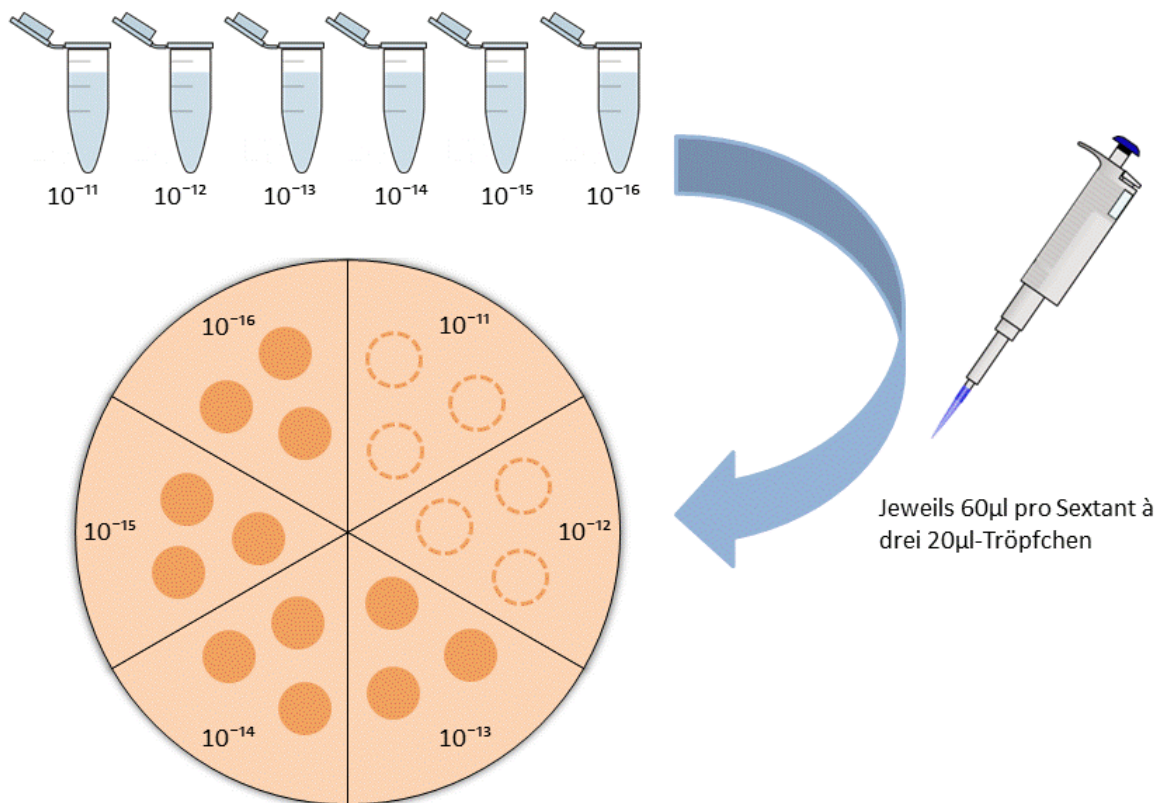


Abb. 7 Dargestellt ist die Ausplattierungsmethode nach Miles, Misra & Irwin. Im ersten Schritt wurde eine Verdünnungsreihe bis 10^{-16} hergestellt. Aus jedem Eppendorf Cup wurden daraufhin je $60 \mu\text{l}$ entnommen und in drei $20 \mu\text{l}$ -Tropfen gegen den Uhrzeigersinn auf entsprechende Sextanten (Verdünnung 10^{-16} bis 10^{-11}) aufgetragen. In dieser Schemazeichnung müssen die Tropfen der Verdünnungsstufen 10^{-12} und 10^{-11} noch aufgebracht werden (gestrichelte Kreise).

4.5 Toxizitäts-Versuche an *E. faecalis*

Unabhängig von der Art des Experiments, das heißt des verwendeten Agens, wurden die Biofilmschälchen im ersten Schritt alle identisch behandelt: aus den vorbereiteten *E. faecalis*-Biofilmschälchen (vgl. Kapitel 4.3.1) wurde das künstliche Speichelmedium vorsichtig abgesaugt und die Biofilme drei Mal mit jeweils 1 ml PBS gewaschen. Hierfür wurde immer 1 ml PBS in ein Schälchen gegeben, kurz per Hand geschwenkt und wieder abgesaugt. Für die Versuche mit trockenem Biofilm wurden die Schälchen nach dem Waschen ohne Deckel circa 20 Minuten an der Luft stengelassen, bis der Biofilm sichtbar matt und somit

getrocknet war. Für die Versuche mit der Bedingung „feuchter Biofilm“ konnten die Schälchen sofort im Anschluss an den Waschvorgang verwendet werden.

Die Versuche wurden mit unterschiedlich alten Biofilmen ausgeführt (24, 48 oder 72 Stunden) und jeweils mindestens drei Mal wiederholt.

4.5.1 CAP

Vor jeder Versuchsreihe wurde die Derma-Care-Plasmaquelle für eine Minute ohne Biofilmprobe getestet. Im Anschluss wurden die Schälchen für die Behandlung mit Niedrig-Temperatur-Plasma für 1 min, 3 min, 5 min oder 10 min unter die aktivierte Plasmaquelle gestellt. Dies wurde jeweils unter den Versuchsbedingungen „trockener Biofilm“ als auch „feuchter Biofilm“ durchgeführt. Außerdem wurden für beide Versuchsbedingungen je zwei Kontrollen angefertigt: eine Kontrolle wurde eine Minute stehengelassen, die andere 10 Minuten, jeweils als Pendant zu den behandelten Proben nach einer Minute und nach 10 Minuten. Anschließend wurden die Schälchen erneut mit 1 ml PBS gewaschen (d. h. Zugabe von 1ml PBS, Schwenken und Abziehen des PBS mittels Pipette), dann wurde 1 ml PBS hinzugegeben und im Schälchen belassen. Mit einem sterilen Zellschaber wurde der Biofilm abgelöst, mit Hilfe einer Pipette resuspendiert und in ein Eppendorf-Cup überführt. Nun folgte die Anfertigung einer Verdünnungsreihe mit einem Verhältnis von 1:10, bis hin zu einer Verdünnung von 10^{-16} , je nach Erfahrungswert (vgl. Kapitel 4.4). Dafür wurden jeweils 900 µl PBS in Eppendorf-Cups vorgelegt und dann aus der Stammlösung (erstes Eppendorf-Cup) 100 µl entnommen und in das zweite Cup zu den 900 µl PBS gegeben. Nach Pipettenspitzenwechsel wurde die Lösung resuspendiert, wieder 100 µl entnommen und in das nächste Eppendorf-Cup überführt. Dies wurde bis zum letzten Cup identisch weitergeführt. Die aus dem letzten Cup entnommenen 100 µl wurden verworfen, um gleiche Volumina zu erreichen. Aus den letzten sechs Eppendorf-Cups der Verdünnungsreihe wurden jeweils 60 µl entnommen und nach Miles, Misra & Irwin auf Müller-Hinton-Agar ausplattiert (siehe Abb. 7) Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag ausgezählt.

4.5.2 CHX

Um die Wirkung von CHX auf den Bakterien-Biofilm zu testen, wurde je 1 ml 0,2%iges oder 2%iges CHX in die bewachsenen Schälchen gegeben, wieder unter trockenen und feuchten Versuchsbedingungen. Nach fünfminütiger Einwirkzeit wurde das CHX vorsichtig abgezogen, der Biofilm mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS gelöst. Das anschließende Prozedere war identisch zu den Proben, die mit dem Plasmagerät behandelt wurden: Lösen des Biofilms, Überführung in ein Eppendorf-Cup, Herstellen einer Verdünnungsreihe, Ausplattieren auf Müller-Hinton-Agarplatten und nach 24 Stunden Inkubationszeit Auszählung der Platten.

4.5.3 UVC

Parallel zur den zwei beschriebenen Versuchsmodellen wurde auch bei den Experimenten mit UVC mit trockenem und feuchtem Biofilm verfahren. Die einzelnen Proben wurden unter die UVC-Lampe gestellt und mit 0,005 J/cm², 0,065 J/cm², 0,13 J/cm² oder 0,26 J/cm² bestrahlt. Außerdem gab es jeweils eine Kontrollprobe für trockenen und feuchten Biofilm, die nicht behandelt wurde. Das weitere Verfahren inklusive Auszählen der Platten unterscheidet sich nicht von den Untersuchungen mit CAP und CHX.

4.6 Toxizitäts-Versuche an *C. albicans*

Die Vorbereitung der Versuche mit *Candida albicans* war ähnlich zu denen mit *Enterococcus faecalis* (vgl. Kapitel 4.5): aus den vorbereiteten *C. albicans*-Schälchen (vgl. Kapitel 4.3.2) wurde das Sabouraud-Medium entfernt, die Schälchen drei Mal mit 1 ml PBS gewaschen und dann entweder sofort weiterverwendet oder zum Trocknen aufgestellt (Trocknungszeit bei *C. albicans* bis zu einer Stunde). Auch das Verfahren nach Versuchsablauf bis hin zum Auszählen war identisch zu *E. faecalis*, weshalb es hier nicht noch einmal aufgeführt wird. Die jeweiligen Versuchsreihen wurden mindestens drei Mal wiederholt.

Da die Schichtdicke des *Candida*-Biofilm schon nach kurzer Bebrütungsdauer visuell subjektiv dicker als der Bakterien-Biofilm war (siehe Abb. 8), wurde das Alter beim Pilz-Biofilm auf 6 und 12 Stunden herabgesetzt (Ausnahme: UVC auch 24 Stunden). Bei den ersten Versuchen mit 24 Stunden altem *Candida*-Biofilm zeigte sich schnell, dass die Schichtdicke ein effektives Durchdringen des „kalten Plasmas“ oder von CHX stark behinderte (Daten nicht gezeigt).



Abb. 8 Vergleich zwischen *E. faecalis*-Biofilm (links, 24 Stunden alt), *C. albicans*-Biofilm (Mitte, 12 Stunden alt) und leerem Schälchen. Deutlich ist zu erkennen, dass der *Candida*-Biofilm visuell dichter ist als der *E. faecalis*-Biofilm, obwohl 12 Stunden jünger.

4.6.1 CAP

Für die Behandlung mit Niedrig-Temperatur-Plasma wurden die trockenen und feuchten Proben 1 min, 5 min und 10 min unter die Derma-Care-Plasmaquelle gestellt und mit CAP behandelt. Da die Inaktivierung beim trockenen Biofilm deutlich effektiver war, wurde für diesen auch eine Zeit von 15 Minuten getestet. Das Alter des Biofilms entsprach 6 oder 12 Stunden.

4.6.2 CHX

Wie bei den Versuchen mit *E. faecalis* wurde sowohl der trockene als auch der feuchte *Candida*-Biofilm für 5 Minuten mit 0,2%igem und 2%igem CHX behandelt. Verwendet wurde 6 oder 12 Stunden alter Biofilm.

4.6.3 UVC

Für *Candida* wurden folgende Bestrahlungsintensitäten mit UV-Licht angewendet: 0,005 J/Cm², 0,195 J/cm² und 0,26 J/cm². Wie schon erwähnt wurde im Gegensatz zu den CAP- und CHX-Experiment auch 24 Stunden alter Biofilm bestrahlt.

4.6.4 CAP – Agarplatten-Versuch

Bei dieser Versuchsreihe erfolgte keine klassische Biofilm-Herstellung in den Schälchen, sondern es wurde eine *Candida*-Suspension direkt auf die Sabouraud-Agarplatten aufgebracht. Hierfür wurde im ersten Schritt eine Verdünnungsreihe der hergestellten

Candida-Lösung bis 10^{-7} hergestellt. Von jeder dieser Verdünnungsstufen wurden im Anschluss 900 μ l Flüssigkeit entnommen, mit einem sterilen Petrischalenschaber auf der Agarplatte ausgestrichen und die Platten luftgetrocknet. Im zweiten Versuchsteil wurden 900 μ l unverdünnte *Candida*-Suspension auf die Platten aufgebracht und diese nach Einziehen der Flüssigkeit unter der Derma-Care-Plasmaquelle 1, 3, 5, oder 10 Minuten behandelt. Außerdem wurde eine Kontrollplatte angefertigt, bei der die ausgestrichene *Candida*-Lösung keine Behandlung erhielt. Zuletzt sollte untersucht werden, ob das Niedrigtemperatur-Plasma eventuell einen Effekt auf den Agar und nicht den Pilz selbst haben könnte. Für diesen Zweck wurde eine Platte ohne *Candida albicans* zuerst 5 Minuten mit CAP behandelt und dann erst die Pilzflüssigkeit darauf ausgestrichen. Nach Beendigung dieser drei Versuchsteile wurden die Platten über Nacht inkubiert und am nächsten Tag manuell ausgezählt. Um eine aussagekräftige Menge an Stichproben zu erlangen wurde diese Versuchsreihe insgesamt zehn Mal wiederholt. Für die Auswertung der Agarplattenversuche wurde die behandelte Fläche von 12,7 cm^2 (vgl. Kap. 3.5.1) mit der Gesamtfläche einer Agarplatte von 63,6 cm^2 ins Verhältnis gesetzt.

4.7 Nanodrop-Versuche

Um zuverlässige Vergleichswerte für die Nanodrop-Ergebnisse der Biofilm-Experimente zu haben, wurde im ersten Schritt die Messung einer DNA-Standardreihe vorgenommen. Hierfür wurde Herings-DNA verdünnt auf die Konzentrationen 1 mg/ml, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml und 1 μ g/ml und für jede dieser Konzentrationen die Wellenlänge bei 260 nm und 280 nm gemessen. Nun folgte die Messung der behandelten *E. faecalis*-Biofilme: ein Teil der Proben war im Vorfeld mit CAP behandelt worden, der andere Teil mit CHX. Unter der Derma-Care-Plasmaquelle hatte zuvor eine Behandlung von 5 oder 10 Minuten stattgefunden und es gab immer eine unbehandelte Kontrollschale. Die Proben, die mit CHX behandelt wurden, waren im Vorfeld jeweils 5 Minuten mit 1 ml CHX 0,2% oder 2% benetzt worden und dann einmal mit PBS gewaschen. Nun wurde auf alle Proben 1 ml PBS gegeben und der Biofilm entweder direkt nach der Behandlung mit einem sterilen Zellschaber abgekratzt und mittels Pipette resuspendiert oder der Biofilm wurde am Boden des Schälchens belassen (Zeitkinetik). Um zu untersuchen, ob die Substanzen die DNA-Freisetzung in Abhängigkeit der Zeit verändern,

wurden einmal nach 5 Minuten und einmal nach 20 Minuten 200 µl aus dem Überstand entnommen, in einem Eppendorf-Cup zentrifugiert und wiederum der Überstand in ein frisches Eppendorf-Cup überführt, welcher dann unter dem Nanodrop-Gerät vermessen wurde.

Außerdem wurde pures CHX in den Verdünnungen 0,2% und 2% gemessen, sowie in Kombination mit der Standard-DNA-Reihe.

Da sich im Laufe der spektroskopischen Messungen mit dem Nanodrop herausstellte, dass CHX im Rahmen dieses Versuchsaufbaus nicht als Positivkontrolle verwendbar war, wurde der *E. faecalis*-Biofilm außerdem mit bakteriellen Enzymen behandelt, die die Bakterienzellwand auflösen und so zu einer gezielten DNA-Freisetzung führen. Hierfür wurde der reife Biofilm im ersten Schritt mit 1 ml PBS versetzt, abgekratzt und resuspendiert. Dieser *E.-faecalis*-Lösung wurden identische Proben à 300 µl entnommen und in drei beschriftete Eppendorf-Cups eingebracht (UK: unbehandelte Kontrolle, PK1: Positivkontrolle 1 und PK2: Positivkontrolle 2). Nach Zentrifugation wurde der Überstand an PBS mit einer Pipette abgenommen. Für die UK wurden nun erneut 100 µl PBS hinzugegeben und das Gemisch resuspendiert. Die Proben PK1 und PK2 wurden mit 100 µl bzw. 200 µl Lysozym (>40.000 Einheiten/mg) versetzt und 30 Minuten bei 37°C verdaut. Im Anschluss erfolgte eine Zugabe von 100 µl bzw. 200 µl Proteinase K (7,0-14,0 Einheiten/mg) und 200 µl bzw. 400 µl 1%iger SDS-Lösung und eine erneute Erwärmung auf 37°C für weitere 30 Minuten. Die Endvolumina betragen somit für die UK 100 µl, für PK1 400 µl und für PK2 800 µl. Nach Abschluss dieser zwei Andauungs-Schritte war eine deutliche klare Färbung der zwei mit Enzym behandelten Proben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sichtbar. Für die DNA-Analyse wurden in der Folge jeweils 20 µl aus den drei Eppendorf-Cups entnommen und unter dem Nanodrop-Gerät gemessen.

4.8 Datenanalyse

Alle beschriebenen Versuche wurden zusammen mit Dr. Karl-Anton Hiller (Klinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, UKR) mithilfe des Programms SPSS ausgewertet und die Ergebnisse graphisch in Säulendiagramme überführt. Zusätzlich ist bei allen Graphiken eine durchgängige Linie für eine Keimzahlreduktion von 3 log₁₀-Stufen eingezeichnet und eine

gestrichelte Linie für die Reduktion von 5 \log_{10} -Stufen. Laut Definition der *Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie* liegt bei einer Reduktion um $\geq 99,9\%$ (3 \log_{10} -Stufen) eine antimikrobielle Wirkung vor und bei einer Reduktion um $\geq 99,999\%$ (5 \log_{10} -Stufen) eine desinfizierende Wirkung[62].

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Inaktivierung von *E. faecalis*

Der erste Teil dieser Doktorarbeit beschäftigt sich mit der antibakteriellen Wirkung verschiedener Agenzien gegenüber dem Bakterium *Enterococcus faecalis*. Im Folgenden sollen die Ergebnisse nach Behandlung mit CAP, Zugabe von CHX oder Bestrahlung mit UVC dargestellt und diskutiert werden.

5.1.1 CAP-Versuche

Wie unter Kapitel 4.5.1 beschrieben, wurden die Proben von *E. faecalis* nach verschiedenen Behandlungskriterien unterteilt und dokumentiert:

Zum einen wurde der Biofilm entweder erst getrocknet oder er wurde im feuchten Zustand weiterbehandelt. Außerdem gab es Unterschiede im Alter des Biofilms: es wurden jeweils drei Versuchsreihen mit 24, 48 oder 72 Stunden altem Biofilm durchgeführt. Der dritte Unterscheidungsfaktor lag in der Behandlungsdauer der Proben: es wurden Behandlungszeiten von 1, 3, 5 oder 10 Minuten gewählt. Die parallel zu den behandelten Biofilmschälchen mitgeführten Kontrollen wurden entweder eine oder zehn Minuten nach dem Waschen mit PBS in ein Eppendorf-Cup überführt und ausplattiert. Diese Vorgehensweise wurde angewandt, um eine mögliche Inaktivierung von *E. faecalis* durch alleinige Lufteinwirkung nach Absaugen des Mediums zu überprüfen.

In den folgenden Abbildungen (Abb. 9- 11) werden die Ergebnisse der CAP-Behandlung bei *E. faecalis*-Biofilmen unterschiedlichen Alters graphisch dargestellt.

Es zeigte sich, dass die CAP-Behandlung beim trockenen Biofilm stärker wirkte als bei der feuchten Variante. Außerdem scheint das Cold Atmospheric Plasma deutlich effektiver zu wirken, je geringer die Schichtdicke – das heißt je jünger der Biofilm - ist. Ab einer Behandlungsdauer von 10 Minuten wurde die Anzahl der KBE jedoch bei jeder Biofilm-Altersstufe um mindestens 5 \log_{10} -Stufen reduziert. Das heißt, es fand eine Bakterienreduktion von mindestens 99,999% statt [62]. Dies war unabhängig sowohl vom Alter des Biofilms als auch der Bedingung „trocken“ oder „feucht“. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollgruppen („nach 1 Minute“ und „nach 10 Minuten“) war nicht zu beobachten.

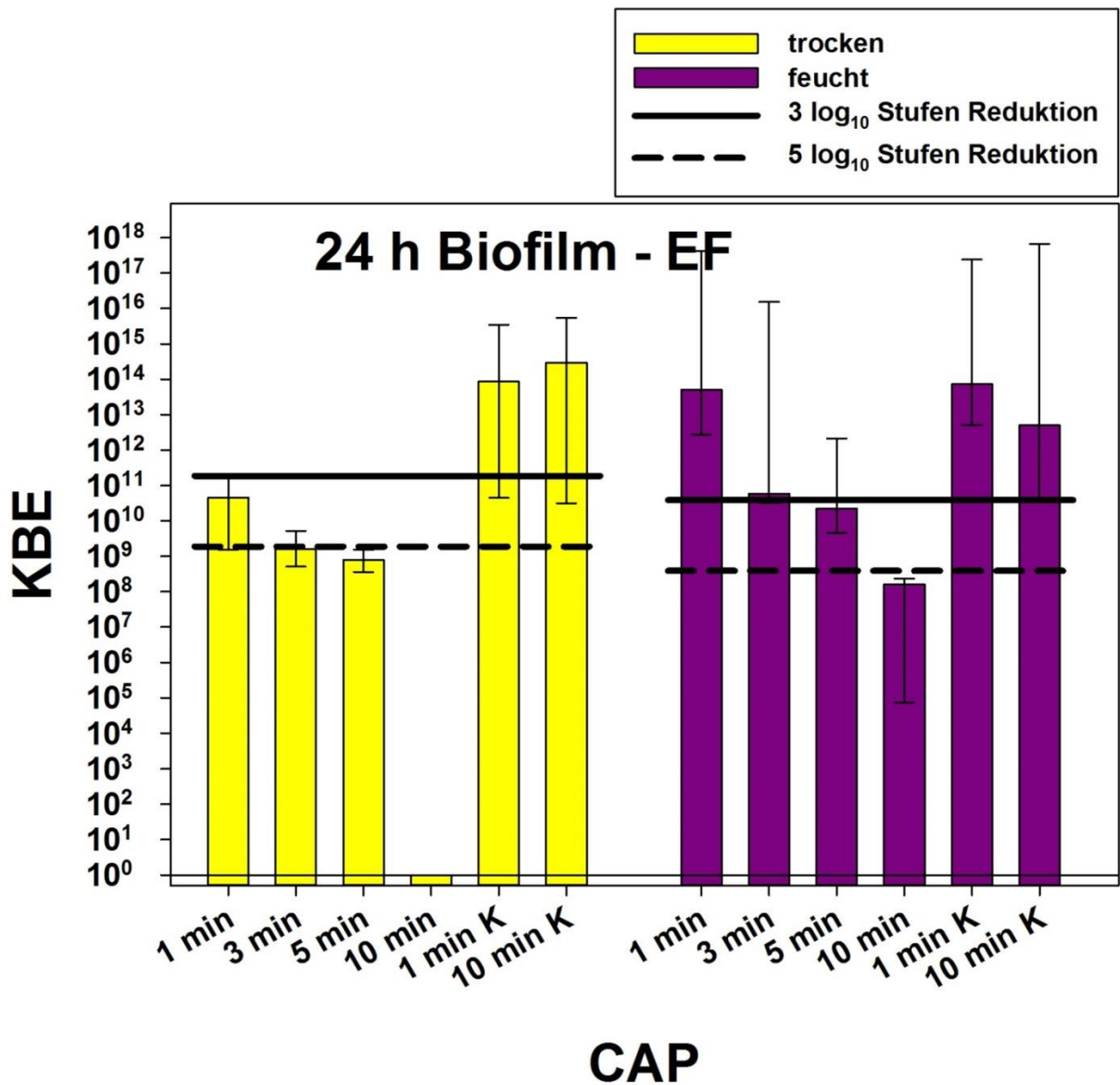


Abb. 9 Dargestellt ist der Einfluss von CAP auf einen 24h alten Biofilm *E. faecalis*. Bei an der Luft getrocknetem Biofilm (gelbe Säulen) zeigte sich bei einer Behandlungsdauer von einer Minute eine Reduzierung der KBE um mehr als 3 log₁₀-Stufen. Ab 3 Minuten Behandlungszeit fand eine Reduktion von mindestens 5 log₁₀-Stufen statt. Im Feuchten (violette Säulen) gab es ab einer Behandlungszeit von 5 Minuten eine log₁₀-Stufen-Reduktion von über 3 log₁₀-Stufen, bei einer Behandlung von 10 Minuten betrug die Reduktion der KBE mehr als 5 log₁₀-Stufen. 1 min K: unbehandelte Kontrolle nach 1 Minute Standzeit, 10 min K: unbehandelte Kontrolle nach 10 Minuten Standzeit, schwarze horizontale Linie: Detektionslimit.

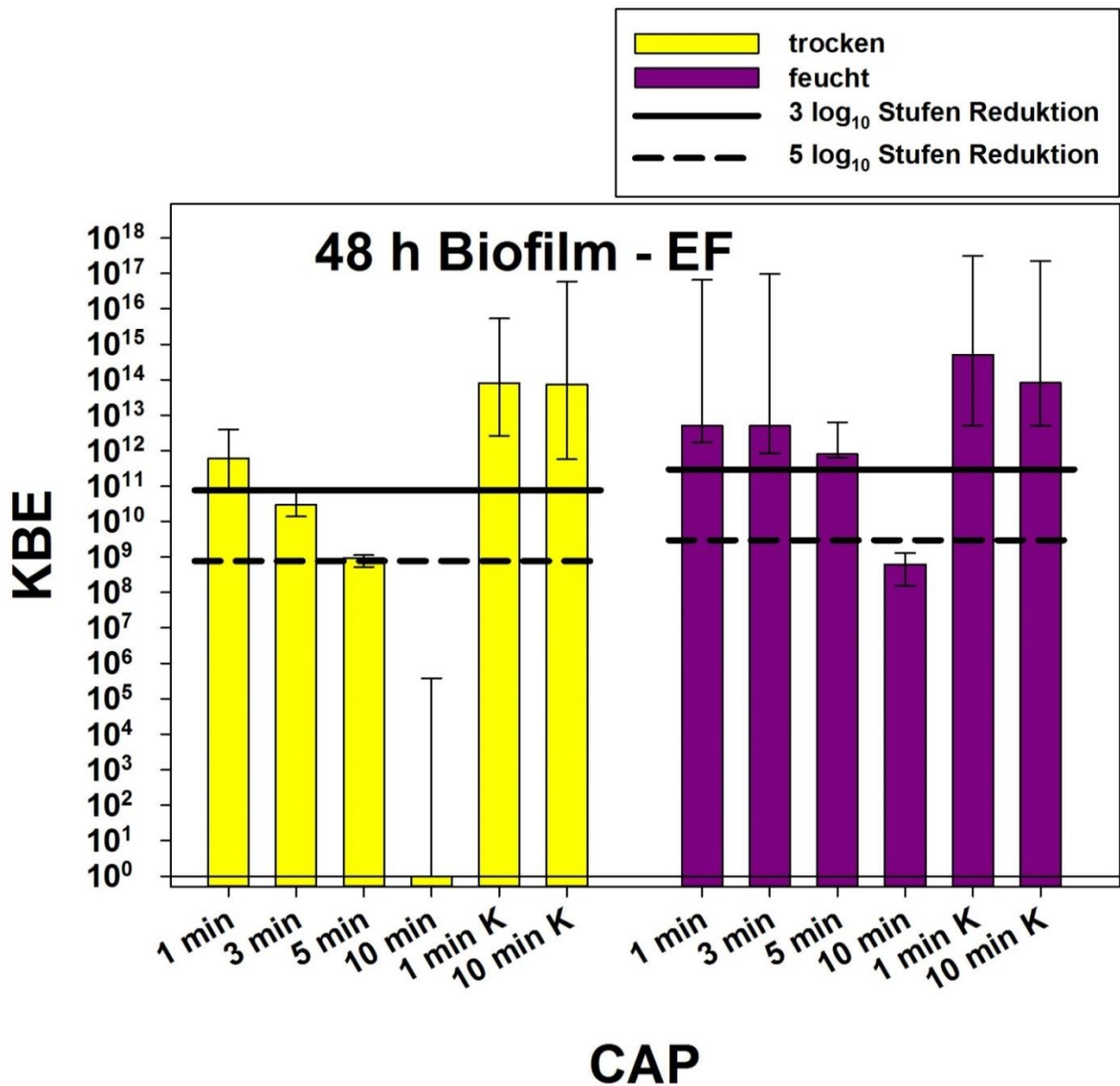


Abb. 10 CAP-Einfluss auf 48 Stunden alten Biofilm. Im Trockenem konnte ab einer Behandlungsdauer von 3 Minuten eine Reduktion der KBE um mindestens 3 log₁₀-Stufen erreicht werden, bei einer Dauer von 10 Minuten lag die Anzahl der KBE unter dem Detektionslimit. Bei den feuchten Biofilmen wurde ab 10 Minuten Behandlungsdauer eine Reduktion von über 5 log₁₀-Stufen erreicht. 1 min K: unbehandelte Kontrolle nach 1 Minute Standzeit, 10 min K: unbehandelte Kontrolle nach 10 Minuten Standzeit, schwarze horizontale Linie: Detektionslimit.

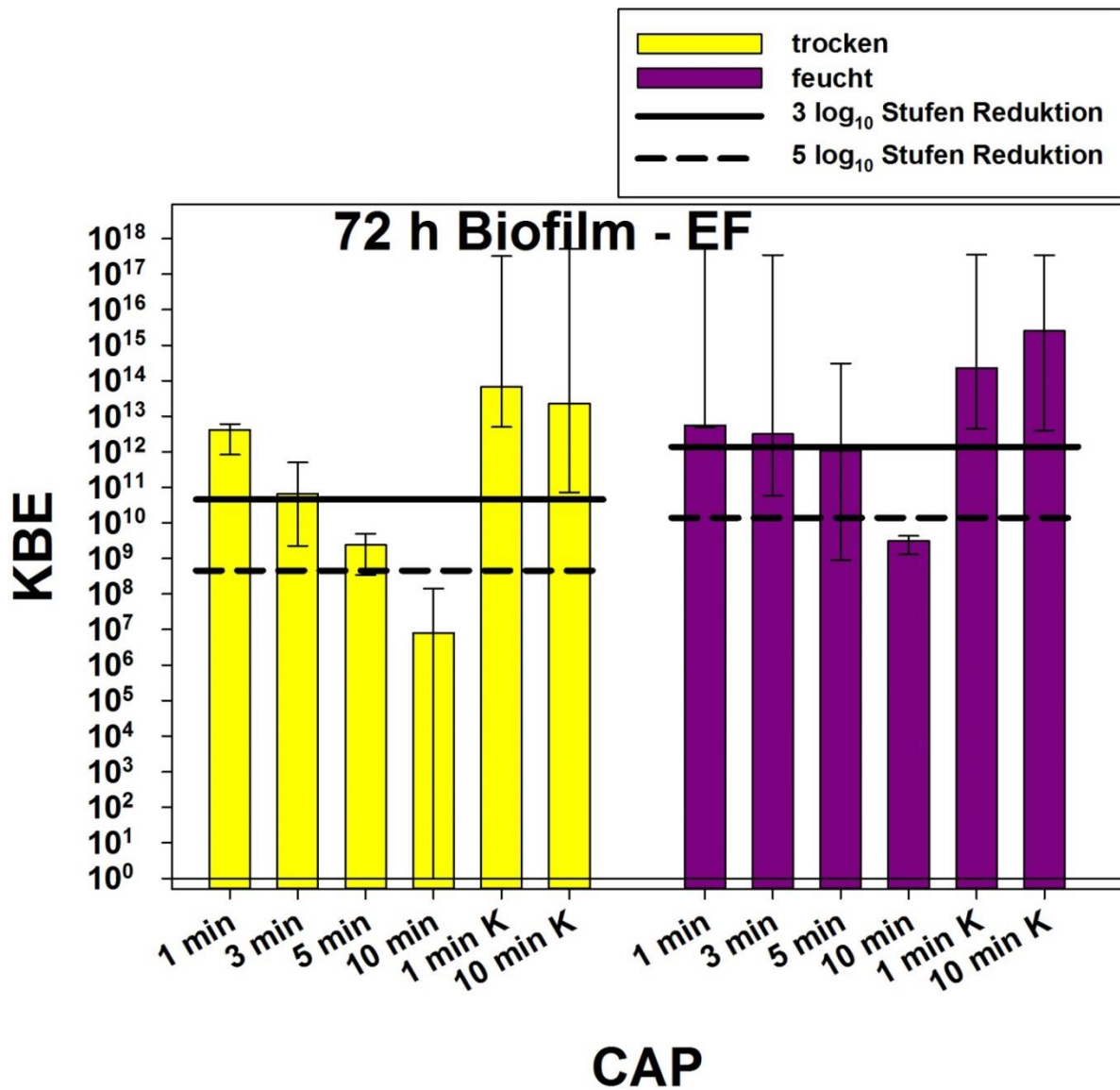


Abb. 11 CAP-Einfluss auf 72 Stunden alten Biofilm. Die Anzahl der KBE des trockenen Biofilms wurde nach einer Behandlungsdauer von 5 Minuten um mehr als 3 log₁₀Stufen reduziert, bei einer 10-minütigen Behandlung um über 5 log₁₀Stufen. Im Feuchten erfolgte nach 10 Minuten CAP-Anwendung eine Reduktion der KBE von mehr als 5-log₁₀Stufen. 1 min K: unbehandelte Kontrolle nach 1 Minute Standzeit, 10 min K: unbehandelte Kontrolle nach 10 Minuten Standzeit, schwarze horizontale Linie: Detektionslimit.

Die Möglichkeit, den Erreger *Enterococcus faecalis* mittels Plasma zu bekämpfen, ist in der Zahnmedizin neben der Parodontologie vor allem im Bereich der Endodontologie gegenwärtig im Fokus der Forschung. Wie schon in früheren Abschnitten dieser Arbeit erwähnt, gilt *E. faecalis* als „Problemkeim“ im Wurzelkanal (vgl. Kapitel 1.2). Die im Folgenden vorgestellten *In-vitro*-Studien belegen die gute Wirksamkeit von Cold Atmospheric Plasma gegenüber *E. faecalis*. Im Jahr 1987 entwickelten *Haapasalo et al.* ein Ex-vivo-Modell aus einwurzeligen extrahierten bovinen Zähne, um die Bedingungen im Wurzelkanalsystem möglichst wirklichkeitsgetreu darzustellen und eine Infektion der Dentintubuli labortechnisch simulieren zu können [20]. Dieses Schema dient als Vorlage auf dem Forschungsgebiet der Endodontologie und wird in leicht abgewandelter Form noch heute verwendet. So führten *Herbst et al.* in einer Studie aus dem Jahr 2015 an 32 standardisierten Wurzelkanälen humaner Unterkieferprämolaren, die sie im Vorfeld mit *E. faecalis* infizierten, Untersuchungen zu möglichen Inaktivierungsverfahren durch [63]. Getestet wurde die Desinfektion mittels 2%igem CHX, alleiniger CAP-Behandlung für 60 Sekunden und einer Kombination aus beidem. Die höchste \log_{10} -Stufen-Reduktion wurde bei der Behandlung mit CHX + CAP (\log_{10} -Stufen-Reduktion von 3,56) festgestellt, gefolgt von der alleinigen CAP-Behandlung (\log_{10} -Stufen-Reduktion von 3,27) und CHX (\log_{10} -Stufen-Reduktion von 2,65), jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe [63]. Im Verlauf der Experimente für die vorliegende Forschungsarbeit wurde eine Reduktion von über 3 \log_{10} -Stufen nach 1-minütiger CAP-Behandlung nur beim trockenen 24 Stunden alten Biofilm (vgl. Abb. 9) erreicht. Im Gegensatz zu der beschriebenen Studie von *Herbst et al.* wurde im Rahmen dieser Dissertation ein statischer *E. faecalis*-Biofilm auf einer inerten Plastikoberfläche kultiviert. Um die Ergebnisse beider Studien besser vergleichen zu können, sollten in einer nächsten Evaluierung von CAP diese Versuche deshalb ebenfalls in einem artifiziell infizierten Wurzelkanal wiederholt werden.

Auch *Li et al.* verglichen in einer ähnlich gestalteten Ex-vivo-Studie die Wirksamkeit von CAP im Vergleich zu bewährten Desinfektionsmitteln wie CHX und Ca(OH)_2 im Wurzelkanal [55]. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der inaktivierende Effekt des Plasmas stark von der Behandlungsdauer abhängt: Die Bakterienanzahl von 10^7 - 10^8 KBE/ml nach dreiwöchiger Inkubationszeit der Biofilme reduzierte sich nach dreiminütiger CAP-Behandlung auf eine KBE von ca. 10^5 , nach 12 Minuten waren alle Bakterien abgetötet,

das heißt, die Anzahl der KBE war unter dem Detektionslimit [55]. Die Ergebnisse dieser Dissertation bestätigen die Aussage dieser Doktorarbeit, dass die Bakterienreduktion mit Verlängerung der Plasmabehandlung erheblich steigt (vgl. Abb. 9-11): hier war ab einer Behandlungsdauer von 10 Minuten immer eine Reduktion der KBE um mehr als 5 log₁₀-Stufen möglich.

Um noch zwei weitere Forschungsgruppen zu nennen, seien die Studien von *Üreyen Kaya et al.* [54] und *Zhou et al.* [64] erwähnt, die eine antibakterielle Wirkung von CAP gegenüber *E. faecalis* im artifiziell infizierten Wurzelkanal bestätigen. Der allgemeine Tenor der genannten Studien besteht in der Hoffnung, im Niedrigtemperaturplasma eine neue Möglichkeit gefunden zu haben, problematische Bakterien, zum Beispiel in schwer zugänglichen Gebieten wie dem Wurzelkanal oder solche mit Antibiotikaresistenz, effektiv zu inaktivieren. Allerdings fordern alle Autoren als nächsten Schritt umfassende klinische Studien zur Bestätigung der gewonnenen Daten aus den *In-vitro*-Versuchsaufbauten.

Der Einfluss des Biofilmalters auf die Toxizität der verschiedenen Agenzien wird in Kapitel 5.1.4 diskutiert.

5.1.2 CHX-Versuche

Wie in Kapitel 2 beschrieben, ist Chlorhexidin (CHX) in verschiedenen Konzentrationen ein in der Zahnmedizin häufig eingesetztes Desinfektionsmittel in den Bereichen der Parodontologie, Kariologie oder Endodontologie. Aus diesem Grund wurden die *E. faecalis*-Biofilme auch mit CHX behandelt. Dafür wurden die Biofilme, wie in Kapitel 4.5.2 ausführlich erläutert, mit PBS gewaschen und danach für fünf Minuten mit CHX versetzt. Dabei kamen CHX-Konzentrationen von 0,2% als auch von 2% zum Einsatz. Nach Absaugen des Agens und nochmaligem Waschen mit PBS wurde der Biofilm in 1 ml PBS gelöst, abgekratzt, in Eppendorf-Cups überführt und in sechs Verdünnungsstufen auf eine Agarplatte aufgebracht. Am nächsten Tag wurden die koloniebildenden Einheiten gezählt und dokumentiert. Außerdem wurde jeweils eine unbehandelte Kontrollprobe mitgeführt und ausgewertet. Die Untersuchungsreihe mit CHX fand mit Biofilmen unterschiedlichen Alters (24, 48 oder 72 Stunden) und den zwei Versuchsbedingungen „trocken“ oder „feucht“ statt.

Die folgenden drei Abbildungen (Abb. 12-14) zeigen, graphisch ausgewertet, die Ergebnisse der antibakteriellen Wirkung von CHX gegen *E. faecalis*-Biofilme.

Unabhängig vom Alter und den Versuchsbedingungen „trocken“ oder „feucht“ der Biofilme nahm die Anzahl der KBE bei Zugabe von 2%igem CHX um mehr als 5 \log_{10} -Stufen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ab. Die Höhe der KBE lag bei diesem Versuch immer unter dem Detektionslimit. Auch das 0,2%ige CHX zeigte eine desinfizierende Wirkung: beim trockenen Biofilm lag die Reduktion der KBE aller drei Biofilm-Altersstufen bei mindestens 5 \log_{10} -Stufen. Im Feuchten erfolgte nach Zugabe von 0,2%igem CHX eine \log_{10} -Stufen-Reduktion von über 3 \log_{10} -Stufen.

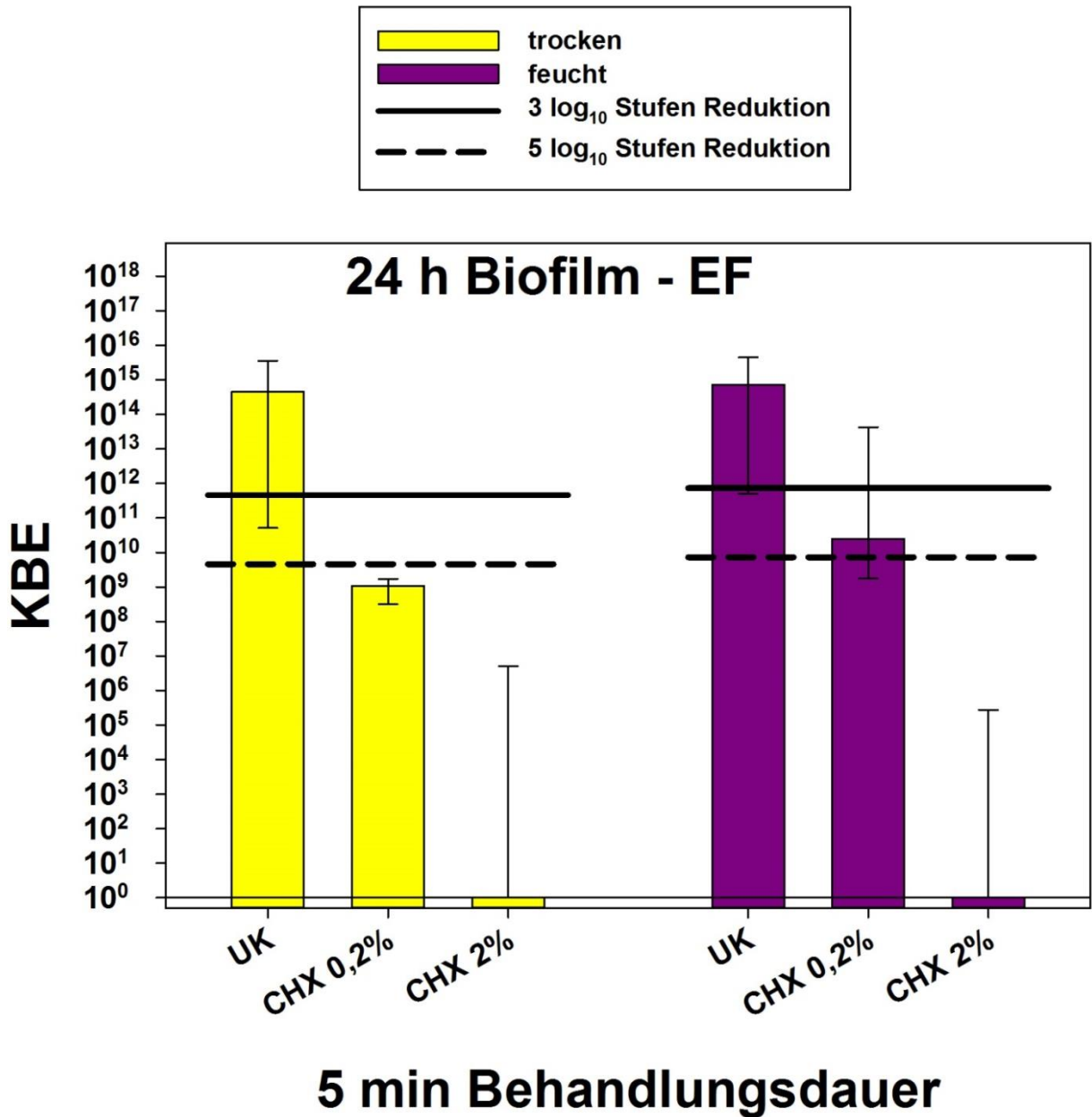


Abb. 12 CHX-Behandlung bei 24 Stunden altem Biofilm *E. faecalis*. Im Trockenen fand sowohl bei 0,2%igem, als auch bei 2%igem CHX eine Reduktion von über 5 log₁₀-Stufen statt. Bei Letzterem lag die Anzahl der KBE unter dem Detektionslimit. Beim feuchten Biofilm erfolgte bei einer CHX-Konzentration von 0,2% eine log₁₀-Stufen-Reduktion von mehr als 3 log₁₀-Stufen, bei 0,2%igem CHX lag die Anzahl der KBE unter dem Detektionslimit. Die log₁₀-Stufen-Reduktionen wurden immer in Relation zu der jeweiligen Kontrollprobe berechnet. UK: Unbehandelte Kontrolle, dünne schwarze horizontale Linie: Detektionslimit.

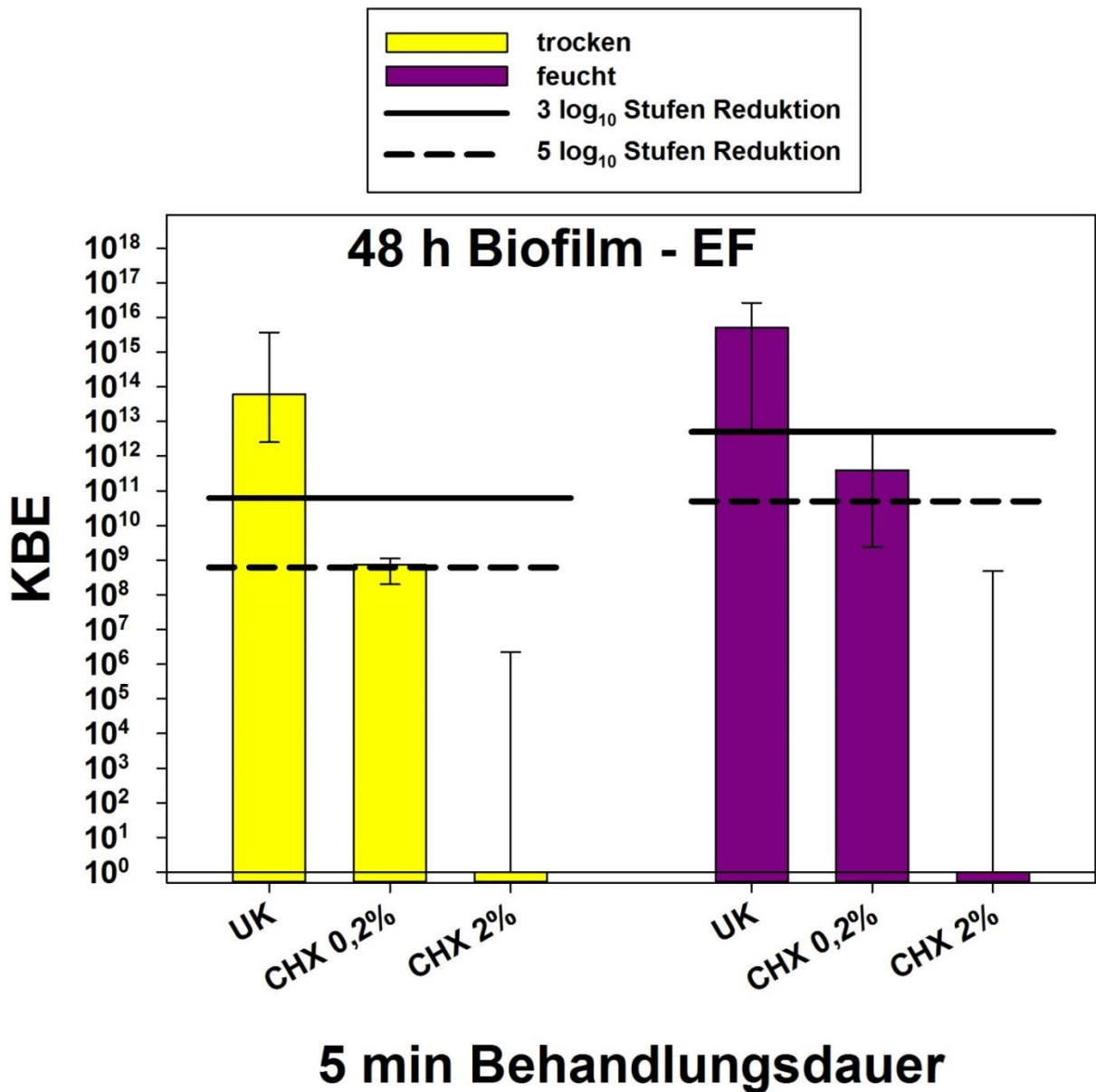


Abb. 13 CHX-Behandlung bei 48 Stunden altem Biofilm *E. faecalis*. Im Trockenen reduzierte sich die KBE bei einer Behandlung mit 0,2%igem CHX um 5 log₁₀-Stufen, nach einer 5-minütigen Einwirkzeit von 2%igem CHX lag die Anzahl KBE unter dem Detektionslimit. Im Feuchten erfolgte nach 5-minütiger CHX-Behandlung eine Reduktion der KBE um über 3 log₁₀-Stufen bei 0,2% CHX und um mehr als 5 log₁₀-Stufen bei 2% CHX. UK: Unbehandelte Kontrolle, dünne schwarze horizontale Linie: Detektionslimit.

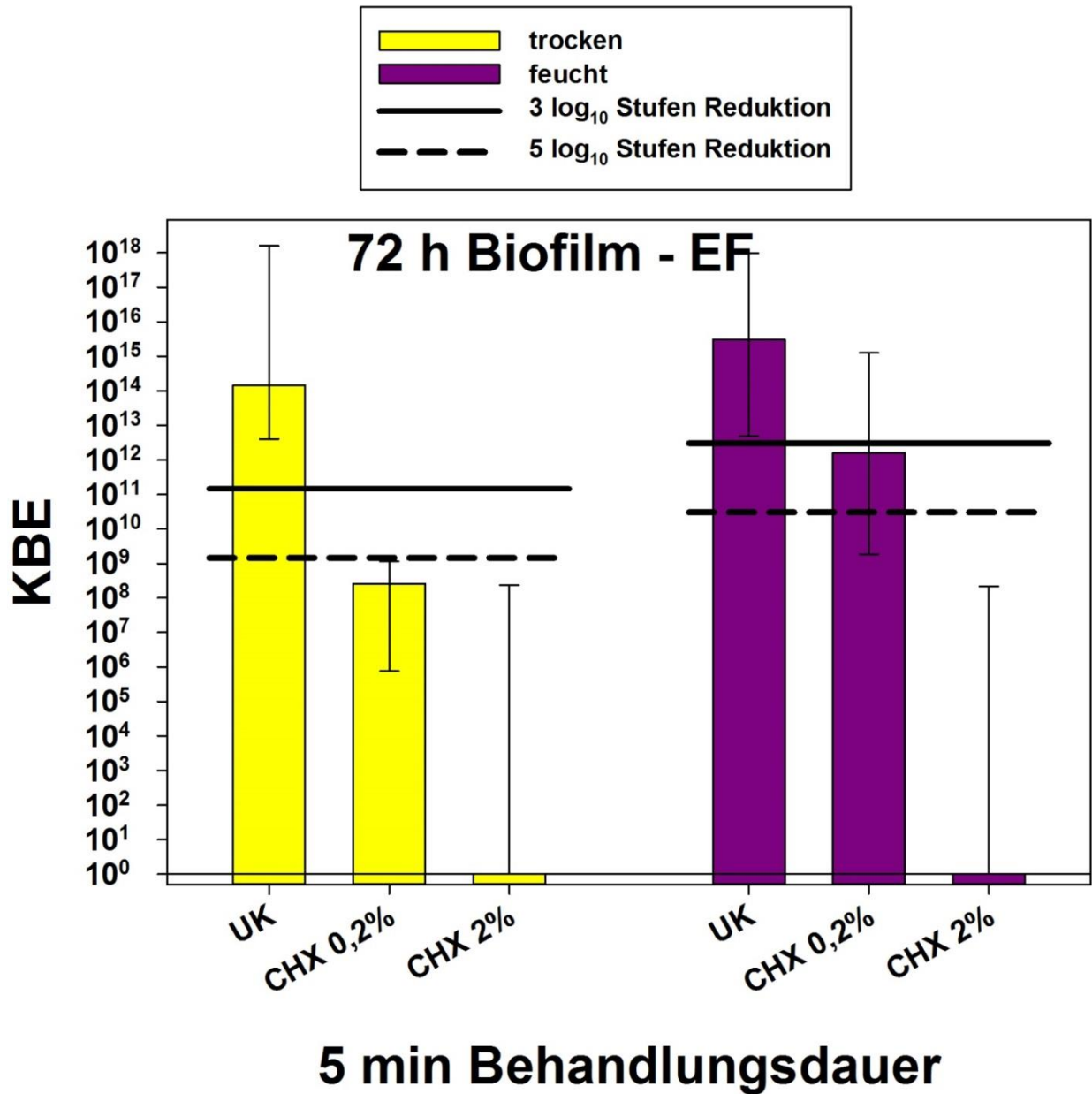


Abb. 14 CHX-Behandlung bei 72 Stunden altem Biofilm *E. faecalis*. Im Trockenem reduzierte sich die KBE bei einer Behandlung mit 0,2%igem CHX um über 5 \log_{10} -Stufen, nach einer 5-mütigen Einwirkzeit von 2%igem CHX lag die Anzahl KBE unter dem Detektionslimit. Im Feuchten erfolgte nach 5-minütiger CHX-Behandlung eine Reduktion der KBE um über 3 \log_{10} -Stufen bei 0,2% CHX und um mehr als 5 \log_{10} -Stufen bei 2% CHX. UK: Unbehandelte Kontrolle, dünne schwarze horizontale Linie: Detektionslimit.

In der Zahnmedizin gilt CHX seit Jahrzehnten als Goldstandard für die Desinfektion bei Entzündungen und Krankheiten in der Mundhöhle, sei es bei Patienten mit Parodontitis, Wurzelkanalentzündungen oder zur Kariesprävention. Demzufolge wird CHX in vielen Studien als Vergleichsagens zu alternativen Desinfektionsmitteln herangezogen.

Chemisch gesehen ist CHX (1,1-Hexamethylenbis[5-(4-chlorphenyl)biguanid]) (siehe Abb. 15) ein symmetrisches, kationisches Bisbiguanid, das durch seine zweifach positive Ladung sehr reaktionsfreudig ist [65]. Somit bindet es unter anderem an die negativ geladenen Bakterienzellwände, infiltriert diese und führt durch Strukturveränderungen an der Zellwand der Bakterien zu deren Inaktivierung. CHX wirkt sowohl gegen grampositive- als auch gramnegative Bakterien und hat je nach Konzentration einen bakteriostatischen oder bakteriziden Effekt [66].

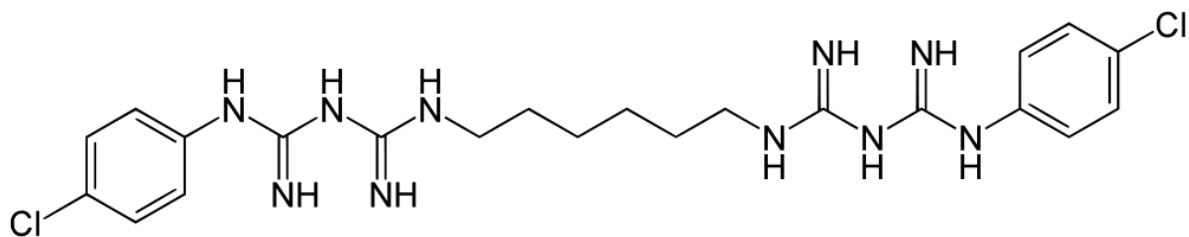


Abb. 15 Strukturformel von CHX

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentrationen von 0,2% und 2% werden in der Zahnarztpraxis je nach Krankheitsbild unterschiedlich verwendet. Im Bereich der Parodontologie kommt das niedriger dosierte CHX von 0,2% zum Einsatz [58], wohingegen in der Endodontologie häufig hartnäckigen Keimen, wie zum Beispiel *E. faecalis*, entgegengewirkt werden muss, was die Anwendung von 1-2%igem CHX indiziert [9].

Gomes et al. untersuchten im Jahr 2001 *in vitro* die antiseptischen Potentiale von CHX und NaOCl in verschiedenen Konzentrationen und Darreichungsformen gegenüber *E. faecalis* [67]. NaOCl (0,5%, 1%, 2,5%, 4% und 5,25%) wurde in liquider Form verwendet, CHX (0,2%, 1% und 2%) sowohl als Gel, wie auch als Flüssigkeit. 24 Stunden lang inkubierte *E. faecalis*-Kolonien wurden in 0,85%iger Kochsalzlösung resuspendiert und mit den erwähnten Agenzien für jeweils 10, 30 und 45 Sekunden und 1, 3, 5, 10, 20, 30, 60 und 120 Minuten in

Kontakt gebracht. Alle getesteten Stoffe führten zu einer vollständigen Bakterienelimination, die jedoch abhängig von Einwirkzeit und Antiseptikum war. Aus Gründen der Übersichtlichkeit soll im Folgenden nur auf die zwei Agenzien näher eingegangen werden, die auch im Rahmen dieser Dissertation verwendet wurden. Nach einer Einwirkzeit von 30 Sekunden des 0,2%igen CHX konnten keine koloniebildenden Einheiten von *E. faecalis* mehr detektiert werden, für das 2%ige CHX war sogar eine Dauer von unter 30 Sekunden für den gleichen Effekt ausreichend [67]. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde für beide CHX-Konzentrationen eine Kontaktdauer von 5 Minuten mit dem Mikroorganismus gewählt. Für das 2%ige CHX wurde auch hier eine komplette Bakterieninaktivierung erreicht, in der niedrigeren Konzentration von 0,2% wurde die Anzahl der KBE im Feuchten jedoch nur um 3 \log_{10} -Stufen reduziert, im Trockenen um 5 \log_{10} -Stufen. Dies steht im Gegensatz zu den Resultaten von *Gomes et al.*, die eine komplette Bakterienelimination nach 30 Sekunden Einwirkzeit von 0,2%igem CHX zeigen [67]. Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte der Umstand sein, dass *Gomes et al.* mit einer planktonischen Bakterienlösung arbeiteten, im Gegensatz zum Biofilm-Modell dieser Promotionsarbeit. Wie in Kapitel 1.1 erwähnt, sind Bakterien, die in einem Biofilm organisiert sind, in einem Netzwerk miteinander verwoben und in diesem Zusammenschluss viel effektiver vor der Wirkweise antibakterieller Stoffe geschützt als frei flottierende Mikroorganismen. Dies scheint entweder eine Erhöhung der Einwirkzeit oder der Konzentration des verwendeten Agens nötig zu machen. Um diese Vermutung zu bestätigen, sollten jedoch weitere Versuchsreihen durchgeführt werden, um die Effektivität von CHX in planktonischen Lösungen und in Biofilmen unter gleichen Bedingungen vergleichen zu können.

Viele andere Autoren, vor allem im Forschungsbereich der Endodontologie, beschäftigen sich ebenfalls mit der antibakteriellen Wirkung von CHX, wobei CHX meist als Vergleichsstoff zu unterschiedlichsten innovativen Desinfektionsmitteln getestet wird. So existieren Studien, die an CHX unter anderem die Wirkung von antibakterieller photodynamischer Therapie messen [68], von Octenisept [69], von pflanzlichen Stoffen wie *Azadirachta indica*, *Curcuma longa* [70], *Arctium lappa* oder *Aloe vera* [71]. In all diesen Arbeiten wird die sehr gute antimikrobielle Effektivität von CHX gegen Bakterien bestätigt.

Einen interessanten Ansatz zur Maximierung der Wirksamkeit von CHX stellten *Haseeb et al.* in einer *In-vitro*-Studie aus dem Jahr 2016 vor [72]. Aufgrund der schnellen Flüchtigkeit des

Wirkstoffes bei herkömmlichen Spüllösungen, suchte die Forschungsgruppe um *Haseeb* eine Möglichkeit, die Verweildauer und die Penetration der Dentintubuli der antibakteriellen Komponenten zu erhöhen. Eine denkbare Methode besteht somit im Einschließen des CHX-Wirkstoffes in Nanopartikel, die durch Trägerstoffe wie Spüllösungen, medikamentöse Einlagen oder Wuzelkanal-Sealer in das Endodont gelangen. Somit kommen die Nanopartikel am gewünschten Wirkungsort zum Liegen, das eingekapselte CHX diffundiert in das umliegende Gewebe und kann dort bis zu 21 Tage lang effektiv lokal wirken [72]. Nach erfolgreicher *In-vitro*-Testung sollten die Ergebnisse zukünftig in klinischen Studien näher untersucht werden.

Wie die genannten Studien belegen, ist CHX also noch immer aus gutem Grund Mittel der Wahl bei der Keimreduzierung in der Mundhöhle. Bei längerer Anwendung können jedoch einige unerwünschten Nebenwirkungen, wie Zahn- und Zungenverfärbungen, Zahnsteinbildung oder Geschmacksirritationen die Folge sein [73, 74]. Aus diesem Grund ist die Erforschung alternativer Desinfektionsagenzien von hoher Relevanz.

5.1.3 UVC-Versuche

Parallel zu den Experimenten mit CAP und CHX wurde der *E. faecalis*-Biofilm auch mit UVC behandelt. Gemäß der Versuchsbeschreibung in Kapitel 4.5.3 wurden dafür Energiedosen von 0,005 J/cm², 0,065 J/cm², 0,13 J/cm² und 0,26 J/cm² verwendet. Auch bei der Bestrahlung mit UVC wurden Biofilme im Alter von 24, 48 oder 72 Stunden verwendet und es wurde zwischen „trockenem“ und „feuchten“ Biofilm unterschieden.

Die Ergebnisse sollen im Folgenden anhand der gezeigten Graphiken (Abb. 16-18) analysiert werden.

Bis auf eine Ausnahme (48h alter Biofilm, trocken, 0,065 J/cm²) kann man erkennen, dass die Bestrahlung mit UVC sowohl im Trockenen als auch im Feuchten äußerst effektiv gegen *E. faecalis* war: bei einer Dosis von 0,005 J/cm² reduzierte sich die Anzahl der KBE um mehr als 5 log₁₀-Stufen und ab einer Dosis von 0,065 J/cm² lag die Anzahl der KBE unter dem Detektionslimit.

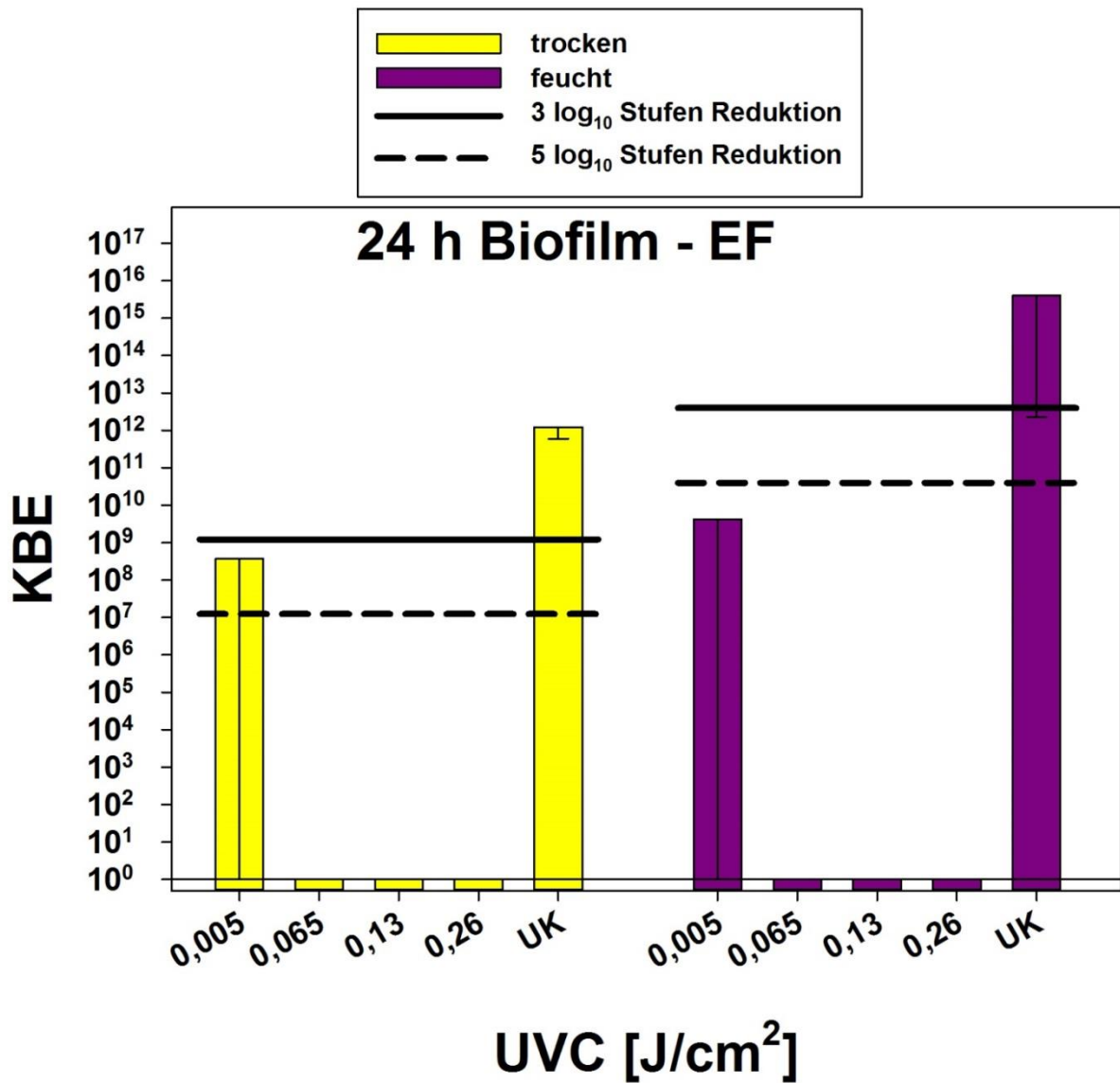


Abb. 16 UVC-Bestrahlung bei 24 Stunden altem Biofilm. Im Trockenem erfolgte bei einer Dosis von 0,005 J/cm² eine Reduktion der KBE um mehr als 3 log₁₀-Stufen. Ab einer Energiedosis von 0,065 J/cm² lag die Anzahl der KBE unter dem Detektionslimit. Im Feuchten erfolgte ab einer Dosis von 0,005 J/cm² eine Reduktion der KBE um mehr als 5 log₁₀-Stufen, ab einer Dosis von 0,065 J/cm² lag die Anzahl der KBE unter dem Detektionslimit. UK: Unbehandelte Kontrolle, dünne schwarze horizontale Linie: Detektionslimit.

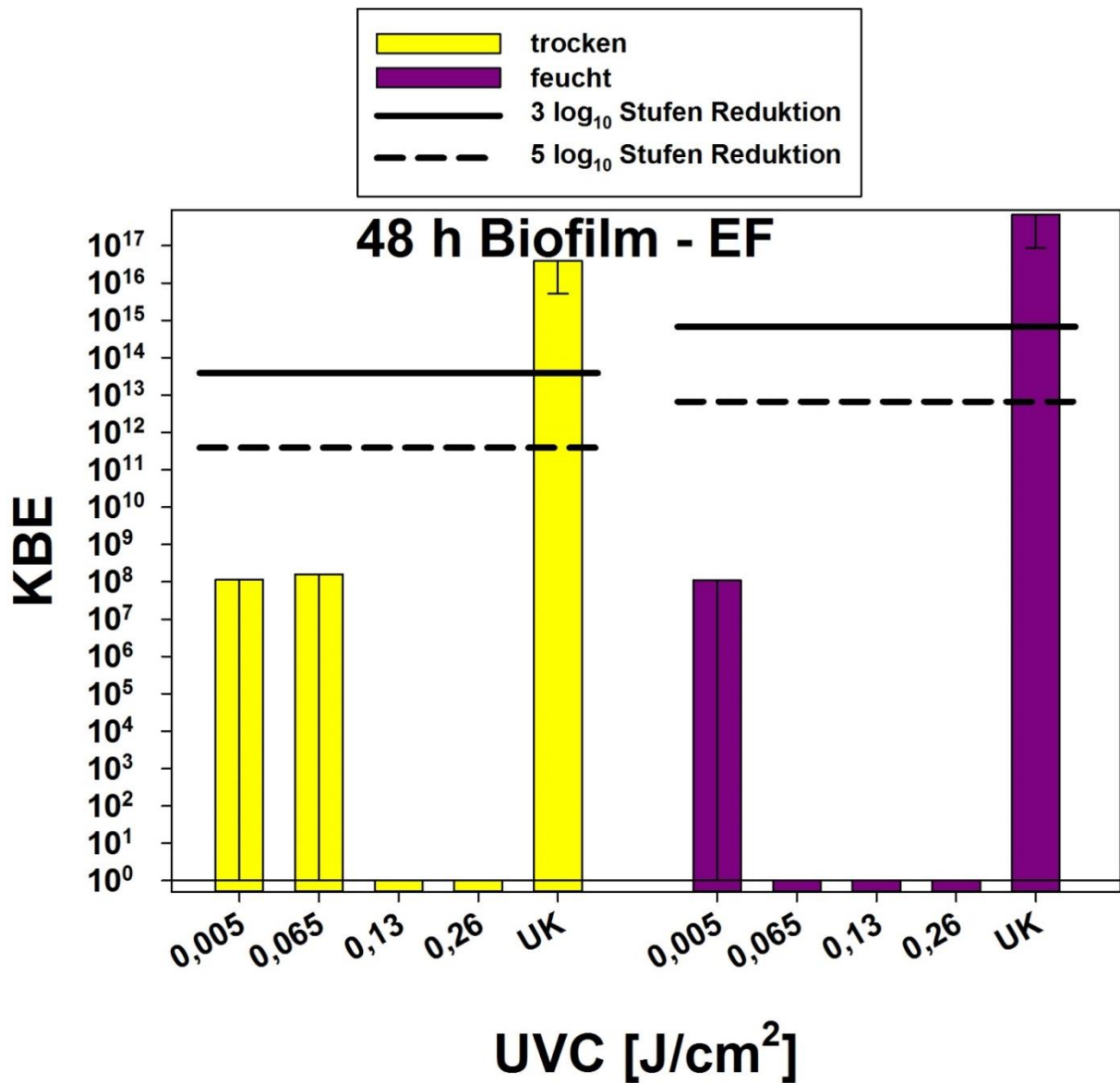


Abb. 17 UVC-Bestrahlung bei 48 Stunden altem Biofilm. Alle bestrahlten Proben wiesen nach dem Auszählen sowohl im Trockenem als auch im Feuchten eine Reduktion ihrer KBE um mehr als 5 log₁₀-Stufen auf. UK: Unbehandelte Kontrolle, dünne schwarze horizontale Linie: Detektionslimit.

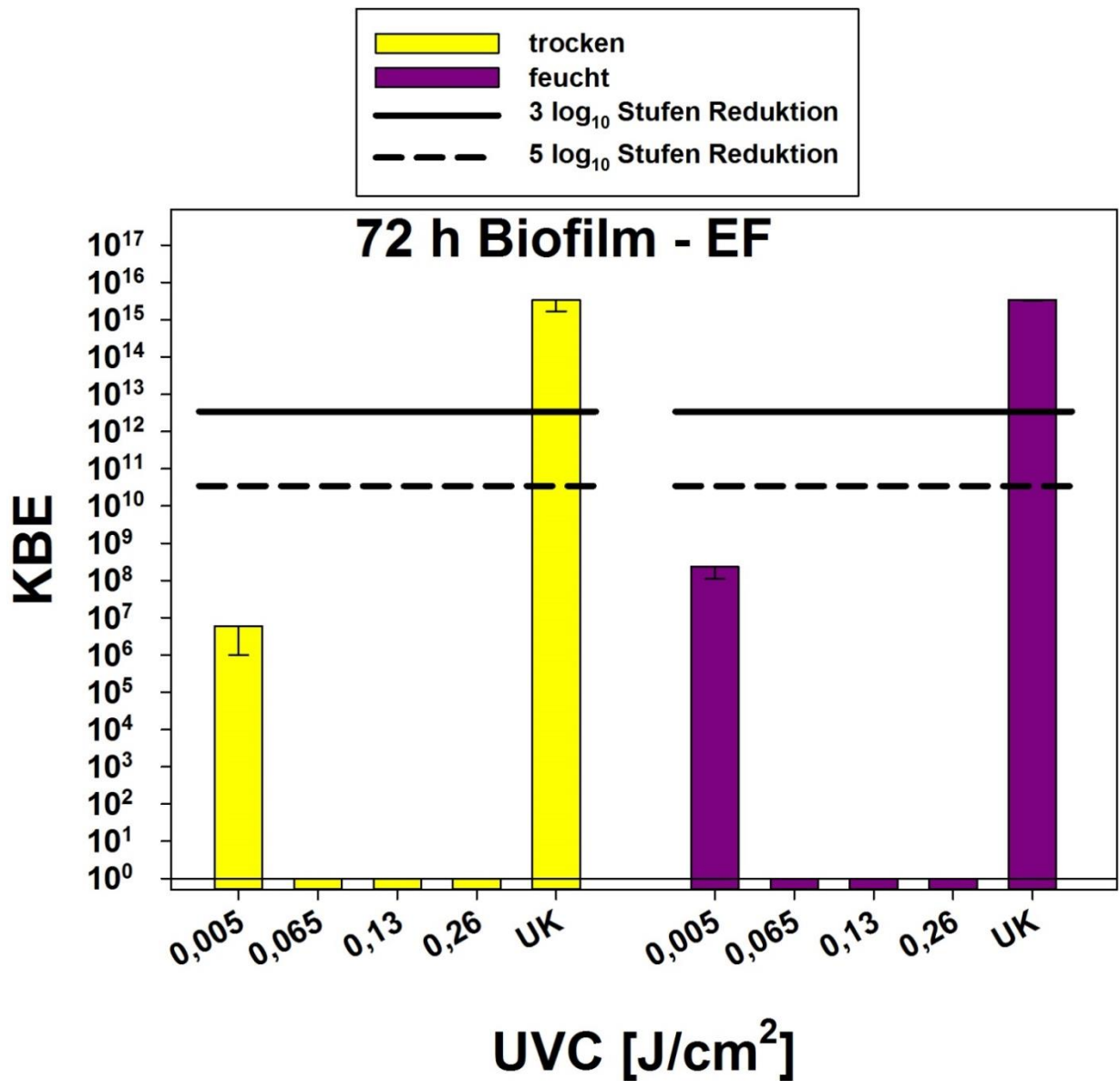


Abb. 18 UVC-Bestrahlung bei 72 Stunden altem Biofilm. Sowohl im trockenen als auch im feuchten Zustand erfolgte ab einer Bestrahlungsdosis von 0,005 J/cm² eine Reduktion der KBE um mehr als 5 log₁₀-Stufen, ab einer Dosis von 0,065 J/cm² lag die Anzahl der KBE jeweils unter dem Detektionslimit. UK: Unbehandelte Kontrolle, dünne schwarze horizontale Linie: Detektionslimit.

Bevor die Ergebnisse aus den UVC-Versuchen mit bestehender Fachliteratur verglichen werden, sollen im Folgenden kurz die Eigenschaften und die Wirkweise von UVC geschildert werden.

Schon im Jahr 1878 beschrieben *Downes* und *Blunt* ihre Entdeckung, dass Mikroorganismen, insbesondere Bakterien, unter Sonneneinstrahlung in ihrem Wachstum gehemmt sind [75]. Heute weiß man, welcher Teil des Sonnenlichts für diese antibakterielle Wirkung verantwortlich ist. Abb. 19 zeigt einen Teil des elektromagnetischen Spektrums: im Bereich von ca. 400 nm bis 780 nm spricht man von für den Menschen sichtbarem Licht. Die darüberliegenden Wellenlängenbereiche zählen zum Infrarot-Bereich, die darunterliegenden werden als ultraviolette Strahlung bezeichnet. UV-Strahlung wird weiter unterteilt in die Bereiche UV-A (400-320 nm), UV-B (320-290 nm) und (UV-C 290-200 nm) [76]. Eine keimtötende Wirkung hat dabei die UVC-Strahlung, am effektivsten bei einer Wellenlänge von ca. 254 nm. Diese Wellenlänge ist deshalb besonders gut geeignet, weil sie weitgehend dem Absorptionsmaximum der DNS entspricht. Der ausgelöste photochemische Prozess initiiert eine Veränderung der Bakterien-DNS, wodurch die DNS-Replikation beeinträchtigt und der Mikroorganismus inaktiviert wird [77, 78].

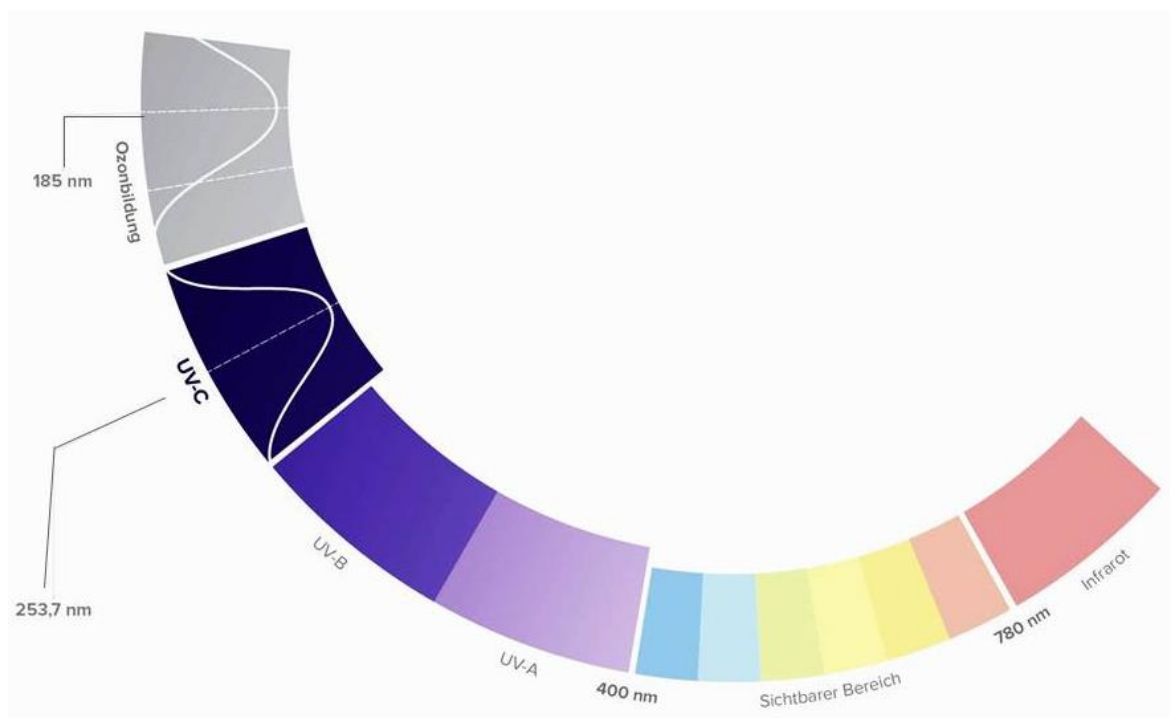


Abb. 19 Ausschnitt aus dem elektromagnetischen Spektrum [79]

In einer *In-vitro*-Studie aus dem Jahr 1998 untersuchten *Conner-Kerr et al.* die Effektivität einer UVC-Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 254 nm gegen antibiotikaresistente Stämme von *Staphylococcus aureus* und *Enterococcus faecalis* [80]. Zum Einsatz kamen bei den Untersuchungen Bakteriensuspensionen, die vor der UVC-Behandlung auf Schafsblut-Agarplatten ausgestrichen und nach erfolgter Bestrahlung für 24 Stunden bei 35° C inkubiert wurden. Die in der Studie angegebene Bestrahlungsstärke von 15.54 mW/cm² kann, multipliziert mit der Zeit, in die Dosis umgerechnet werden:

$$\text{Dosis [J/cm}^2\text{]} = \text{Bestrahlungsstärke [W/cm}^2\text{]} \times \text{Zeit [s]}$$

Somit ergeben sich gerundet Bestrahlungsdosen von 0,03, 0,07, 0,12, 0,23, 0,46, 0,7, 0,93, 1,39 und 1,86 J/cm². Beide Bakterienstämme wurden ab einer Dosis von 0,07 J/cm² um 99,9% inaktiviert. Die Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stämme (*MRSA*) erreichten ab einer Dosis von 1,39 J/cm² eine Reduktion von 100%, bei den Vancomycin-resistenten *E. faecalis*-Stämmen (*VRE*) war dies schon ab einer Bestrahlung von 0,7 J/cm² der Fall. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass UVC gegenüber den beschriebenen Bakterien eine bakterizide Wirkung hat und dass dieser Effekt gegen *E. faecalis* mit niedrigeren Dosen erreicht werden kann als bei *S. aureus* [80]. Verglichen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich folgende Parallele ziehen: Ähnlich wie bei der Dosis von 0,7 J/cm² bei *Conner-Kerr et al.* lag die Anzahl der KBE von *E. faecalis* bei einer Dosis von 0,065 J/cm² im Rahmen dieser Dissertation bei einer Reduktion von über 5 log₁₀-Stufen bzw. unterhalb der Nachweisgrenze (siehe Abb. 16-18).

Bak et al. veröffentlichten im Jahr 2009 die Ergebnisse einer *In-vitro*-Studie zu dem Thema der Keimbesiedlung in Urinkathetern und deren Desinfektionsmöglichkeiten mittels UVC-Licht [81]. In den 67 untersuchten kontaminierten Schläuchen wurde nach Benutzung an Patienten eine hohe Rate an Biofilmbesiedlung gefunden, unter anderem bestehend aus *E. faecalis*. Die Katheterschläuche wurden in gleich große Stücke geschnitten und anschließend mit unterschiedlichen Energiedosen an UVC bestrahlt. Anschließend wurde der Biofilm aus dem Schlauch-Lumen entfernt und die KBE nach Bebrütung auf Agarplatten ausgezählt. Abhängig von den Kontrollproben, die keiner UVC-Bestrahlung ausgesetzt wurden, konnte die durchschnittliche Inaktivierungsrate durch UVC-Applikation berechnet werden. Nach einer UVC-Behandlung mit 0,0118 J/cm² konnte eine Keiminaktivierung von 89,6% erreicht

werden, bei einer Dosis von $0,047 \text{ J/cm}^2$ wurde eine Entkeimungsrate von 98% erzielt und bei $1,4 \text{ J/cm}^2$ von 99%.

Auch andere Studien, die sich mit der Desinfektion von Krankenzimmern durch UVC beschäftigten [82, 83], von medizinischen Geräten und Instrumenten [84–86] oder mit der Keimreduzierung im Lebensmittelbereich [87], bestätigen die gute Wirksamkeit der UVC-Strahlung gegen Bakterien. Somit ist mit dem Versuchsblock der *E. faecalis*-Inaktivierung mittels UVC eine gute Vergleichsmöglichkeit zur Wirksamkeit anderer Desinfektionsmittel, wie zum Beispiel von CAP, gegeben.

5.1.4 Diskussion der Ergebnisse in Abhängigkeit des Biofilmtalters

Insbesondere bei den CAP-Versuchen (Abb. 9-11), aber auch bei Behandlung mit CHX (Abb. 12-14) und UVC (Abb. 16-18), sind - bei gleichen Parametern - deutliche Unterschiede in der Anzahl der KBE bzw. in der Höhe der Keimreduktion zwischen den verschiedenen Biofilm-Altersstufen zu erkennen. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Biofilm mit steigendem Alter, das heißt in gleichem Maße mit zunehmender Biofilmdicke, weniger schnell und weniger effektiv von bakteriziden Agenzien beeinflusst wird.

Mit genau dieser Frage setzten sich *Chau et al.* in einer *In-vitro*-Studie aus dem Jahr 2015 auseinander [88]. Im Rahmen der Untersuchungen wurden *E. faecalis*-Biofilme auf Hydroxylapatit-Scheibchen kultiviert. Als Agens zur Inaktivierung wurde NaOCl in verschiedenen Konzentrationen gewählt. NaOCl wurde daraufhin mit einer Einwirkzeit von jeweils 5 Minuten gegen *E. faecalis*-Biofilme unterschiedlichen Alters getestet (22 h, 46 h, 70 h, und 94 h alte Biofilme). Außerdem wurde der Zusammenhang zwischen der Inaktivierungseffektivität und der Behandlungszeit näher untersucht. Dafür wurde der 70 Stunden alte Biofilm für 1, 3, 5 und 7 Minuten mit NaOCl versetzt. In den Ergebnissen der Studie beschrieben *Chau et al.* eine deutliche Korrelation zwischen der bakteriziden Wirkung von NaOCl und dem Alter des behandelten Biofilms: je älter der Biofilm, desto schwächer die Wirkung des Antiseptikums. Ein weiteres Resultat der Experimente war die Bestätigung, dass der Einfluss von NaOCl auch mit der Behandlungsdauer im Zusammenhang steht: je länger die Einwirkzeit desto höher der toxische Effekt [88].

Trotz unterschiedlicher Agenzien lassen diese Ergebnisse im Vergleich mit der vorliegenden Arbeit den Schluss zu, dass die antibakterielle Wirkung von Desinfektionsmitteln gegenüber *E. faecalis*-Biofilmen in Abhängigkeit von Biofilmalter und Behandlungszeit bewertet werden muss. Diese Vermutungen sollten jedoch noch in weiteren *In-Vivo*-Studien bestätigt werden.

5.2 Inaktivierung von *C. albicans*

Der zweite große Versuchsblock im Rahmen dieser Arbeit bestand aus dem Vergleich der Wirksamkeit von CAP mit hinlänglich erforschten Agenzien (CHX und UVC) zur Inaktivierung von *C. albicans*. Die folgenden Unterkapitel sollen die gewonnenen Ergebnisse genauer darstellen und mit schon vorhandener Literatur vergleichen.

5.2.1 CAP-Versuche

Bei den CAP-Experimenten mit *C. albicans* wurde der Pilz in zwei unterschiedlichen Versuchsaufbauten untersucht – einmal in Form von Agarplattenexperimenten und zum anderen in Form des schon von *E. faecalis* bekannten Biofilm-Modells. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser zwei Versuchsteile gezeigt.

5.2.1.1 Agarplatten-Versuche

Wie in Kapitel 4.6.4 beschrieben, wurde bei den Agarplatten-Versuchen eine *Candida*-Suspension direkt auf die Platten aufgebracht. Nach Verstreichen und Einziehen der Lösung wurden die Platten unter der Derma-Care-Plasmaquelle für 1, 3, 5 oder 10 Minuten mit CAP behandelt. Wie üblich wurde zusätzlich immer eine Kontrollreihe mit unbehandelten Platten angefertigt. Außerdem wurde untersucht, ob das Plasma möglicherweise einen direkten Einfluss auf den Agar hat, indem eine Platte erst mit CAP behandelt wurde und dann die *Candida*-Lösung aufgetragen wurde. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden nicht graphisch dargestellt. Deshalb soll hier erwähnt werden, dass die Anzahl der KBE nach diesem Verfahren genauso hoch war wie bei den Kontrollplatten. Somit konnte dies als mögliche Fehlerquelle eines falsch-positiven Ergebnisses hinsichtlich einer antibakteriellen Wirkung von CAP ausgeschlossen werden.

Graphisch ist in Abb. 20 zu erkennen, wie die Anzahl der KBE konstant abnahm. Nach 1 Minute CAP-Behandlung erfolgte eine Reduktion um 3 \log_{10} -Stufen, ab 3 Minuten Behandlungsdauer um 5 \log_{10} -Stufen.

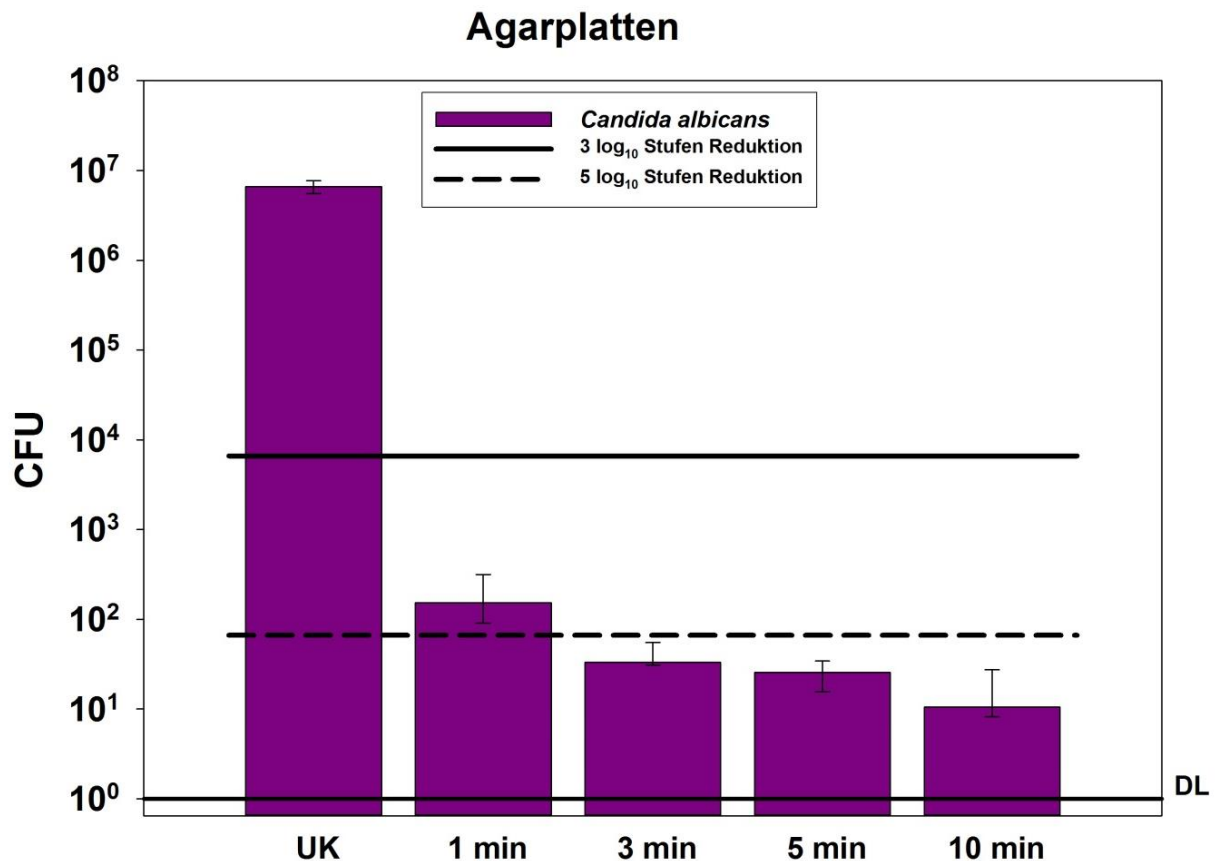


Abb. 20 CAP-Behandlung von *C. albicans*-Suspensionen auf Agarplatten. Nach 1 Minute erfolgte Reduktion von mehr als 3 \log_{10} -Stufen, ab 3 Minuten CAP-Behandlung fand eine Reduktion von 5 über \log_{10} -Stufen statt. UK: Unbehandelte Kontrolle, DL: Detektionslimit.

5.2.1.2 Biofilm-Versuche

Die Experimente mit *C. albicans* in Biofilmschälchen wurden ähnlich ausgeführt wie die Experimente mit *E. faecalis*. Ein Unterschied lag jedoch im Alter der Biofilme: aufgrund der erheblich höheren Schichtdicke als bei den *E. faecalis*-Biofilmen (vgl. Abb. 8) wurden bei *C. albicans* Biofilme im Alter von 6 und 12 Stunden gewählt. Bei den 6 Stunden alten Proben wurden Behandlungszeiten von 5 und 10 Minuten angewendet, im Trockenen zusätzlich von 15 Minuten. Die 12 Stunden alten Biofilme wurden jeweils für 1, 3, 5 oder 10 Minuten

behandelt. Außerdem wurde immer eine Kontrollreihe mit unbehandelten Proben (UK: Unbehandelte Kontrolle) angefertigt.

Die folgenden zwei Graphiken (Abb. 21 und 22) zeigen, dass CAP im beschriebenen Versuchsaufbau keinen desinfizierenden Effekt auf den Pilz hatte. Unabhängig von den Behandlungszeiten konnte mit CAP keine Reduktion um $\geq 3 \log_{10}$ -Stufen erzielt werden.

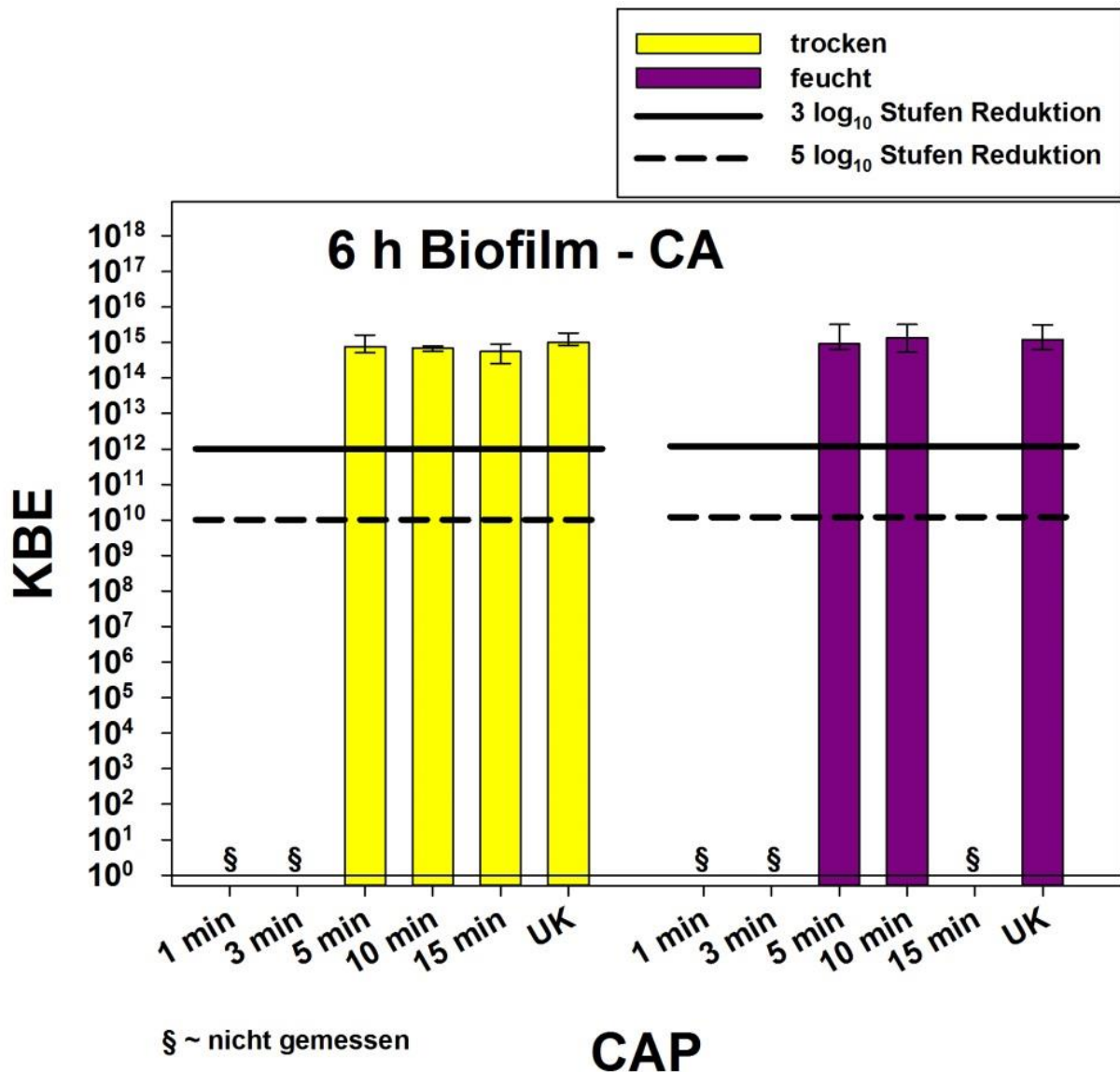


Abb. 21 CAP-Behandlung bei 6 Stunden altem Candida-Biofilm. Bei keiner behandelten Probe ist ein Rückgang der KBE zu erkennen. UK: Unbehandelte Kontrolle, dünne schwarze horizontale Linie: Detektionslimit.

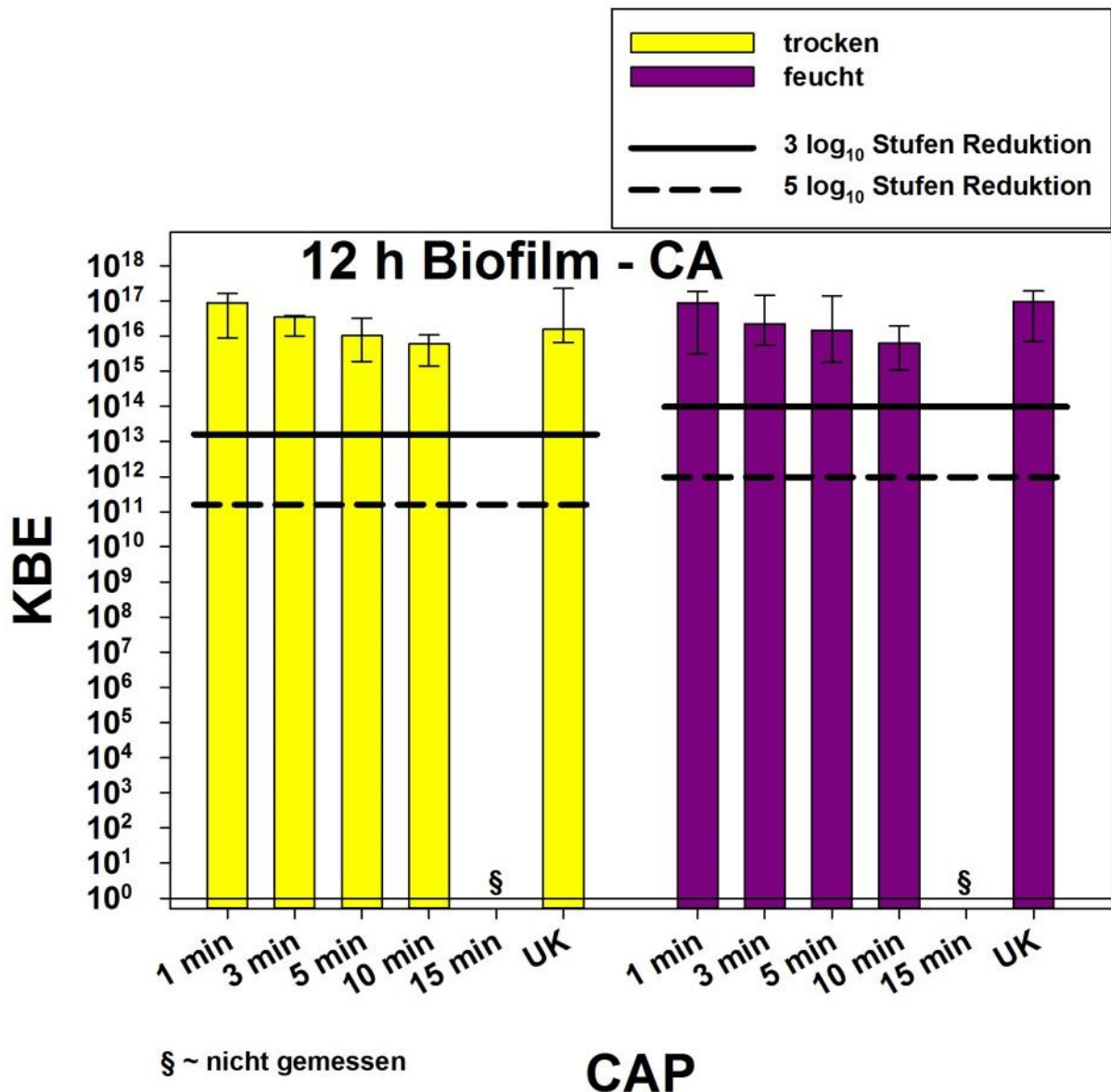


Abb. 22 CAP-Behandlung bei 12 Stunden altem *Candida*-Biofilm. Unabhängig von den Bedingungen „trockener“ oder „feuchter“ Biofilm erfolgte bei keiner Behandlungszeit eine Reduktion der KBE von mindestens 3 \log_{10} -Stufen. UK: Unbehandelte Kontrolle, dünne schwarze horizontale Linie: Detektionslimit.

Beim Vergleich der beiden beschriebenen Versuchsteile in diesem Kapitel fällt auf, dass die Inaktivierung von planktonischer *Candida*-Lösung sehr effektiv war, im Gegensatz zu einer CAP-Behandlung von *Candida*-Biofilm, die keine antimikrobielle Wirkung zeigte. Nun stellt sich die Frage, warum es hier solche Unterschiede gibt.

Maisch et al. zeigten 2012, dass CAP ein effektives Agens zur Inaktivierung von *C. albicans* sowohl in frei flottierender Form, als auch in einem Biofilmgefüge darstellt [52]. Dafür wurde im ersten Versuchsteil der *In-Vitro*-Studie die CAP-Wirkung auf den Pilz bei

Behandlungszeiten von 20 und 40 Sekunden und 1, 5 und 10 Minuten getestet. Für diese Experimente wurde, ähnlich wie in dieser Doktorarbeit, eine planktonische *Candida*-Lösung auf Sabouraud-Agarplatten aufgebracht und die Agarplatten nach Einziehen der Flüssigkeit mit den genannten Zeiten unter der Plasmaquelle behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Platten ausgezählt. Nach 40 Sekunden Behandlung mit CAP wurde eine Inaktivierungsrate von über 3 \log_{10} -Stufen erreicht, nach 2 Minuten betrug die \log_{10} -Stufen-Reduktion mehr als 5 \log_{10} -Stufen [52]. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit in etwa überein (siehe Abb. 20): auch hier konnte bei einer Behandlungsdauer von 1 Minute eine \log_{10} -Stufen-Reduktion von über 3 \log_{10} -Stufen erzielt werden, ab 3 Minuten betrug die Reduktion der KBE mehr als 5 \log_{10} -Stufen. Gegensätze ergeben sich nun im Vergleich zwischen den Ergebnissen des zweiten Versuchsteils der Studie der Forschungsgruppe um *Maisch* und jenen dieser Publikation. Im Rahmen der genannten Veröffentlichung wurden *Candida*-Biofilme in 6-Well-Platten (à jeweils ca. 9 cm² Wachstumsoberfläche pro Well) hergestellt und 24 Stunden lang inkubiert. Danach erfolgte eine CAP-Behandlung über 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 und 15 Minuten. Außerdem wurde in jedem Durchgang eine unbehandelte Kontrollprobe angefertigt. Nach Abkratzen des Biofilms und Überführung in PBS wurde die verdünnte *Candida*-Lösung auf Agarplatten ausplattiert und nach einer Inkubation von 24 Stunden die verbliebenen KBE ausgezählt. Nach 7 Minuten Behandlungszeit wurde eine Inaktivierungsrate der Pilzzellen von mehr als 3 \log_{10} -Stufen erreicht, nach 8 Minuten konnte eine \log_{10} -Stufen-Reduktion von 6 festgestellt werden [52]. Diese Ergebnisse belegen, parallel zur vorliegenden Promotionsarbeit, den Fakt, dass die CAP-Behandlung bei planktonischen *Candida*-Kulturen erheblich besser, bzw. in kürzerem Zeitraum mit höherer Effektivität, wirkt. Die erzielten Resultate bei den Experimenten mit *Candida*-Biofilm divergieren jedoch sehr stark. Im Gegensatz zu den Studienaussagen von *Maisch et al.* hatte die CAP-Behandlung im Rahmen der vorliegenden Arbeit keinerlei Auswirkungen auf den Biofilm, obwohl hier jüngere Biofilme von 6 bzw. 12 Stunden Anwendung fanden, die – ausgehend von der Feststellung in Kapitel 5.1.4 – leichter zu inaktivieren sein müssten als 24 Stunden alter Biofilm. Eine plausible Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse liegt in den unterschiedlichen Versuchsaufbauten der zwei Studien. Im Gegensatz zu dieser Promotionsarbeit wurden bei *Maisch et al.* keine einzelnen Biofilmschälchen verwendet, sondern 6-Well-Platten, die unter einer größeren Plasmaquelle

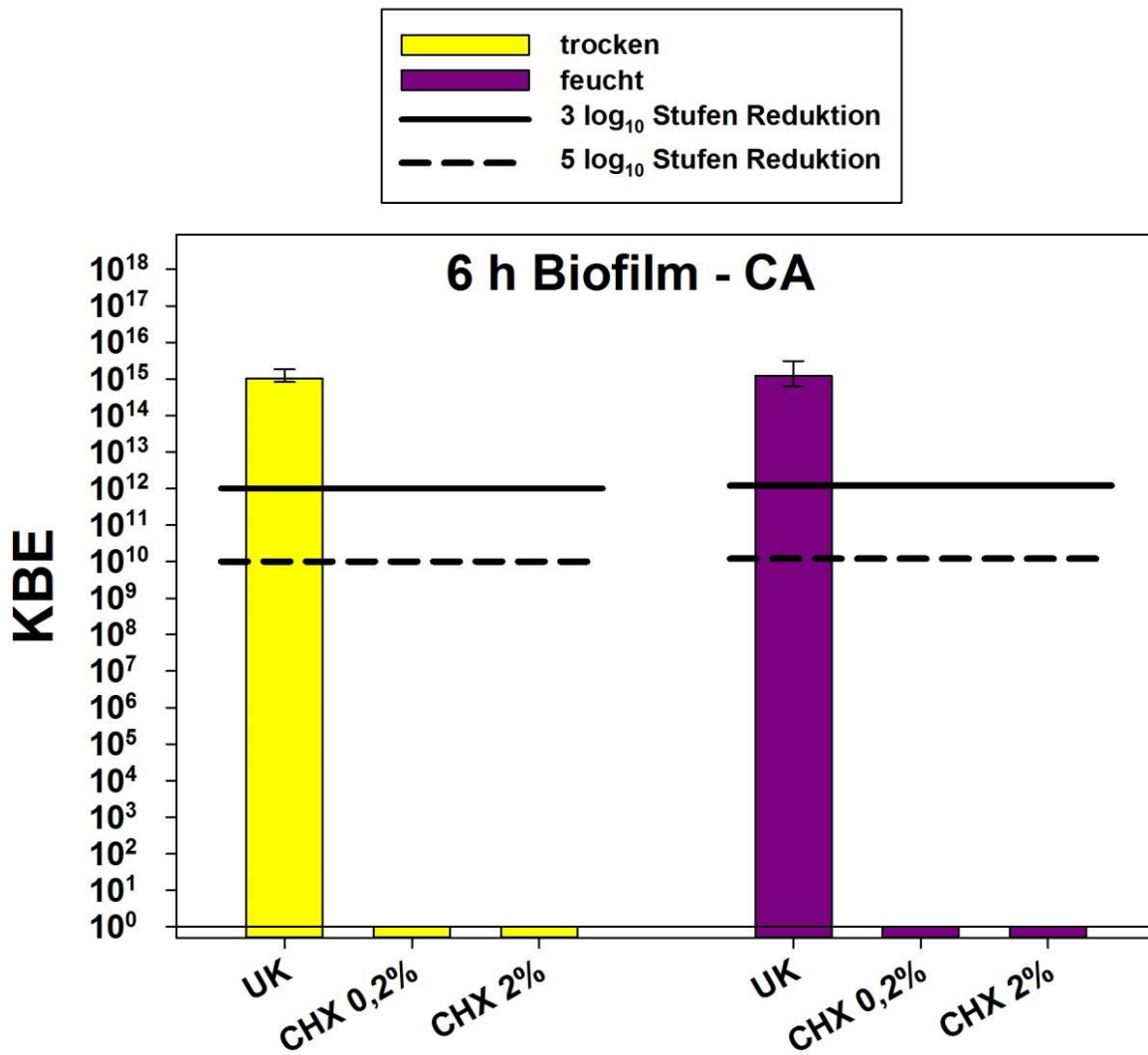
(117 cm² bei *Maisch et al.* versus 9,6 cm² im Rahmen dieser Doktorarbeit) behandelt wurden. Hierdurch entstand ein größeres Behandlungsareal mit einem gesteigerten Gasaustausch. Durch die größere Fläche vergrößerte sich auch das Luftvolumen zwischen der Plasmaquelle und den Biofilmen [52]. Somit konnten mehr reaktive Sauerstoffspezies (ROS/RNS) erzeugt werden und die Effektivität von CAP wurde im Vergleich zu den Experimenten dieser Dissertation intensiviert.

Somit konnte die Aussage bestätigt werden, dass die Inaktivierung planktonischen Biofilms sich deutlich effektiver gestaltet, der Versuchsaufbau der Biofilmexperimente sollte in weiterführenden Arbeiten jedoch noch einmal überprüft und eventuell modifiziert werden.

5.2.2 CHX-Versuche

Für die Inaktivierungsexperimente mit CHX wurden CHX-Konzentrationen von 0,2% und 2% verwendet. Das Alter der *Candida*-Biofilme entsprach 6 oder 12 Stunden. Wie in Kapitel 4.6.2 erläutert, wurden die Biofilme nach Waschen mit 1 ml PBS für 5 Minuten mit 1 ml CHX der jeweiligen Konzentration versetzt, bevor sie nach Abziehen des CHX nochmals mit 1 ml PBS gewaschen und ausplattiert wurden.

Die folgenden zwei Graphiken (Abb. 23 und 24) zeigen, dass CHX in beiden Konzentrationen sehr effektiv gegen *C. albicans* wirkt: sowohl beim feuchten als auch beim trockenen Biofilm ist nach fünfminütiger Einwirkung von 0,2%igem oder 2%igem CHX eine Reduktion der KBE um mehr als 5 log₁₀-Stufen zu erkennen.



5 min Behandlungsdauer

Abb. 23 CHX-Behandlung von 6 Stunden altem *Candida*-Biofilm. Unabhängig von der Bedingung „trockener“ oder „feuchter“ Biofilm lag die Anzahl der KBE nach 5minütiger Behandlung mit 0,2%igen oder 2%igem CHX unterhalb des Detektionslimits. UK: Unbehandelte Kontrolle, dünne schwarze horizontale Linie: Detektionslimit.

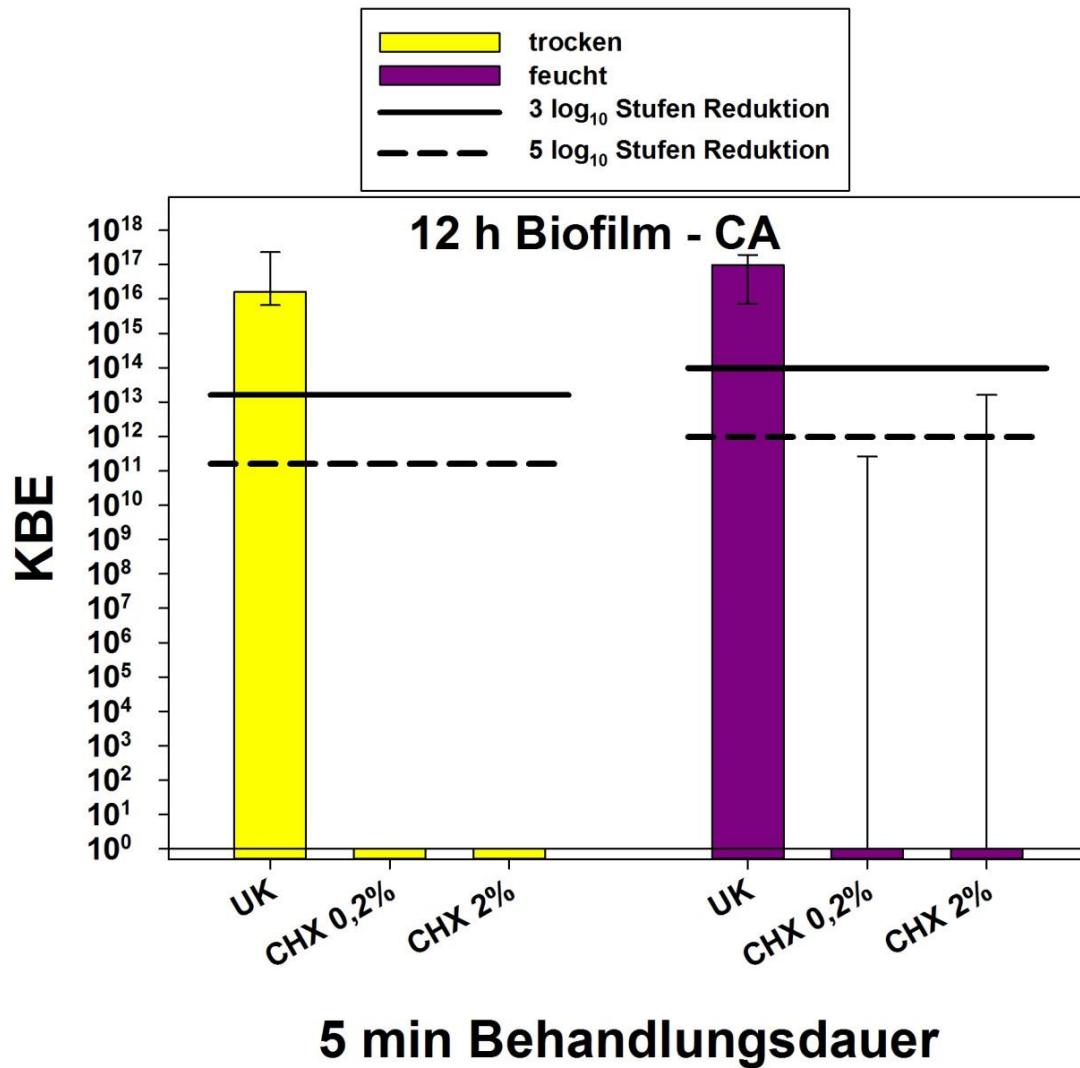


Abb. 24 CHX-Behandlung von 12 Stunden altem *Candida*-Biofilm. Unabhängig von der Bedingung „trockener“ oder „feuchter“ Biofilm lag die Anzahl der KBE nach 5minütiger Behandlung mit 0,2%igen oder 2%igem CHX unterhalb des Detektionslimits. UK: Unbehandelte Kontrolle, dünne schwarze horizontale Linie: Detektionslimit.

Chlorhexidin ist nicht nur effektiv in der Inaktivierung von Bakterien (vgl. Kapitel 5.1.2), sondern kommt auch bei der Behandlung von Pilzinfektionen, wie der Candidiasis, zum Einsatz. Die fungizide Wirkung CHX-haltiger Mundspüllösungen wurde in der Vergangenheit vielfach von unterschiedlichen Forschungsgruppen untersucht.

Shrestha et al. beurteilten in einer *In-vitro*-Studien aus dem Jahr 2011 die antimykotische Wirksamkeit von CHX- und Thymol-haltigen Lösungen [89]. Fünf Patienten, die Anzeichen einer Candidiasis zeigten, wurde mit sterilen Baumwolltupfern von den betreffenden Läsionen Proben entnommen. Neben *Candida tropicalis* wurden daraus überwiegend *Candida albicans*-Stämme isoliert. Die Proben wurden jeweils 0, 30, 60 und 120 Minuten mit

0,2%igem CHX und Thymol behandelt. Aus den erzielten Resultaten schlussfolgerten die Wissenschaftler eine bessere Wirkung des 0,2%igen CHX gegenüber Thymol, da bei ersterem eine Inaktivierung nach 30 Minuten stattfand, bei letzterem jedoch erst nach 90 Minuten [89]. Ein umfassender Vergleich zur vorliegenden Promotionsarbeit lässt sich nur schwer ziehen, da die Versuchsbedingungen voneinander abweichen. Im Rahmen dieser Dissertation konnte eine vollständige Wachstumshemmung von *C. albicans* schon nach 5 Minuten Einwirkzeit von 0,2%igem CHX festgestellt werden. Bei der beschriebenen Studie kann man annehmen, dass dieser Zustand nach einer nicht näher definierten Behandlungsdauer zwischen 0 und 30 Minuten lag.

Eine ähnliche *In-vitro*-Studie, die die Wirksamkeit 0,2%igen Chlorhexidins mit diversen anderen Mundspüllösungen gegenüber Hefepilzen - unter anderem *C. albicans* - vergleicht, stammt von der Forschungsgruppe um *Giuliana* aus dem Jahr 1997 [90]. Für die zwei getesteten CHX-Lösungen waren bei einer Konzentration von jeweils 0,2% für die vollständige *Candida*-Inaktivierung Einwirkzeiten von 30 bzw. 60 Sekunden ausreichend [90]. Auch in dieser Studie von *Giuliana et al.* differiert die Behandlungsdauer von der fünfminütigen CHX-Applikation im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit. Somit scheint der Zeitpunkt der kompletten Inaktivierung in einem Zeitraum zwischen 30 Sekunden und 5 Minuten zu liegen. Diese Annahme sollte in weiteren Studien näher untersucht und gegebenenfalls bestätigt werden.

Estrela et al. prüften - im Gegensatz zu den zwei bereits genannten Publikationen - in einer *In-vitro*-Studie aus dem Jahr 2003 2%iges CHX sowie 2%iges NaOCl auf antibakterielle und fungizide Eigenschaften [91]. In einem Teil der Forschungsarbeit wurden sterile Papierspitzen in Bakterien- bzw. Pilzlösung getränkt, anschließend in Petrischalen überführt und mit einem der beiden Agenzien bzw. mit sterilem Wasser als Kontrolllösung versetzt. Nach 5, 10 oder 30 Minuten Einwirkzeit wurden die Papierspitzen in eine neutralisierende Lösung gegeben, um die stattfindenden Reaktionen zu stoppen. Daraufhin wurden die Proben bei 37°C für 48 Stunden inkubiert und das mikrobielle Wachstum anhand der Trübung der Flüssigkeit makro- und mikroskopisch festgestellt. Die Ergebnisse, die die Wirkung von CHX auf *C. albicans* beschreiben, zeigen eine vollständige Inaktivierung des Pilzes ab der kürzesten getesteten Einwirkdauer von 5 Minuten [91]. Diese Resultate decken sich mit jenen der vorliegenden Promotionsarbeit (vgl. Abb. 23 und 24).

5.2.3 UVC-Versuche

Auch die *Candida*-Biofilme wurden mit UVC bestrahlt. Es wurden Biofilme im Alter von 6, 12 und 24 Stunden verwendet. Die Bestrahlungsdosen entsprachen 0,005 J/cm² und 0,26 J/cm², der 24 Stunden alte Biofilm wurde außerdem noch einer Strahlungsintensität von 0,195 J/cm² ausgesetzt. In jedem Versuchsdurchgang wurden wieder unbehandelte Kontrollproben angefertigt.

In den drei folgenden Graphiken (Abb. 25-27) ist zu erkennen, dass UVC gegen *C. albicans* nicht an die hohe desinfizierende Wirkung gegen *E. faecalis* heranreicht. Dennoch ist bei einigen Energiedosen eine Reduktion der KBE um 3 log₁₀-Stufen oder um 5 log₁₀-Stufen zu konstatieren.

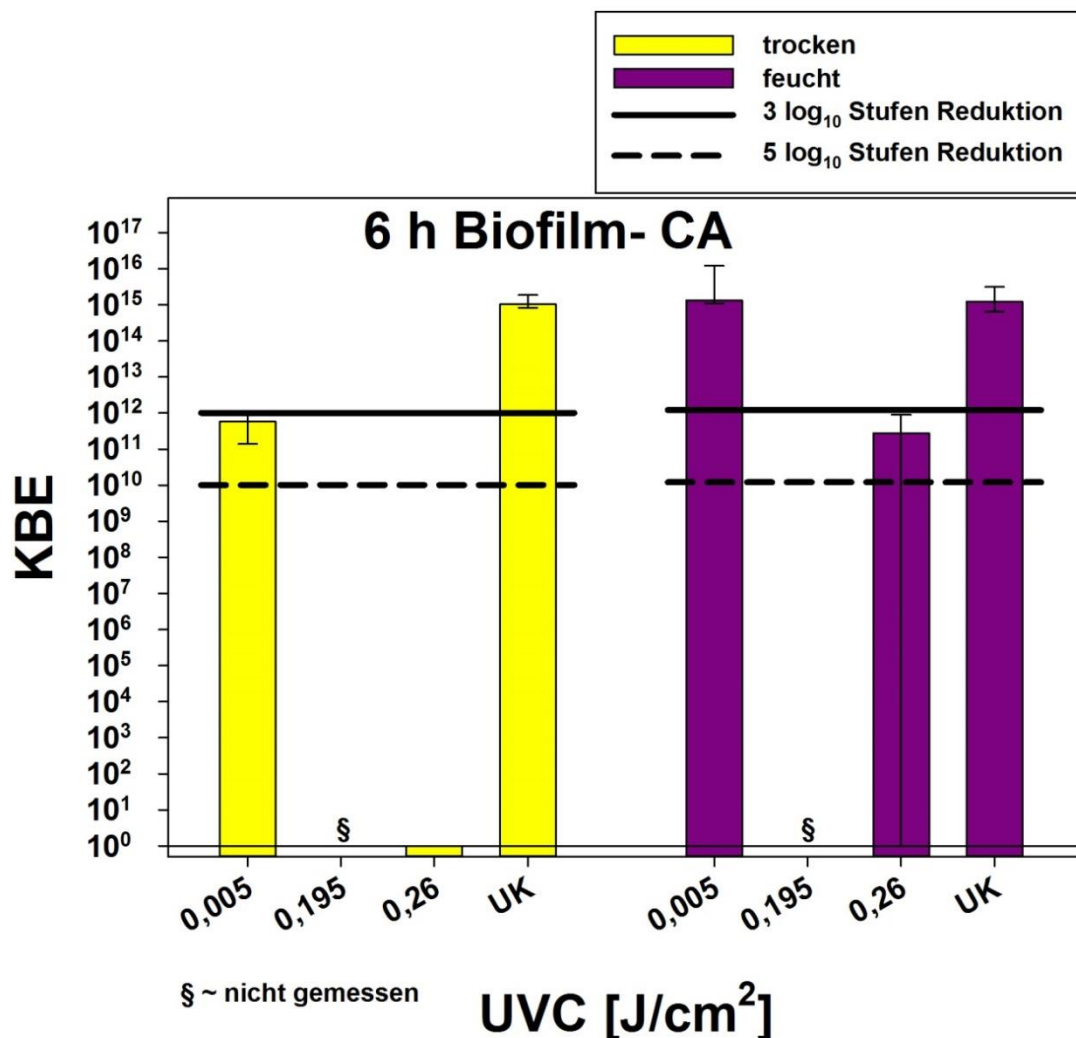


Abb. 25 UVC-Behandlung bei 6 Stunden altem *Candida*-Biofilm. Im Trockenen wurde bei einer Dosis von 0,005 J/cm² eine Reduktion von über 3 log₁₀-Stufen erreicht, bei 0,26 J/cm² lag die Anzahl der KBE unter dem Detektionslimit. Im Feuchten fand bei einer Dosis von 0,26 J/cm² eine Keimreduktion von mehr als 3 log₁₀-Stufen statt. UK: Unbehandelte Kontrolle, dünne schwarze horizontale Linie: Detektionslimit.

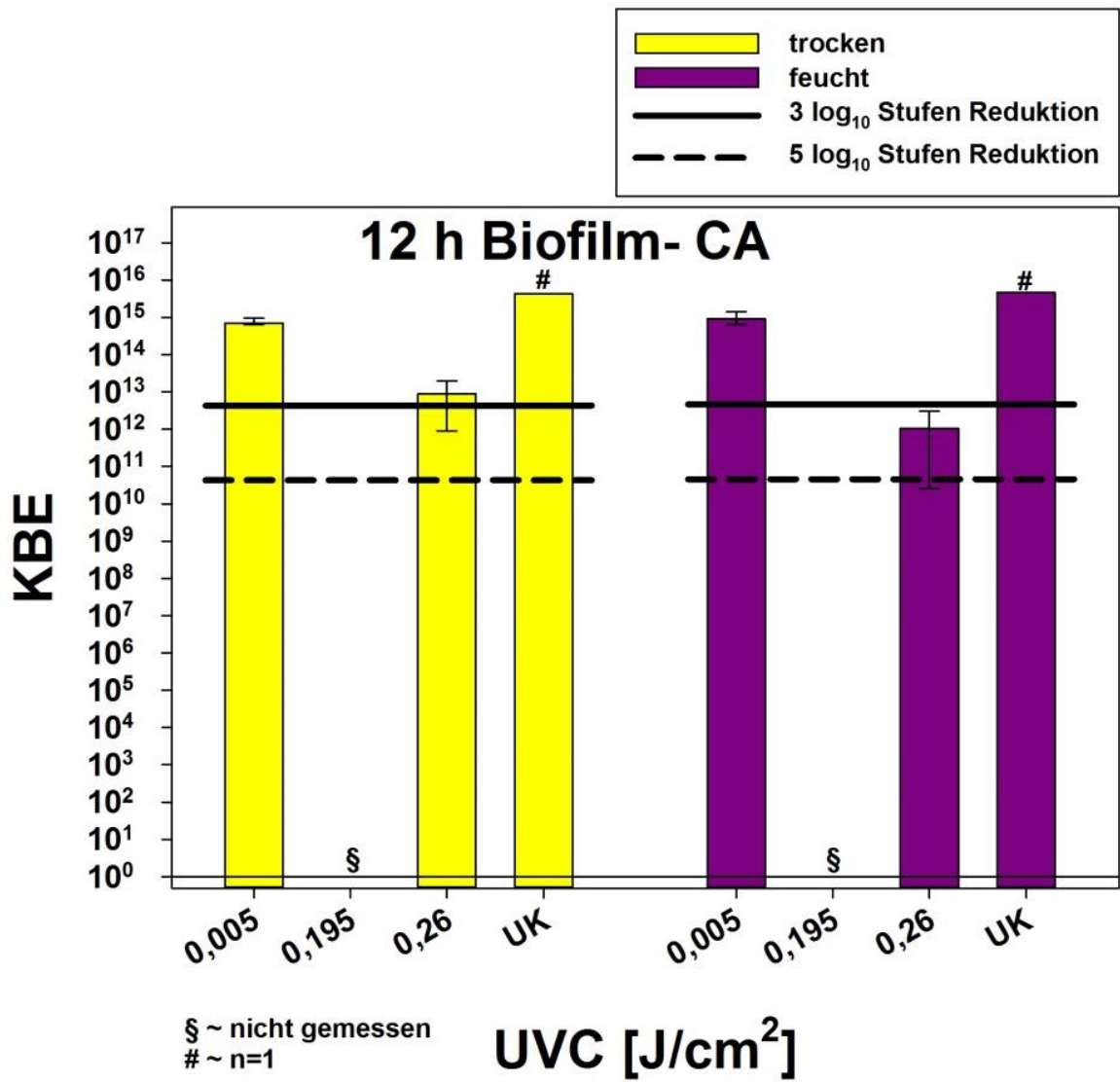


Abb. 26 UVC-Behandlung bei 12 Stunden altem *Candida*-Biofilm. Im Trocken wurde bei keiner Energiedosis eine antimikrobielle Wirkung erzielt, im Feuchten reduzierte sich die KBE bei einer Dosis von 0,26 J/cm² um mehr als 3 log₁₀-Stufen. UK: Unbehandelte Kontrolle, dünne schwarze horizontale Linie: Detektionslimit.

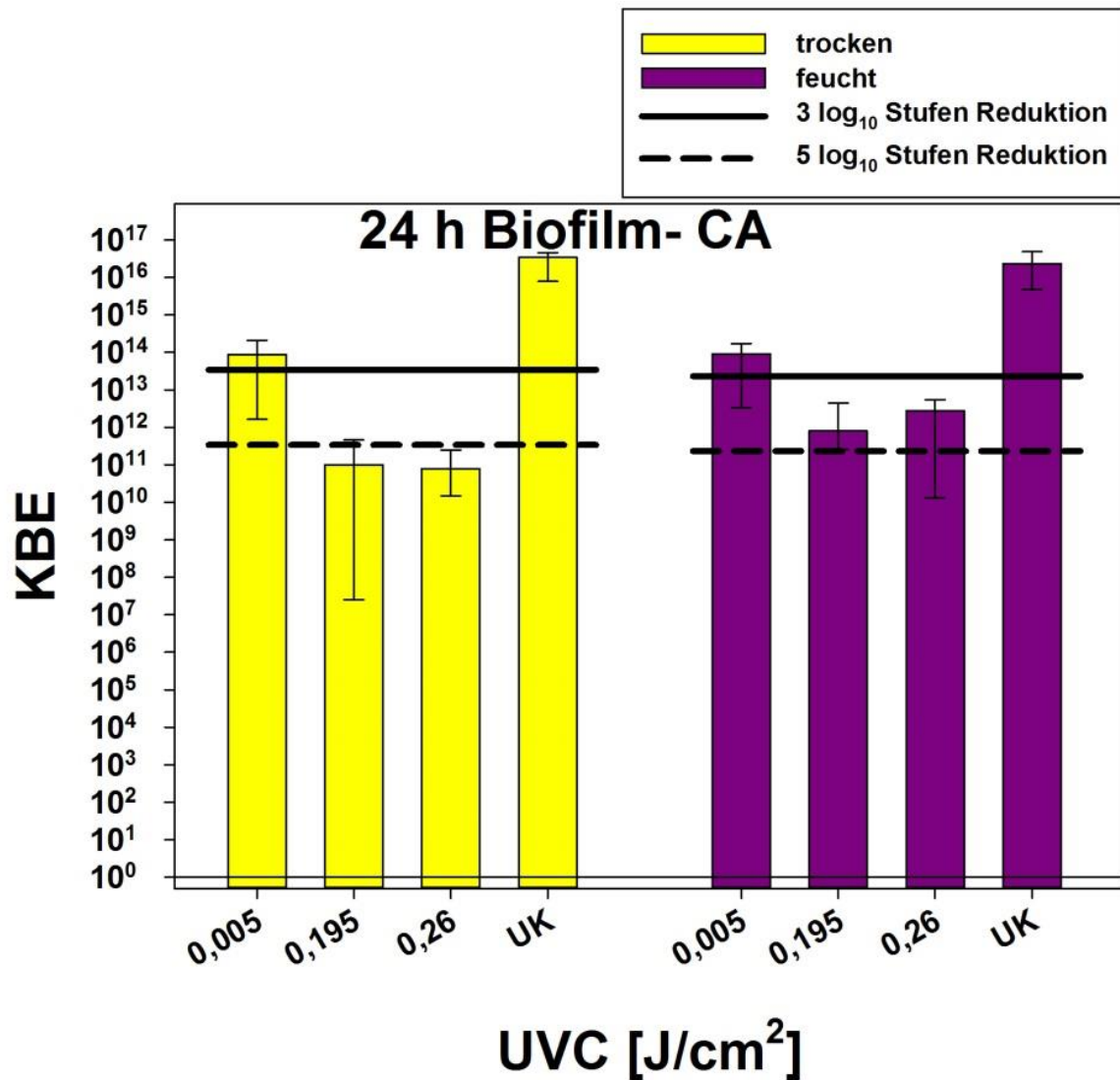


Abb. 27 UVC-Behandlung bei 24 Stunden altem *Candida*-Biofilm. Bei den trockenen Proben bewirkte eine Bestrahlung mit 0,195 und 0,26 J/cm² eine Reduktion der KBE um mindestens 5 log₁₀-Stufen, bei den feuchten Biofilmen reduzierte sich die KBE ab einer Dosis von 0,195 J/cm² um mehr als 3 log₁₀-Stufen. UK: Unbehandelte Kontrolle, dünne schwarze horizontale Linie: Detektionslimit.

Im Jahr 2011 veröffentlichten *Dai et al.* eine Studie über die Wirksamkeit von UVC-Behandlung bei Mäusen mit *Candida*-besiedelten Brandwunden [92]. Für diesen Tierversuch wurde den anästhesierten Mäusen der Rücken rasiert und ihnen in diesem Bereich anschließend mithilfe eines vorgeheizten Messingblocks nicht letale Verbrennungen dritten Grades zugefügt. Nach Abkühlen der Wunden wurden diese mit 40 µl einer biolumineszenten *Candida*-Lösung beimpft. Durch die Lumineszenz der infizierten Wunden konnte die Pilzbesiedlung mit Hilfe einer speziellen Kamera festgestellt werden. Die UVC-Behandlungen wurden 30 Minuten und 24 Stunden nach der Infektion durchgeführt, um die

Wirkweise auf eine frische und eine etablierte *Candida*-Besiedlung zu untersuchen. Die erste UVC-Bestrahlung (254 nm) fand mit einer Dosis von 2,92 J/cm² statt und führte zu einer Reduktion der Lumineszenz des Pilzes von durchschnittlich 2,16 log₁₀-Stufen. 24 Stunden nach Wundinfektion betrug die Reduktion im Durchschnitt 1,94 log₁₀-Stufen bei einer UVC-Dosis von 6,48 J/cm². In der Kontrollgruppe wurden die infizierten Brandwunden topisch mit einer fungiziden Creme behandelt. Die Forschungsgruppe stellte fest, dass die Reduktion von *C. albicans* nach UVC-Bestrahlung höher war, als nach der Applikation mit dem Standard-Antimykotikum Nystatin [92].

Die beschriebene Studie fand zwar unter anderen Bedingungen statt, als die Experimente dieser Doktorarbeit, dennoch können Parallelen gezogen werden. Ähnlich wie bei den Daten von *Dai et al.* konnte in den UVC-Versuchen der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, dass die Effektivität der UVC-Behandlung mit steigendem Biofilm-Alter zurückging: die vollständige Keimreduktion des trockenen Biofilms bei einer Dosis von 0,26 J/cm² konnte bei keiner Versuchsbedingung des 12 und 24 alten Biofilms erreicht werden. Dass die log₁₀-Stufen-Reduktion bei höheren UVC-Dosen geringer ausfiel als in dieser Dissertation ist mit dem Umstand zu erklären, dass *in vivo* generell erheblich höhere Dosen angewendet werden müssen, als dies in *In-vitro*-Studien der Fall ist.

UVC-Behandlungen stellen somit eine effektive Alternative zur oberflächlichen Behandlung infizierter Wunden dar. *Sullivan et al.* belegten allerdings in einer Studie aus dem Jahr 2000, dass UVC eine bessere desinfizierende Wirkung gegen Bakterien zeigte als gegen Pilze [93]. Dies wird auch durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt.

5.3 Überprüfung der mikrobiologischen Vorgänge nach CAP-Behandlung mittels Nanodrop-Versuch

Im dritten Teil der vorliegenden Promotionsarbeit sollte untersucht werden, ob die eingesetzten Inaktivierungsverfahren, im Besonderen die Behandlung mit CAP, zu einer messbaren DNA-Freisetzung führen. Dies ließe zum Beispiel auf eine Zerstörung der Bakterienzellwand schließen. Hierfür wurden die behandelten Proben mit dem Nanodrop-Gerät vermessen. Im folgenden Kapitel sollen nun die Ergebnisse dieses letzten großen Versuchsteils zusammengeführt und diskutiert werden.

5.3.1 Standard-DNA-Reihe

Um die gewonnenen Ergebnisse interpretieren zu können, wurde im ersten Schritt dieses Versuchsteils eine Standard-DNA-Reihe angefertigt. Hierfür wurde, wie in Kapitel 4.7 genauer beschrieben, eine Verdünnungsreihe von gereinigter Herings-DNA erstellt und die Konzentrationen von 1 mg/ml, 100 µg/ml, 10 µg/ml und 1 µg/ml im Nanodrop-Gerät vermessen.

In der folgenden Graphik (Abb. 28) sind neben der Standard-DNA-Reihe die Ergebnisse der Positivkontrollen aufgetragen. Für diese Positivkontrollen wurde der reife Biofilm vor der Nanodrop-Vermessung mit Lysozym und Proteinase K behandelt, da hier die Wirkweise bekannt ist und man von einer DNA-Freisetzung durch diese Enzyme weiß. Für die Positivkontrolle 1 wurden insgesamt 200 µl des Enzymgemisches zugegeben, für die Positivkontrolle 2 mit 400 µl die doppelte Menge (vgl. Kapitel 4.7).

In der Graphik ist zu erkennen, dass die OD-Werte der Standard-DNA-Reihe mit abnehmender DNA-Konzentration proportional abnahmen (Abb. 28). Die Werte der zwei Positivkontrollen lagen zwischen OD=0,5 und 0,6, was einer DNA-Konzentration von etwas mehr als 100 µg/ml entspricht. Die unbehandelte Kontrolle, der keine Enzyme hinzugefügt wurden, zeigte keine DNA-Freisetzung.

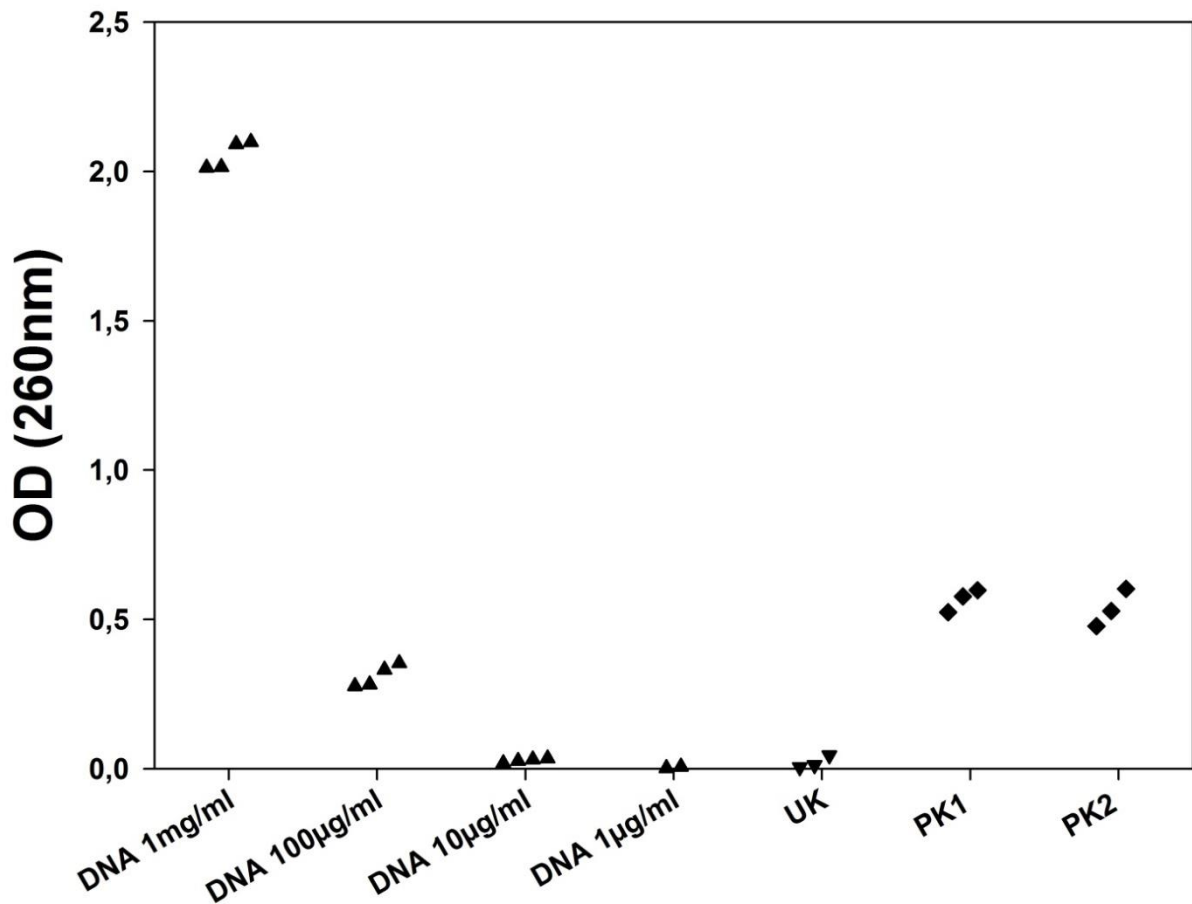


Abb. 28 Nanodrop-Vermessung einer DNA-Standard-Reihe, zweier Positivkontrollen und einer unbehandelten Kontrolle. Die OD-Werte der Standard-DNA-Reihe nahmen proportional zur Konzentrationsminderung ab. Die Werte beider Positivkontrollen entsprachen mit einer OD zwischen 0,5 und 0,6 einem DNA-Gehalt von ca. 100 µg/ml. Bei der unbehandelten Kontrolle ist keine DNA-Freisetzung erkennbar. OD: Optische Dichte, UK: Unbehandelte Kontrolle, PK: Positivkontrolle.

5.3.2 Nanodrop bei CAP-behandelten Proben von *E. faecalis*

Wie in Kapitel 4.7 beschrieben, wurden die *E. faecalis*-Biofilme vor der Vermessung im Nanodrop-Gerät unterschiedlichen Behandlungen unterzogen: in der ersten Gruppe wurde den Proben nach 5- oder 10-minütiger CAP-Behandlung 1 ml PBS zugegeben und die Schälchen 5 Minuten stehengelassen. Danach wurden vorsichtig – ohne den am Schälchenboden haftenden Biofilm zu beschädigen – 200 µl Flüssigkeit entnommen, zentrifugiert und im Nanodrop-Gerät vermessen. Der einzige Unterschied bei der zweiten Gruppe bestand in einer Wartezeit von 20 statt 5 Minuten nach CAP-Behandlung. Bei der dritten Gruppe wurde identisch zu den ersten beiden verfahren, mit dem Unterschied, dass der Biofilm nach PBS-Zugabe abgekratzt und danach mittels Pipette resuspendiert wurde. In

jeder Versuchsgruppe wurde außerdem jeweils eine unbehandelte Kontrolle im Nanodrop-Gerät untersucht.

In der Graphik ist zu erkennen, dass die OD-Werte der behandelten Proben zwischen 0 und 0,1 lagen. Somit kann man davon ausgehen, dass der Mechanismus der Schädigung nicht mit einer Freisetzung der DNA einherging (Abb. 29).

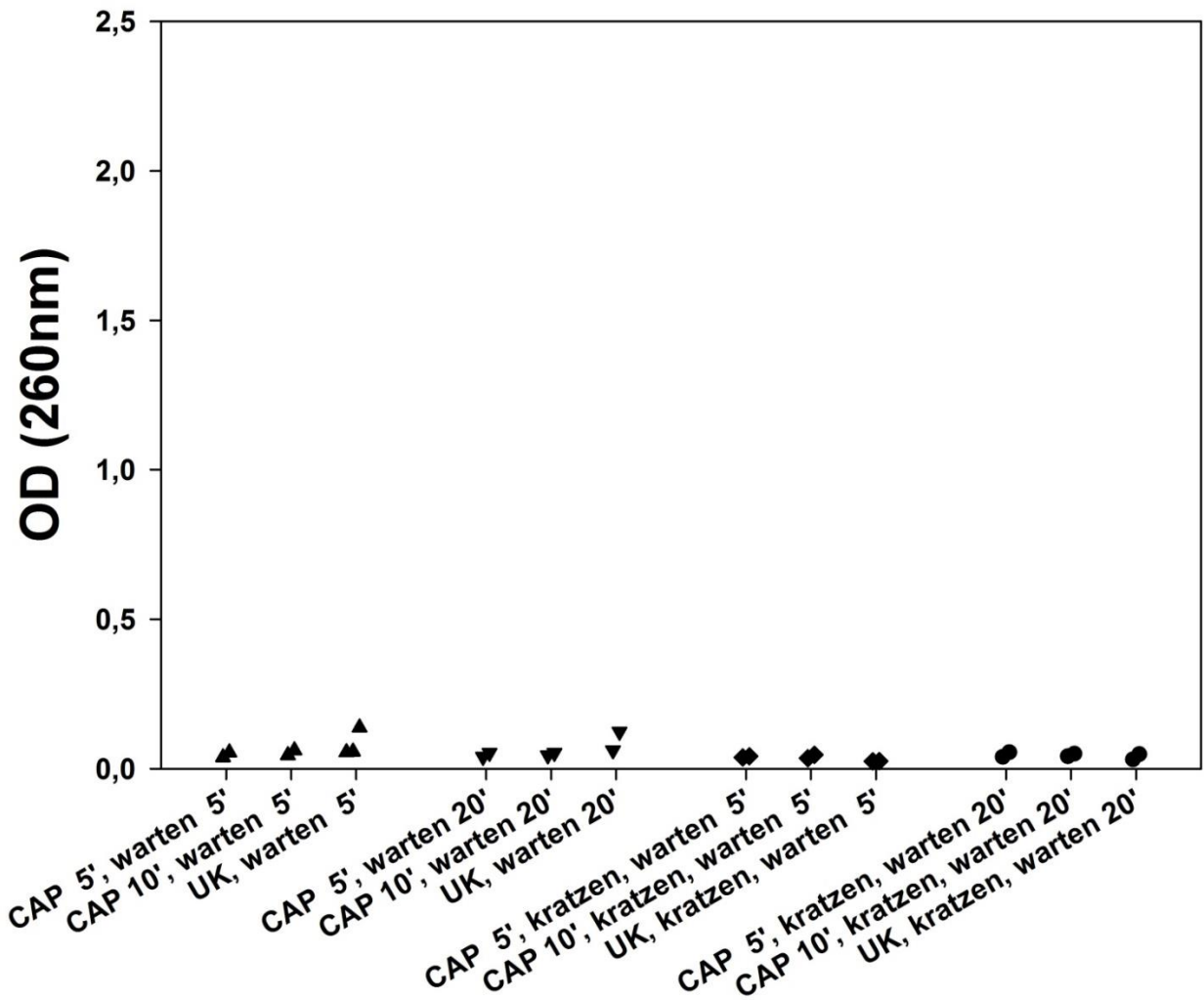


Abb. 29 Nanodrop-Messungen an CAP behandelten *E. faecalis*-Biofilmen. Die OD aller gemessenen Proben lag bei Werten zwischen 0 und 0,1. OD: Optische Dichte, UK: Unbehandelte Kontrolle.

5.3.3 Einfluss von CHX

In den CHX-behandelten Proben entstanden in der Nanodrop-Software sehr untypische Peaks, die den Verdacht nahe legten, dass CHX selbst ein Absorptionsmaximum bei den kritischen Wellenlängen (260 nm und 280 nm) hat und somit nicht für die DNA-Detektion gemäß des gewählten Versuchsaufbau verwendet werden kann. Aus diesem Grund wurde CHX in seinen zwei Konzentrationen pur vermessen. Die zwei nachfolgenden Abbildungen (Abb. 30 und 31) zeigen das Spektrum der optischen Dichte bei 0,2%igem und 2%igem CHX und belegen die Vermutung, dass die dominanten Absorptionsmaxima von CHX und auch der zusätzliche Absorptionspeak bei 300nm (Abb. 31) einer 2%igen CHX-Lösung jede Messung zusammen mit einem anderen Stoff verfälschten. Weitere Messungen zeigten auch dieses Problem (Abb. 32).

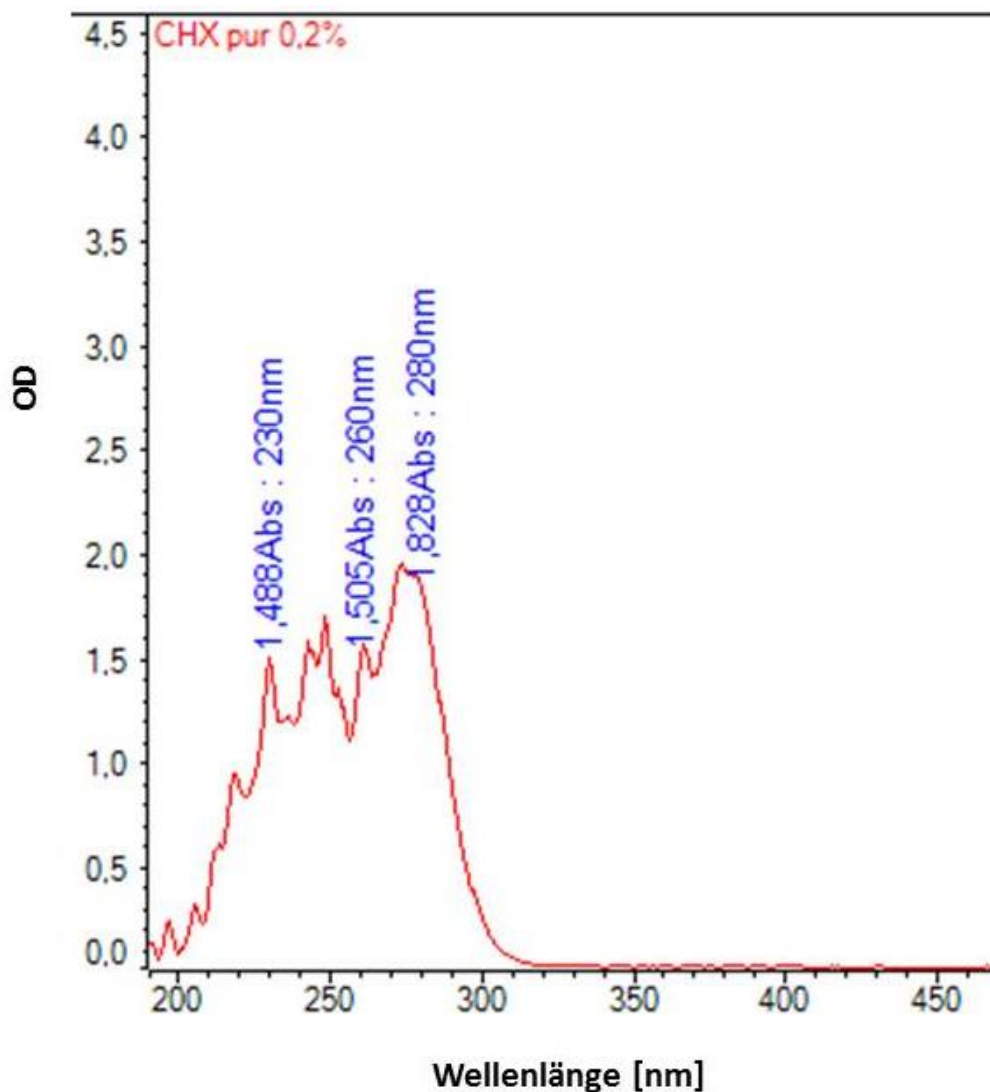


Abb. 30 Nanodrop-Vermessung einer 0,2%igen CHX-Lösung. OD: Optische Dichte.

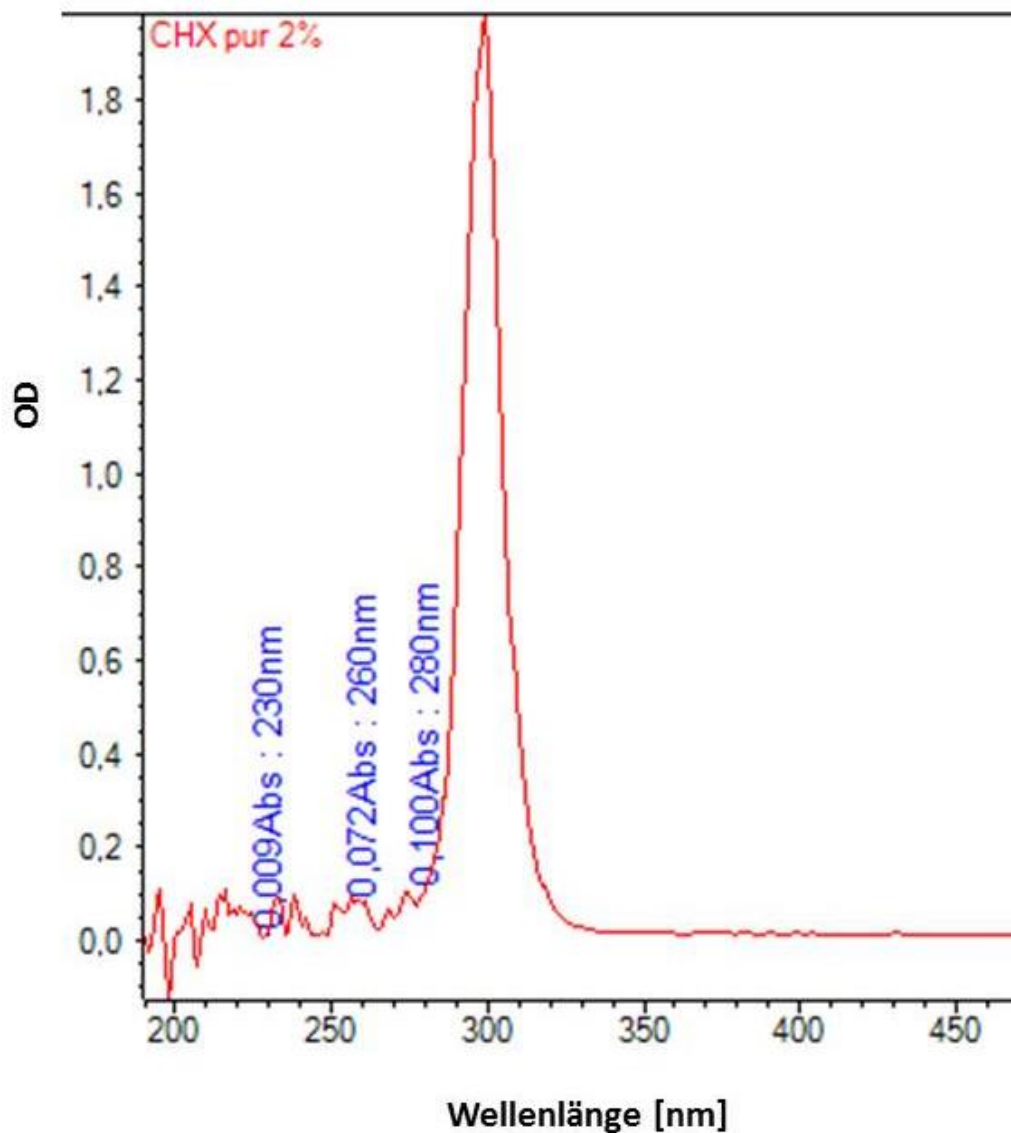


Abb. 31 Nanodrop-Vermessung einer 2%igen CHX-Lösung. OD: Optische Dichte.

Daher wurden in einem weiteren Versuch zur Überprüfung des Einflusses von CHX der schon beschriebenen Standard-DNA-Reihe in ihren verschiedenen Konzentration 0,2%iges und 2%iges CHX zugesetzt. In der folgenden Graphik (Abb. 32) ist zu erkennen, dass CHX die Messwerte im Nanodrop-Gerät scheinbar stark beeinflusst. Die von der Standard-DNA-Reihe (vgl. Abb. 28) stark abweichenden Werte ließen CHX als Agens für Positivkontrollen im Rahmen dieses Versuchsaufbaus ausschließen.

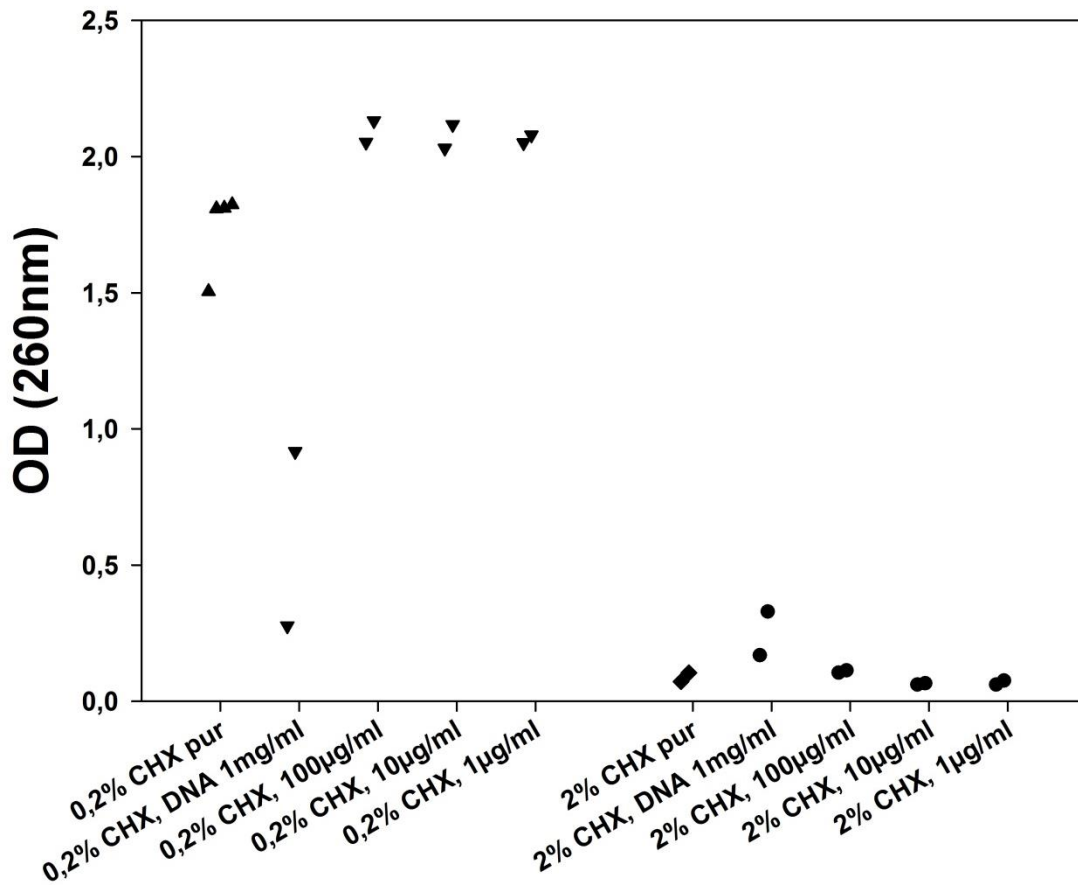


Abb. 32 Nanodrop-Ergebnisse von CHX plus Standard-DNA-Reihe. OD: Optische Dichte.

5.3.4 Diskussion der Ergebnisse

Da der genaue Wirkmechanismus kalten Plasmas auf molekularer Ebene noch nicht hinreichend erforscht wurde, wurden die CAP-behandelten *E. faecalis*-Proben im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf DNA-Freisetzung überprüft. Bei positiven Ergebnissen wäre zum Beispiel eine Zerstörung der Bakterienzellwand denkbar. Wie jedoch in Abb. 29 erkennbar, bewegte sich die OD aller Proben zwischen den Werten 0 und 0,1, das heißt, keine DNA wurde freigesetzt. Ein Ziel weiterführender Arbeiten sollte demnach sein, den Wirkmechanismus von CAP auf Bakterien- bzw. Pilzzellen molekularbiologisch näher zu erforschen. Die Möglichkeit einer Zellwandzerstörung von Bakterien durch CAP kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gegenwärtig ausgeschlossen werden.

6 Zusammenfassung

Die Bildung von Resistenzen gegenüber konventionellen Medikamenten zur Behandlung bakterieller und mykotischer Infektionen hat in den letzten Jahren in bedenklichem Maße zugenommen. Um einerseits der Entwicklung multiresistenter Keime vorzubeugen und andererseits eine Vielfalt an Therapiemöglichkeiten ausschöpfen zu können, wird der Erforschung alternativer Methoden zur Inaktivierung von Mikroorganismen ein hoher Stellenwert beigemessen.

Heiße Plasmen werden seit Langem in der Medizin verwendet, zum Beispiel zum Kauterisieren von Geweben oder für die Sterilisation hitzestabiler Materialien. Mit der Entwicklung kalter Plasmen (CAP), die bei Atmosphärendruck hergestellt werden können und eine Temperatur von 40°C nicht überschreiten, bieten sich verschiedene neue Anwendungsmöglichkeiten in der Medizin. Diverse Forschungsgruppen konnten vielversprechende Ergebnisse aus *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien veröffentlichen, die eine effektive Inaktivierung von Bakterien und Pilzen mittels CAP zeigten. In der vorliegenden Doktorarbeit sollte die Wirksamkeit von CAP gegenüber den beiden in der Zahnmedizin häufig vorkommenden Keimen *E. faecalis* und *C. albicans* näher untersucht werden. Die Ergebnisse wurden jeweils mit den bekannten und bewährten Inaktivierungsverfahren durch CHX und UVC verglichen.

Der erste Teil dieser Dissertation befasst sich mit dem Bakterium *Enterococcus faecalis*. Besonders im Bereich der Endodontologie führt dieser Keim häufig zu Komplikationen: durch seine fakultativ anaeroben Eigenschaften ist es ihm möglich, im wurzelkanalbehandelten Zahn zu überleben und neue Infektionen auszulösen. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden *E. faecalis*-Biofilme unterschiedlichen Alters (24, 48, 72 Stunden) hergestellt und mit den drei Methoden zur Desinfektion CAP, CHX und UVC unter verschiedenen Versuchsbedingungen behandelt. Als sehr effektiv erwiesen sich die UVC-Bestrahlung und die CHX-Behandlung. Doch auch CAP zeigte eine eindeutige Keimreduzierung. Ab einer CAP-Behandlung von 10-minütiger Dauer konnte immer eine Inaktivierungsrate von mehr als 99,999% (entspricht einer 5- \log_{10} -Stufen-Reduktion) erzielt werden.

Gegenstand des zweiten Studienabschnittes stellt der Hefepilz *Candida albicans* dar, mit dem der Zahnarzt vor allem unter dem Krankheitsbild der Candidiasis regelmäßig

konfrontiert wird. Da die ersten Versuche mit 24 Stunden altem *Candida*-Biofilm mit keinem der verwendeten Agenzien einen keimreduzierenden Effekt zeigten, wurden die darauffolgenden Experimente mit 6- und 12-stündigem *Candida*-Biofilm durchgeführt. Da der *Candida*-Biofilm sehr viel schneller gewachsen war als der *E. faecalis*-Biofilm, wurde angenommen, dass es den Antiseptika nicht möglich war, die hohe Schichtdicke der 24 Stunden alten *Candida*-Biofilme zu durchdringen. Die besten Ergebnisse konnten mit dem Versetzen des Biofilms mit CHX erreicht werden, gefolgt von der Bestrahlung mit UVC. Die Behandlung der *Candida*-Biofilme mit CAP hatte keine Inaktivierung des Pilzes zur Folge. Die Versuche mit planktonischen *Candida*-Lösungen zeigten jedoch im Rahmen der Agarplattenversuche eine hohe Effektivität von CAP: nach einminütiger CAP-Behandlung konnte eine Pilzreduktion von mehr als 3 \log_{10} -Stufen beobachtet werden, ab 3 Minuten CAP-Behandlung fand eine Reduktion von 5 über \log_{10} -Stufen statt.

Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Inaktivierung des *E. faecalis*-Biofilms mittels CAP durch eine Beschädigung der Zellwand stattfand. Hierfür wurden die Plasma-behandelten Proben unter einem Nanodrop-Gerät vermessen und die mögliche Freisetzung von DNA erforscht. Es konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu einer zuvor erstellten Standard-DNA-Reihe kein freier DNA-Gehalt in den Proben feststellbar war, d.h. durch die CAP-Behandlung kommt es nicht zu einer DNA-Freisetzung. Somit kann unter den untersuchten Bedingungen eine membranschädigende Wirkung von CAP gegenwärtig ausgeschlossen werden. Als Positivkontrolle wurde der *E. faecalis*-Biofilm außerdem mit den Enzymen Proteinase K und Lysozym versetzt, die bewiesenermaßen zu einer DNA-Freisetzung aus den Bakterienzellen führen. Tatsächlich wurde in den betreffenden Proben ein DNA-Gehalt von ca. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ermittelt. Somit konnte eine Beschädigung der Zellwand nach CAP-Behandlung nicht nachgewiesen werden.

Als Fazit dieser Dissertation lässt sich das große Potenzial von CAP als alternative Therapiemöglichkeit im klinischen Alltag festhalten. In Form von Biofilmmodellen konnte gezeigt werden, dass CAP eine hohe toxische Effektivität gegenüber dem Bakterium *E. faecalis* besitzt. In dem hier gewählten Versuchsaufbau mit *C. albicans*-Biofilmen zeigte CAP keine Wirkung. In weiterführenden Studien zur antimykotischen Wirkung von CAP sollte die Versuchsanordnung unbedingt gründlich überdacht werden. In Zukunft ist es wichtig, die

klinischen Studien weiter auszudehnen, um die Chancen und auch die Grenzen für eine Therapie mit CAP genauer definieren zu können.

7 Ausblick

Ungefähr zehn Jahre nachdem Alexander Fleming 1928 durch Zufall auf den Wirkstoff Penicillin stieß, revolutionierte diese Entdeckung die Therapiemöglichkeiten für bakteriell induzierte Krankheiten [94]. Eine immer größere Bandbreite an Antibiotika wurde entwickelt und bis dahin äußerst schwer heilbare Krankheiten, wie zum Beispiel Lungenentzündungen, Pocken oder Syphilis konnten erfolgreich behandelt werden. Damals wurden alle Arten von Antibiotika sorglos eingesetzt. Das daraus resultierende Problem der Resistenzentwicklung bestimmter Keime bekommen wir nun mehr und mehr zu spüren [95]. Gerade in Krankenhäusern, wo sich viele verschiedene Krankheitserreger häufen und die Patienten durch unterschiedliche Krankheiten immungeschwächt sind, können sich, z.B. durch mangelnde Krankenhaushygiene, lebensbedrohliche nosokomiale Infektionen ausbreiten. Die bekanntesten Vertreter dieser „Krankenhauskeime“ sind der Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) und der Vancomycin resistente *Enterococcus* (VRE). Um dieses Problem zukünftig in den Griff zu bekommen, steht die Suche nach wirkungsvollen lokal anzuwendenden Alternativen zu Breitband-Antibiotika derzeit im Fokus der Forschung. CAP stellt einen multifaktoriellen, kontaktlosen Therapieansatz dar, der nicht nach dem für Antibiotika gültigen Schlüssel-Schloss-Prinzip funktioniert. Somit kann das Risiko für die Entwicklung von Resistenzen bei Behandlungen mittels CAP als relativ gering bewertet werden. In der vorliegenden *In-Vitro*-Studie konnte demonstriert werden, dass CAP gegenüber dem Bakterium *E. faecalis* gute desinfizierende Eigenschaften zeigt. Für planktonische *Candida*-Lösungen konnte ebenfalls eine gute Effektivität von CAP gegen den Pilz erzielt werden. Die Wirkweise auf *Candida*-Biofilme sollte jedoch unter anderen Versuchsbedingungen in anknüpfenden Studien nochmals überprüft werden. Außerdem sollten weitere Keime auf die Möglichkeit der Desinfektion durch CAP getestet werden. Gegenstand der aktuellen Forschung an der Universitätsklinik Regensburg, Fachbereich Dermatologie, ist die Änderung der physikalischen Parameter der Plasmaquelle, um den chemischen Cocktail an reaktiven Spezies zu verändern und seinen desinfizierenden Effekt gegenüber verschiedenen Mikroorganismen zu optimieren.

Abkürzungsverzeichnis

CAP	Cold atmospheric plasma
CHX	Chlorhexidin
CFU	colony-forming unit (Kolonie bildende Einheit)
DL	Detektionslimit
cm ²	Quadratcentimeter
g	Gramm
h	Stunde
J	Joule; 1 J = 1 kg m ² s ⁻²
KBE	Kolonie bildende Einheit
kg	Kilogramm
l	Liter
μl	10 ⁻⁶ Liter
min	Minute
ml	10 ⁻³ Liter
nm	10 ⁻⁹ Meter
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Salin
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
t	Zeit
VF	Verdünnungsfaktor
W	Watt

Literaturverzeichnis

1. Zaura, E.; Keijser, B.J.F.; Huse, S.M.; Crielaard, W. Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC microbiology* 2009, 9, 259.
2. Kayser, F.H.; Böttger, E.C.; Deplazes, P.; Haller, O. Allgemeine Aspekte der medizinischen Mikrobiologie und Labordiagnostik: Allgemeine Infektionslehre. In *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie: [Hygiene, Immunologie, Bakteriologie, Virologie, Mykologie, Parasitologie, Infektiologie]*, 13., vollst. überarb. und erw. Aufl.; Kayser, F.H., Ed.; Thieme: Stuttgart, 2014; pp 42–46.
3. Brandwein, M.; Steinberg, D.; Meshner, S. Microbial biofilms and the human skin microbiome. *NPJ biofilms and microbiomes* 2016, 2, 3.
4. Omar, A.; Wright, J.B.; Schultz, G.; Burrell, R.; Nadworny, P. Microbial Biofilms and Chronic Wounds. *Microorganisms* 2017, 5.
5. van Dam, P. NiederlandeNet – Bildung und Forschung - Personen A-Z - Antoni van Leeuwenhoek. <https://www.uni-muenster.de/NiederlandeNet/nl-wissen/bildungsforschung/personen/leeuwenhoek.html> (accessed on 10 January 2018).
6. Dymock. Detection of Microorganisms in Dental Plaque. In *Medical biofilms: Detection, prevention, and control*; Jass, J., Surman, S., Walker, J., Eds., 2003; pp 199–220.
7. Donlan, R.M.; Costerton, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical microbiology reviews* 2002, 15, 167–193.
8. Dunne, W.M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clinical microbiology reviews* 2002, 15, 155–166.
9. Hellwig, E.; Klimek, J.; Attin, T. Einführung in die Zahnerhaltung. *Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie ; mit 63 Tabellen*, 6., überarb. Aufl.; Dt. Zahnärzte-Verl.: Köln, 2013.
10. Kayser, F.H.; Böttger, E.C. Allgemeine Bakteriologie. In *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie: [Hygiene, Immunologie, Bakteriologie, Virologie, Mykologie, Parasitologie, Infektiologie]*, 13., vollst. überarb. und erw. Aufl.; Kayser, F.H., Ed.; Thieme: Stuttgart, 2014; pp 190–264.

11. Sørensen, M.L.; Dahl, P.; Sams, T. How fast is a collective bacterial state established? *PloS one* 2017, 12, e0180199.
12. Murray, B.E. The life and times of the Enterococcus. *Clinical microbiology reviews* 1990, 3, 46–65.
13. Kayser, F.H.; Böttger, E.C. Bakterien als Krankheitserreger. In *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie: [Hygiene, Immunologie, Bakteriologie, Virologie, Mykologie, Parasitologie, Infektiologie]*, 13., vollst. überarb. und erw. Aufl.; Kayser, F.H., Ed.; Thieme: Stuttgart, 2014; pp 265–364.
14. Sherman, J.M.; Mauer, J.C.; Stark, P. *Streptococcus fecalis*. *Journal of bacteriology* 1937, 33, 275–282.
15. Madsen, K.T.; Skov, M.N.; Gill, S.; Kemp, M. Virulence Factors Associated with Enterococcus Faecalis Infective Endocarditis: A Mini Review. *The open microbiology journal* 2017, 11, 1–11.
16. Bhardwaj, S.B.; Mehta, M.; Sood, S.; Sharma, J. Biofilm Formation by Drug Resistant Enterococci Isolates Obtained from Chronic Periodontitis Patients. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 2017, 11, DC01-DC03.
17. Komiyama, E.Y.; Lepesqueur, L.S.S.; Yassuda, C.G.; Samaranayake, L.P.; Parahitiyawa, N.B.; Balducci, I.; Koga-Ito, C.Y. Enterococcus Species in the Oral Cavity: Prevalence, Virulence Factors and Antimicrobial Susceptibility. *PloS one* 2016, 11.
18. Hülsmann, M.; Schriever, A. Revisionen. In *Endodontie, Studienausgabe der 4. Auflage* 2001; Heidemann, D., Baumann, M.A., Haunfelder, D., Diedrich, P., Betz, W., Geurtsen, W., Hickel, P., Hülsmann, M., Löst, C., Petschelt, A., Raab, W., Schäfer, E., Schriever, A., Staehle, H.J., Stephan, B., Weiger, B., Weigl, P., Horch, H.-H., Koeck, B., Eds.; Elsevier Urban & Fischer: München, 2001; pp 166–181.
19. Rosen, E.; Tsesis, I.; Elbahary, S.; Storzi, N.; Kolodkin-Gal, I. Eradication of Enterococcus faecalis Biofilms on Human Dentin. *Frontiers in microbiology* 2016, 7, 2055.
20. Haapasalo, M.; Orstavik, D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *Journal of dental research* 1987, 66, 1375–1379.

21. Bukhary, S.; Balto, H. Antibacterial Efficacy of Octenisept, Alexidine, Chlorhexidine, and Sodium Hypochlorite against *Enterococcus faecalis* Biofilms. *Journal of endodontics* 2017, 43, 643–647.
22. Kayser, F.H.; Böttger, E.C. Pilze als Krankheitserreger. In *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie: [Hygiene, Immunologie, Bakteriologie, Virologie, Mykologie, Parasitologie, Infektiologie]*, 13., vollst. überarb. und erw. Aufl.; Kayser, F.H., Ed.; Thieme: Stuttgart, 2014; pp 376–391.
23. Patil, S.; Rao, R.S.; Majumdar, B.; Anil, S. Clinical Appearance of Oral Candida Infection and Therapeutic Strategies. *Frontiers in microbiology* 2015, 6, 1391.
24. Cutler, J.E. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annual review of microbiology* 1991, 45, 187–218.
25. Bartels, H.A.; Blechman, H. Survey of the yeast populations in saliva and an evaluation of some procedures for identification of *Candida albicans*. *Journal of dental research* 1962, 41, 1386–1390.
26. Cate, J.M. ten; Klis, F.M.; Pereira-Cenci, T.; Crielaard, W.; Groot, P.W.J. de. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *Journal of dental research* 2009, 88, 105–115.
27. Williams, D.; Lewis, M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *Journal of oral microbiology* 2011, 3.
28. Hof, H. Medizinisch relevante Pilze: Mykologie. *Candida*. In *Medizinische Mikrobiologie: [Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Immunologie, klinische Infektiologie, Hygiene ; + campus.thieme.de]*, 5., vollst. überarb. Aufl.; Hof, H., Dörries, R., Geginat, G., Eds.; Georg Thieme Verlag KG: s.l., 2014; pp 475–500.
29. Farah, C.S.; Ashman, R.B.; Challacombe, S.J. Oral candidosis. *Clinics in dermatology* 2000, 18, 553–562.
30. Williams, D.W.; Kuriyama, T.; Silva, S.; Malic, S.; Lewis, M.A.O. *Candida* biofilms and oral candidosis: Treatment and prevention. *Periodontology* 2000 2011, 55, 250–265.
31. Sobel, J.D. Vulvovaginal candidosis. *Lancet (London, England)* 2007, 369, 1961–1971.

32. Esebelahie, N.O.; Enweani, I.B.; Omoregie, R. Candida colonisation in asymptomatic HIV patients attending a tertiary hospital in Benin City, Nigeria. *The Libyan journal of medicine* 2013, 8, 20322.
33. Reichart, P.A.; Samaranayake, L.P.; Philipsen, H.P. Pathology and clinical correlates in oral candidiasis and its variants: A review. *Oral diseases* 2000, 6, 85–91.
34. McCullough, M.J.; Savage, N.W. Oral candidosis and the therapeutic use of antifungal agents in dentistry. *Australian dental journal* 2005, 50, 36 – 39.
35. Salerno, C.; Pascale, M.; Contaldo, M.; Esposito, V.; Busciolano, M.; Milillo, L.; Guida, A.; Petruzzi, M.; Serpico, R. Candida-associated denture stomatitis. *Med Oral* 2009, 139-143.
36. Webb, B.C.; Thomas, C.J.; Willcox, M.D.; Harty, D.W.; Knox, K.W. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 1. Factors influencing distribution of Candida species in the oral cavity. *Australian dental journal* 1998, 43, 45–50.
37. Vincent, J.L.; Anaissie, E.; Bruining, H.; Demajo, W.; el-Ebiary, M.; Haber, J.; Hiramatsu, Y.; Nitenberg, G.; Nyström, P.O.; Pittet, D. Epidemiology, diagnosis and treatment of systemic Candida infection in surgical patients under intensive care. *Intensive care medicine* 1998, 24, 206–216.
38. Sanguinetti, M.; Posteraro, B.; Lass-Flörl, C. Antifungal drug resistance among Candida species: Mechanisms and clinical impact. *Mycoses* 2015, 58 Suppl 2, 2–13.
39. Heinlin, J.; Morfill, G.; Landthaler, M.; Stolz, W.; Isbary, G.; Zimmermann, J.L.; Shimizu, T.; Karrer, S. Plasma medicine: Possible applications in dermatology. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 2010, 8, 968–976.
40. Langmuir, I. The Interaction of Electron and Positive Ion Space Charges in Cathode Sheaths. *Phys. Rev.* 1929, 33, 954–989.
41. Heinlin, J.; Isbary, G.; Stolz, W.; Morfill, G.; Landthaler, M.; Shimizu, T.; Steffes, B.; Nosenko, T.; Zimmermann, J.; Karrer, S. Plasma applications in medicine with a

- special focus on dermatology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 2011, 25, 1–11.
42. Fridman, A.A. *Plasma chemistry*; Cambridge University Press: Cambridge, 2012.
 43. Fridman, G.; Friedman, G.; Gutsol, A.; Shekhter, A.B.; Vasilets, V.N.; Fridman, A. *Applied Plasma Medicine. Plasma Process. Polym.* 2008, 5, 503–533.
 44. Nosenko, T.; Shimizu, T.; Morfill, G.E. Designing plasmas for chronic wound disinfection. *New J. Phys.* 2009, 11, 115013.
 45. Wertheimer, M.R.; Coulombe, S. Plasma medicine. *La physique au Canada* 2012, 189–192.
 46. Maisch, T.; Shimizu, T.; Mitra, A.; Heinlin, J.; Karrer, S.; Li, Y.-F.; Morfill, G.; Zimmermann, J.L. Contact-free cold atmospheric plasma treatment of *Deinococcus radiodurans*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 2012, 39, 1367–1375.
 47. Delben, J.A.; Zago, C.E.; Tyhovych, N.; Duarte, S.; Vergani, C.E. Effect of Atmospheric-Pressure Cold Plasma on Pathogenic Oral Biofilms and In Vitro Reconstituted Oral Epithelium. *PloS one* 2016, 11, e0155427.
 48. Isbary, G.; Morfill, G.; Schmidt, H.U.; Georgi, M.; Ramrath, K.; Heinlin, J.; Karrer, S.; Landthaler, M.; Shimizu, T.; Steffes, B.; et al. A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. *The British journal of dermatology* 2010, 163, 78–82.
 49. Moisan, M.; Barbeau, J.; Moreau, S.; Pelletier, J.; Tabrizian, M.; Yahia, L.H. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *International journal of pharmaceutics* 2001, 1–21.
 50. Heinlin, J.; Maisch, T.; Zimmermann, J.L.; Shimizu, T.; Holzmann, T.; Simon, M.; Heider, J.; Landthaler, M.; Morfill, G.; Karrer, S. Contact-free inactivation of *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis* by cold atmospheric plasma treatment. *Future microbiology* 2013, 8, 1097–1106.
 51. Kvam, E.; Davis, B.; Mondello, F.; Garner, A.L. Nonthermal atmospheric plasma rapidly disinfects multidrug-resistant microbes by inducing cell surface damage. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012, 56, 2028–2036.

52. Maisch, T.; Shimizu, T.; Isbary, G.; Heinlin, J.; Karrer, S.; Klämpfl, T.G.; Li, Y.-F.; Morfill, G.; Zimmermann, J.L. Contact-free inactivation of *Candida albicans* biofilms by cold atmospheric air plasma. *Applied and environmental microbiology* 2012, 78, 4242–4247.
53. Tominami, K.; Kanetaka, H.; Sasaki, S.; Mokudai, T.; Kaneko, T.; Niwano, Y. Cold atmospheric plasma enhances osteoblast differentiation. *PloS one* 2017, 12, e0180507.
54. Üreyen Kaya, B.; Kececi, A.D.; Güldaş, H.E.; Çetin, E.S.; Öztürk, T.; Öksüz, L.; Bozduman, F. Efficacy of endodontic applications of ozone and low-temperature atmospheric pressure plasma on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Letters in applied microbiology* 2014, 58, 8–15.
55. Li, Y.; Sun, K.; Ye, G.; Liang, Y.; Pan, H.; Wang, G.; Zhao, Y.; Pan, J.; Zhang, J.; Fang, J. Evaluation of Cold Plasma Treatment and Safety in Disinfecting 3-week Root Canal *Enterococcus faecalis* Biofilm In Vitro. *Journal of endodontics* 2015, 41, 1325–1330.
56. Cieplik, F.; Tabenski, L.; Buchalla, W.; Maisch, T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Frontiers in microbiology* 2014, 5, 405.
57. Maisch, T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 2015, 14, 1518–1526.
58. Arweiler, N.B.; Ilse, A. Niedrig dosierte Chlorhexidinpräparate. *Oralprophylaxe & Kinderzahnheilkunde* 2007, 16–21.
59. Loe, H.; Rindom Schiott, C. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res* 1970, 5, 79–83.
60. LO - Laboroptik GmbH. Zählkammer Neubauer - Improved. <http://zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html> (accessed on 10 January 2018).

61. Miles, A.A.; Misra, S.S.; Irwin, J.O. The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of hygiene* 1938, 38, 732–749.
62. Gebel, J. Anforderungskatalog für die Aufnahme von chemischen Desinfektionsverfahren in die Desinfektionsmittel-Liste der DGfM. Stand: 4. Februar 2002; mhp: Wiesbaden, 2002.
63. Herbst, S.R.; Hertel, M.; Ballout, H.; Pierdzioch, P.; Weltmann, K.-D.; Wirtz, H.C.; Abu-Sirhan, S.; Kostka, E.; Paris, S.; Preissner, S. Bactericidal Efficacy of Cold Plasma at Different Depths of Infected Root Canals In Vitro. *The open dentistry journal* 2015, 9, 486–491.
64. Zhou, X.-C.; Li, Y.-L.; Liu, D.-X.; Cao, Y.-G.; Lu, X.-P. Bactericidal effect of plasma jet with helium flowing through 3% hydrogen peroxide against *Enterococcus faecalis*. *Experimental and therapeutic medicine* 2016, 12, 3073–3077.
65. Disinfection, sterilization, and preservation; Block, S.S., Ed., 5th ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, Pa., London, 2001.
66. Lenet, B.J.; Komorowski, R.; Wu, X.Y.; Huang, J.; Grad, H.; Lawrence, H.P.; Friedman, S. Antimicrobial substantivity of bovine root dentin exposed to different chlorhexidine delivery vehicles. *Journal of endodontics* 2000, 26, 652–655.
67. Gomes, B.P.F.A.; Ferraz, C.C.R.; M. E., V.; Berber, V.B.; Teixeira, F.B.; Souza-Filho, F.J. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001, 34, 424–428.
68. Camacho-Alonso, F.; Salmerón-Lozano, P.; Martínez-Beneyto, Y. Effects of photodynamic therapy, 2 % chlorhexidine, triantibiotic mixture, propolis and ozone on root canals experimentally infected with *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *Odontology* 2017, 105, 338–346.
69. Guneser, M.B.; Akbulut, M.B.; Eldeniz, A.U. Antibacterial effect of chlorhexidine-cetrimide combination, *Salvia officinalis* plant extract and octenidine in comparison with conventional endodontic irrigants. *Dental materials journal* 2016, 35, 736–741.

70. Joy Sinha, D.; D S Nandha, K.; Jaiswal, N.; Vasudeva, A.; Prabha Tyagi, S.; Pratap Singh, U. Antibacterial Effect of *Azadirachta indica* (Neem) or *Curcuma longa* (Turmeric) against *Enterococcus faecalis* Compared with That of 5% Sodium Hypochlorite or 2% Chlorhexidine in vitro. *The Bulletin of Tokyo Dental College* 2017, 58, 103–109.
71. Tonea, A.; Badea, M.; Oana, L.; Sava, S.; Vodnar, D. Antibacterial and antifungal activity of endodontic intracanal medications. *Clujul medical (1957)* 2017, 90, 344–347.
72. Haseeb, R.; Lau, M.; Sheah, M.; Montagner, F.; Quiram, G.; Palmer, K.; Stefan, M.C.; Rodrigues, D.C. Synthesis and Characterization of New Chlorhexidine-Containing Nanoparticles for Root Canal Disinfection. *Materials (Basel, Switzerland)* 2016, 9.
73. Flötra, L.; Gjermo, P.; Rölla, G.; Waerhaug, J. Side effects of chlorhexidine mouth washes. *Scandinavian journal of dental research* 1971, 79, 119–125.
74. Jones, C.G. Chlorhexidine: Is it still the gold standard? *Periodontology* 2000 1997, 15, 55–62.
75. Downes, A.; Blunt, T.P. On the Influence of Light upon Protoplasm. *Proceedings of the Royal Society of London* 1878, 28, 199–212.
76. Diffey, B.L. Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods* 2002, 28, 4–13.
77. Setlow, R.B. The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1974, 3363–3366.
78. Gates, F.L. A study of the bactericidal action of ultra violet light: III. The absorption of ultra violet light by bacteria. *The Journal of General Physiology* 1930, 14, 31–42.
79. STERILSYSTEMS GmbH. UVC Technologie. <https://www.sterilsystems.de/de/Technologie/UV-C-Technologie> (accessed on 10 January 2018).

80. Conner-Kerr, T.A.; Sullivan, P.K.; Gaillard, J.; Franklin, M.E.; Jones, R.M. The effects of ultraviolet radiation on antibiotic-resistant bacteria in vitro. *Ostomy/wound management* 1998, 55–56.
81. Bak, J.; Ladefoged, S.D.; Tvede, M.; Begovic, T.; Gregersen, A. Dose requirements for UVC disinfection of catheter biofilms. *Biofouling* 2009, 25, 289–296.
82. Anderson, D.J.; Gergen, M.F.; Smathers, E.; Sexton, D.J.; Chen, L.F.; Weber, D.J.; Rutala, W.A. Decontamination of targeted pathogens from patient rooms using an automated ultraviolet-C-emitting device. *Infection control and hospital epidemiology* 2013, 34, 466–471.
83. Gostine, A.; Gostine, D.; Donohue, C.; Carlstrom, L. Evaluating the effectiveness of ultraviolet-C lamps for reducing keyboard contamination in the intensive care unit: A longitudinal analysis. *American journal of infection control* 2016, 44, 1089–1094.
84. Kac, G.; Gueneret, M.; Rodi, A.; Abergel, E.; Grataloup, C.; Denarié, N.; Peyrard, S.; Chatellier, G.; Emmerich, J.; Meyer, G.; et al. Evaluation of a new disinfection procedure for ultrasound probes using ultraviolet light. *The Journal of hospital infection* 2007, 65, 163–168.
85. Knox, R.W.; Demons, S.T.; Cunningham, C.W. A Novel Method to Decontaminate Surgical Instruments for Operational and Austere Environments. *Wilderness & environmental medicine* 2015, 26, 509–513.
86. Messina, G.; Burgassi, S.; Messina, D.; Montagnani, V.; Cevenini, G. A new UV-LED device for automatic disinfection of stethoscope membranes. *American journal of infection control* 2015, 43, e61-6.
87. Reu, K. de; Grijspeerdt, K.; Herman, L.; Heyndrickx, M.; Uyttendaele, M.; Debevere, J.; Putirulan, F.F.; Bolder, N.M. The effect of a commercial UV disinfection system on the bacterial load of shell eggs. *Letters in applied microbiology* 2006, 42, 144–148.
88. Chau, N.P.T.; Chung, N.H.; Jeon, J.G. Relationships between the antibacterial activity of sodium hypochlorite and treatment time and biofilm age in early *Enterococcus faecalis* biofilms. *International endodontic journal* 2015, 48, 782–789.

89. Shrestha, A.; Rimal, J.; Rao, A.; Sequeira, P.S.; Doshi, D.; Bhat, G.K. In vitro antifungal effect of mouth rinses containing chlorhexidine and thymol. *Journal of Dental Sciences* 2011, 6, 1–5.
90. Giuliana, G.; Pizzo, G.; Milici, M.E.; Musotto, G.C.; Giangreco, R. In vitro antifungal properties of mouthrinses containing antimicrobial agents. *Journal of periodontology* 1997, 68, 729–733.
91. Estrela, C.; Ribeiro, R.G.; Estrela, C.R.A.; Pécora, J.D.; Sousa-Neto, M.D. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz. Dent. J.* 2003, 14, 58–62.
92. Dai, T.; Kharkwal, G.B.; Zhao, J.; St Denis, T.G.; Wu, Q.; Xia, Y.; Huang, L.; Sharma, S.K.; d'Enfert, C.; Hamblin, M.R. Ultraviolet-C light for treatment of *Candida albicans* burn infection in mice. *Photochemistry and photobiology* 2011, 87, 342–349.
93. Sullivan, P.K.; Conner-Kerr, T.A. A comparative study of the effects of UVC irradiation on select procaryotic and eucaryotic wound pathogens. *Ostomy/wound management* 2000, 46, 28–34.
94. Goddemeier, C. Alexander Fleming (1881–1955): Penicillin. *Deutsches Ärzteblatt* 2006, 103, 2286.
95. Salzberger, B.; Welte, T. Multiresistente Erreger. *Der Internist* 2015, 56, 1231–1232.

Danksagung

Diese Promotionsarbeit entstand im Rahmen einer Forschungsgruppe aus den Abteilungen der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und der Klinik für Zahnerhaltung und Parodontologie an der Universitätsklinik Regensburg.

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit wahrnehmen, den vielen Menschen zu danken, die mir auf dem Weg zur Promotion auf die unterschiedlichsten Arten geholfen haben und stets hinter mir standen.

In erster Linie möchte ich meinem Doktorvater Herrn apl. Prof. Dr. Tim Maisch danken, dem ich die Idee und das Konzept für diese Doktorarbeit zu verdanken habe. Meine Fragen hat er immer mit viel Geduld und Know-how beantwortet. Lieber Tim, danke für dein stets offenes Ohr und dein immer schnelles und hilfreiches Feedback. Ich kann mir keine bessere Betreuung für eine Doktorarbeit vorstellen!

Außerdem möchte ich dem kompletten Arbeitskreis „AG Biofilm“ danken für den regelmäßigen Ideenaustausch. Allen voran geht hierbei der Dank an Dr. Karl-Anton Hiller, der sich viel Zeit für die gemeinsame Erstellung aller Graphiken genommen hat. Auch möchte ich mich bei Denise Mühler und Dr. Andreas Pummer bedanken, die mich am Anfang mit der Laborarbeit im Allgemeinen vertraut gemacht haben und mir wieder gezeigt haben wie eine Pipette funktioniert.

Auch im Labor der Dermatologie wurde ich von allen Mitarbeitern sehr nett aufgenommen und habe mich dort immer besonders wohl gefühlt, vielen Dank dafür!

Der Firma terraplasma GmbH mit Sitz in Garching, München, möchte ich für die Bereitstellung der Derma-Care-Plasmaquelle danken.

Großer Dank gilt meinem Freund Konrad Fackler dafür, dass er mich in IT-Fragen beraten hat, mich auch mal mit einem Glas Wein abgelenkt und besonders, dass er mich bei den regelmäßigen sonntäglichen Fahrten zum Labor begleitet hat.

Mein größter Dank geht an meine Familie vor allem dafür, dass wir auch in den schwierigsten Lebenssituationen zusammenhalten. Ohne die unermüdliche Unterstützung meiner Mutter wären mein ganzes Studium und diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Danke für alles, du bist meine Löwenmama!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Larissa Singer
Geburtstag: 17. August 1992
Geburtsort: Pfaffenhofen an der Ilm
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Bekenntnis: rk
Adresse: Celtisstraße 10
90459 Nürnberg

Werdegang

Seit 09/2017 Vorbereitungsassistentin in der Zahnarztpraxis Dr. Anne Gresskowski, Nürnberg

04/2017 Approbation als Zahnärztin

01/2017 – 07/2017 experimenteller Teil der Promotionsarbeit

11/2016 Zahnärztliche Prüfung

04/2014 Zahnärztliche Vorprüfung

04/2013 Naturwissenschaftliche Vorprüfung

10/2011 – 11/2016 Studium der Zahnmedizin, Universität Regensburg

2002 – 2011 Johann-Sebastian-Bach-Gymnasium, Windsbach
Abschluss: Abitur

1998 – 2002 Grundschule Abenberg

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Nürnberg, den 05.03.2018

Larissa Singer