

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung, Parodontologie, Endodontologie, Präventive
Zahnmedizin und Kinderzahnheilkunde
(Komm. Leiter: Univ. - Prof. Dr. Christian Splieth)
(Seniorprofessor Parodontologie Prof. Dr. med. dent. Thomas Kocher)
im Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Karl-Friedrich Krey)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

**Vergleich der Effekte von kaltem Atmosphärendruckplasma und
konventionellen Desinfektionsmitteln in der Endodontologie. Eine
In-vitro-Untersuchung an *Candida albicans* im Wurzelkanal
extrahierter menschlicher Zähne.**

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Zahnmedizin
(Dr. med. dent.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2023

vorgelegt von:

Kerlikowski, Anne

geb. am: 06.10.1991

in: Berlin

Die vorliegende Dissertation basiert auf der Publikation:

Kerlikowski A., Matthes R., Pink C., Steffen H., Schlüter R., Holtfreter B., Weltmann K. D., von Woedtke T., Kocher .T, Jablonowski L. (2020) "Effects of cold atmospheric pressure plasma and disinfecting agents on *Candida albicans* in root canals of extracted human teeth." *J Biophotonics* 13(12):e202000221. doi: 10.1002/jbio.202000221. Epub 2020 Sep 30. PMID: 32931142.

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. dent. Thomas Kocher

2. Gutachter: Prof. Dr. med. dent. Stefan Rupf

Ort, Raum: Greifswald, Hauptgebäude Seminarraum 13.3.1; Turm B, 3. Etage (B3.49)

Tag der Disputation: 11.01.2024

Inhalt

1. Einführung	1
1.1. Problemstellung	1
1.2. Einfluss der Wurzelkanalanatomie auf den endodontalen Behandlungserfolg	2
1.3. Das Mikrobiom im Wurzelkanal und <i>C. albicans</i>	3
1.4. Die chemomechanische Aufbereitung	6
1.5. Atmosphärendruckplasma.....	8
2. Zielstellung	11
3. Material und Methoden	11
3.1. Präparation der Proben	11
3.2. Biofilmbildung.....	15
3.3. Plasmaquelle.....	15
3.4. Versuchsaufbau	17
4. Ergebnisse	21
4.1. Ergebnisse der quantitativen Analysen.....	21
4.2. Ergebnisse der qualitativen Analysen.....	23
5. Diskussion.....	32
5.1. Diskussion von Material und Methoden	32
5.2. Diskussion der Ergebnisse	38
6. Schlussfolgerung.....	43
7. Zusammenfassung	45
8. Literaturverzeichnis	46
9. Abbildungsverzeichnis.....	64
10. Tabellenverzeichnis.....	64
11. Abkürzungen	65
12. Anhang.....	66
12.1. Publikation	66
12.2. Votum der Ethikkommission	75

1. Einführung

1.1. Problemstellung

Seit 1991 hat sich die Mundgesundheit in Deutschland sukzessive verbessert (DMS V 2016). So waren beispielsweise 2014 bereits 81 % der deutschen 12-Jährigen kariesfrei. Der DMF-T ist in allen Altersbereichen und sozialen Schichten gesunken. Über 90 % der kariösen Zähne sind hierzulande in den Altersgruppen der 35 - 44-Jährigen und der 65 - 74-Jährigen zahnmedizinisch versorgt. Nur etwas mehr als 10 % der Senioren im Alter zwischen 65 - 74 sind von Zahnlosigkeit betroffen, mit sinkender Tendenz (DMS V 2016). Die Anzahl der Extraktionen sank seit 1991 von 16,23 Mio. auf 12,09 Mio. durchgeführte Behandlungen pro Jahr (KZBV Jahrbuch 2022). Prävention und die technische Weiterentwicklung konservierender Behandlungsmöglichkeiten können hierfür als Ursache angenommen werden. Die Endodontologie ist ein wichtiger Teilbereich der konservierenden Zahnmedizin. Die Relevanz der Endodontologie ist im Mittel über die letzten 30 Jahre im zahnmedizinischen Alltag konstant geblieben. Seit 1991 hat sich die Anzahl der durchgeführten Wurzelkanalbehandlungen von 6,91 Mio. auf 6,23 Mio. Behandlungen im Vergleich zu anderen Behandlungen, wie Füllungstherapien und Extraktionen wenig verändert (KZBV Jahrbuch 2022). Die Erfolgswahrscheinlichkeit der Wurzelkanalbehandlung eines Zahnes mit anschließend vollständiger Rückbildung periapikaler Läsionen liegt heutzutage im Schnitt bei 82 %. Eine Größenreduktion periapikaler Läsionen kann sogar in 92,6 % der Fälle erzielt werden (Burns 2022). Trotz moderner Behandlungsmethoden blieb jedoch auch die Anzahl der durchgeführten Wurzelspitzenresektionen über die vergangenen 30 Jahre konstant. Mit 0,67 Mio. durchgeführten Wurzelspitzenresektionen im Jahr 1991 und 0,62 Mio. im Jahr 2018 werden etwa 10 % der endodontologisch behandelten Zähne chirurgisch nachbehandelt (Hertel 2020).

Ziel der endodontalen Behandlung ist die vollständige Entfernung infizierten und nekrotischen Pulpengewebes, sowie vorhandener mikrobieller Besiedelung. Da der Nachweis der Erfüllung dieser Kriterien in der Praxis nicht durchgeführt wird, werden für die Erfolgskontrolle radiologische Kriterien und klinische Symptome herangezogen. Zu den radiologischen Kriterien gehören die Abwesenheit periapikaler Läsionen und das Vorhandensein einer gleichmäßigen Wurzelkanalfüllung in korrekter anatomischer Form und Länge (Kerekes 1979;

Sjögren 1990). Zu den klinischen Symptomen gehören Schmerz, Schwellung und das Vorhandensein von Fistelgängen (Thiele 2003).

Die Schlüsselemente, die den Erfolg einer endodontalen Behandlung limitieren, sind die begrenzte Erreichbarkeit der Keimreservoirs für die chemomechanische Aufbereitung durch die Komplexität des Wurzelkanalsystems (Byström 1981; Lin 1991), sowie eventuelle Resistenzen des Erregerspektrums gegen konventionelle endodontale Medikamente (Gomes 1996).

In den letzten Jahrzehnten wurden fortlaufend neue Techniken entwickelt um die Erfolgswahrscheinlichkeit einer endodontale Behandlung zu erhöhen. Dazu gehören die Anwendung von Laser, Ozon, PIPS (photoneninduzierte photoakustische Spülmethode) und die photodynamische Therapie. Sie sind jedoch in ihrem Nutzen umstritten (Hülsmann 2005). Die vorliegende Arbeit vergleicht die desinfizierende Wirkung von kaltem Atmosphärendruckplasma (CAP) als weitere innovative Behandlungsmethode mit konventionellen endodontalen Spüllösungen.

1.2. Einfluss der Wurzelkanalanatomie auf den endodontalen Behandlungserfolg

Die Komplexität des Wurzelkanalsystems stellt eine wichtige Limitation des Ausgangs einer Endodontalbehandlung dar (Hoen 2002; Wolcott 2005). Bereits 1917 rückte der Aufbau des Wurzelkanalsystems in den Fokus der wissenschaftlichen Untersuchung (Hess 1917). Heutzutage gibt es eine Fülle von Studien, die Details der anatomischen Besonderheiten des Endodonts beschreiben (Tian 2012; Kim 2013; Ahmed 2017).

Zähne mit überschaubarer Wurzelanatomie, wie Frontzähne, Eckzähne und mandibuläre Prämolaren, welche meist singuläre Wurzelkanäle aufweisen, werden am häufigsten erfolgreich endodontologisch behandelt. Die Behandlung von Zähnen mit multiplen Wurzelkanälen, wie maxilläre Prämolare und Molare, sowie mandibuläre Prämolare, scheitert häufiger (Iqbal 2007; Burry 2016). In der Mehrzahl der Fälle enthält der obere erste Molar, mit bis zu drei Wurzelkanälen in der mesiobuccalen Wurzel (Ahmad 2014) die größte Anzahl an Kanälen (Estrela 2015). Er zeigt folglich mit 44,4 % auch die größte Misserfolgsquote (Iqbal 2007). Karabucak et al. fand 2016 in 23 % der revisionsbedürftigen Prämolare und Molare innerhalb der untersuchten Kohorte unbehandelte Wurzelkanäle. Die unvollständig behandelten Zähne waren mit einer viermal höheren Prävalenz von periapikalen Läsionen

assoziiert (Karabucak 2016). Von Arx et al. konnte 2005 an Wurzelspitzen revisionsbedürftiger Molaren aufzeigen, dass lediglich 14 % der maxillären Molaren in der mesiobuccalen Wurzel und 6 % der mandibulären Molaren in der mesialen Wurzel einen singulären Kanal aufwiesen. In den restlichen untersuchten Zähnen der Studie wurde eine komplexe Anatomien des Wurzelkanalsystems im Sinne akzessorischer Kanäle und Isthmen nachgewiesen (von Arx 2005). Zusätzliche Kanäle kennzeichnet häufig eine schwierig aufzubereitende Kanalanatomie. Wurzelkanäle können gerade oder gekrümmt verlaufen, runde, ovale oder schlitzförmige Querschnitte haben und schräg oder senkrecht verlaufende Seitenkanäle besitzen. Zähne mit mehreren Kanälen weisen häufig Isthmen zwischen den Kanälen auf. Sie enthalten Pulpa oder von der Pulpa abstammendes Gewebe (Weller 1995).

Um Behandlungsmisserfolge durch die Komplexität der Wurzelkanalanatomie zu minimieren, kommen heutzutage optische Hilfsmittel wie Lupenbrillen und Dentalmikroskope zum Einsatz (Karapinar-Kazandag 2010; de Toubes 2012). Jedoch konnten trotz der Zuhilfenahme eines Dentalmikroskopes lediglich 18 bis 22 % der vorhandenen akzessorischen Kanäle in den untersuchten mandibulären zweiten Molaren gefunden werden und lediglich 14 bis 18 % konnten aufbereitet werden (Karapinar-Kazandag 2010). Trotzdem erwirkt die Verwendung optischer Vergrößerungsmethoden bei Zähnen mit komplexer Wurzelanatomie, wie den oberen ersten Molaren, einen Vorteil für den klinischen Erfolg (Khalighinejad 2017).

Während das Auffinden der Kanäle und die mechanische Aufbereitung der Nischen im Wurzelkanalsystem den individuellen Fertigkeiten des behandelnden Zahnarztes unterliegt, legt die vorliegende Arbeit den Fokus auf eine Behandlungsmethode, die in der Lage sein könnte, unabhängig vom handwerklichen Geschick des behandelnden Zahnarztes reproduzierbar schwer zu erreichenden Keimreservoirs zu reinigen.

1.3. Das Mikrobiom im Wurzelkanal und *C. albicans*

In der Mundhöhle konnten bislang über 1000 verschiedene Erregerarten identifiziert werden (Wade 2013). In infizierten Wurzelkanälen sind bislang mehr als 400 verschiedene Keimarten nachgewiesen (Siqueira 2005). Die Flora einer manifesten Endodontitis besteht zu 90 % aus obligaten Anaerobiern (Sundqvist 1994), weshalb eine Selektion von Keimen aufgrund von Nährstoff- und Sauerstoffrestriktion, pH,

Temperatur sowie durch wechselseitige Interaktion der Erreger angenommen wird (Sundqvist 1992). Das Erregerspektrum in Zähnen die erstmalig eine endodontale Infektion aufweisen ist divers und ohne klar zuordenbaren Leitkeim (Siqueira 2005; Jhajharia 2015). Pilze wurden in 2 – 40 % der infizierten Zähne nachgewiesen (Sen 1995; Baumgartner 2000; Siqueira 2002). Durch unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber der chemomechanischen Aufbereitung schränkt sich das Keimspektrum im behandelten Wurzelkanalsystem ein (Haapasalo 1989; Gomes 1996). So werden obligate Anaerobier bereits durch die Eröffnung der Kavität und den Kontakt mit Sauerstoff eliminiert. Auch grampositive Erreger scheinen empfindlicher gegenüber der chemomechanischen Aufbereitung zu sein (Gomes 1996). Andere Erreger wiederum werden typischerweise in revisionsbedürftigen Zähnen nachgewiesen und sind demnach resistenter gegenüber der endodontalen Therapie. So ist *Enterococcus faecalis* das am häufigsten nachzuweisende Bakterium im revisionsbedürftigen Wurzelkanalsystem (Goldman 1969; Sundqvist 1998; Bouillaguet 2018). *Propionibacterium sp.* und *Actinomyces sp.* sind häufig in periapikalen Läsionen nachzuweisen (Abou-Rass 1998). *Candida albicans* ist der häufigste nachzuweisende Pilz in revisionsbedürftigen Zähnen (Waltimo 1997).

Bei *C. albicans* handelt es sich um einen Hefepilz, der typischerweise als Kommensale auf Schleimhäuten des Menschen nachgewiesen wird. *C. albicans* kann verschiedene Virulenzfaktoren aufweisen, die ihn befähigen bei gestörter Immunabwehr zum Pathogen zu werden (Hube 2002). Zu diesen Virulenzfaktoren zählt die Fähigkeit verschiedene Wachstumsmuster aufzuweisen. Es können Sprosszellen (Blastosporen), Pseudohyphen, echte Hyphen und Chlamydosporen gebildet werden (Bottone 1993; Sen 1997). Es wird vermutet, dass Blastosporen für die Verteilung im Wirtsorganismus relevant sind, während Hyphen und Pseudohyphen zur Gewebeinvasion befähigt sind (Gow 2011). Sprosszellen bilden sich unter anderem bei hoher Zelldichte ($< 10^7$ /ml), saurem pH und Temperaturen unter 30 °C. Ein saures Milieu, wie es im entzündeten (Punna-Moorthy 1987) und kariösen (Roberts 2022) Gewebe vorkommt, befördert zudem das Wachstum von *C. albicans* (Biswas 2005). Hyphen und Pseudohyphen werden bei höheren Temperaturen, neutralem bis basischen pH und niedrigerer Zelldichte gebildet (Davis 2000; Sudbery 2004; Song 2011). Auch bestimmte Kohlenstoff- und Stickstoffquellen, sowie der Kontakt zu Oberflächen haben einen Einfluss auf die Ausbildung von Hyphen und Pseudohyphen (Monge 2006). Chlamydosporen sind

Dauerformen, die nur sehr selten *in vivo* beobachtet werden konnten (Heineman 1961; Jitsurong 1993).

Als weitere Virulenzfaktoren exprimiert *C. albicans* Adhäsine, mit deren Hilfe sich der Pilz an glatte Oberflächen haftet (Hoyer 2001; Sundstrom 1999). Die Bindung an Oberflächen befördert die Ausprägung von Hyphen und Pseudohyphen und somit eine Gewebsinvasion (Kumamoto 2005). Während des Wechsels des Wachstumsmusters der Hefezelle zur Hyphe kommt es zu Änderungen der Genexpression, in deren Folge Oberflächenproteine gebildet werden, die *C. albicans* an das Überleben in durchbluteten Geweben anpassen. Dazu gehört die Fähigkeit die Immunantwort zu modulieren (Luo 2010).

Die Fähigkeit Oberflächen anzuhaften ist die Grundvoraussetzung für die Bildung von Biofilmen, welche *C. albicans* sowohl alleine als auch in Vergesellschaftung mit anderen Mikroben bildet (Bagg 1986; Grimaudo 1997; de Toubes 2012). Biofilme bestehen initial aus Sprosszellen, die in eine extrazelluläre Matrix aus Glykoproteinen eingebettet sind. Wie die Adhäsion befördert auch die Einbettung in eine extrazelluläre Matrix die Ausbildung von Hyphen und Pseudohyphen (Chandra 2001). Der Biofilm stellt eine Barriere für umgebende Agentien dar und erhöht somit die Resistenz der im Biofilm enthaltenen Zellen gegenüber Medikamenten. Zusätzlich werden Resistenzgene und ein reduziertes Zellwachstum im Biofilm als Ursachen für die erhöhte Antimykotikaresistenz diskutiert (Kumamoto 2002; Douglas 2003; Jabra-Rizk 2004). *C. albicans* kann darüber hinaus unabhängig vom Vorhandensein eines Biofilms Resistenzen gegen Kalziumhydroxid (Ca(OH)_2), einer typischen medikamentösen Einlage in der Endodontie, aufweisen (Waltimo 1999).

C. albicans ist unter unterschiedlichen Umweltbedingungen zum Wachstum befähigt. Er kann bei Temperaturen zwischen 5 °C und 46 °C, einem pH zwischen 2,5 und 10, sowie unter aeroben und anaeroben Bedingungen kultiviert werden (Odds 1988). Unter den anaeroben Bedingungen im Wurzelkanal ist die Biofilmformation zwar erschwert, aber möglich (Biswas 2005; Thein 2007). Die breite Anpassungsfähigkeit an unterschiedliche Umweltfaktoren prädestiniert *C. albicans* für eine Besiedlung der Mundhöhle, die stark wechselnden Bedingungen durch die Nahrungszufuhr ausgesetzt ist.

C. albicans kann Speisenzucker (Saccharose) zu kurzkettigen sauren Kohlenstoffverbindungen, wie Pyruvat und Fumerat verstoffwechseln und somit zur Demineralisation von Schmelz und Dentin beitragen (Pereira 2018). Darüber hinaus

verfügt *C. albicans* die Fähigkeit durch lytische Enzyme Dentin zu zersetzen (Hagihara 1988). Dies gibt *C. albicans* das Potential auf kariösem Weg eine Zugangskavität zum pulpalen Gewebe zu schaffen und dort eine Endodontitis zu befördern.

Die Rolle von *C. albicans* als Problemkeim in der Endodontologie gepaart mit seiner Widerstandsfähigkeit gegen gängige Behandlungsmethoden erfordert die Entwicklung einer neuen und effektiven Möglichkeit zur Reduktion seiner Keimzahl im Wurzelkanalsystem.

1.4. Die chemomechanische Aufbereitung

Die Wurzelkanalaufbereitung entfernt infiziertes Pulpengewebe, Mikroorganismen und deren Toxine sowie, durch die Bearbeitung entstandenen Debris aus dem Wurzelkanalsystem. Die mechanische Formung des Wurzelkanalsystems ermöglichen darüber hinaus eine suffiziente Füllung (Jahrbuch Endodontie 2016). Die im Rahmen der mechanischen Aufbereitung verwendeten Feilensysteme erreichen mindestens ein Drittel der Oberflächen des Wurzelkanalsystems nicht (Peters 2001; Weiger 2002; Paqué 2010), weshalb die Wurzelkanalaufbereitung durch desinfizierende Spüllösungen und medikamentösen Einlagen ergänzt wird (Jahrbuch Endodontie 2016). Manuell mit Kanülen applizierte Spüllösungen benetzen *in vitro* nur in 25 % der Fälle die Wurzelkanäle bis zur Arbeitslänge vollständig. Die Penetration des Wurzelkanalsystems kann durch eine ultraschallgestützte Applikation der Spüllösung auf eine hundertprozentige Benetzung des Hauptkanals und eine Benetzung von 25 – 93,5 % der Nebenkanäle optimiert werden (Spoorthy 2013).

Der Goldstandard der Spüllösungen in der Endodontie ist eine 0,5 - 5,25 prozentige Lösung von Natriumhypochlorid (NaOCl) (Zehnder 2006; Dutner 2012). NaOCl wirkt antimikrobiell gegen eine Vielzahl der bekannten endodontalen Erreger (Sen 1999; Vianna 2004; Sun 2018), da es Proteine denaturiert und zur Fettverseifung führt (Estrela 2002). NaOCl ist in der Lage Biofilme (Spratt 2001; Clegg 2006) und die organischen Anteile der Schmierschicht zu lösen (Grossman 1941). Anorganische Trümmer im Wurzelkanal können nicht mittels NaOCl entfernt werden (Mountouris 2004). Die Mikrohärtigkeit und die Elastizität des behandelten Dentins wird jedoch aufgrund der Alteration der organischen Bestandteile reduziert (Grigoratos 2001; Slutzky-Goldberg 2004; Pascon 2009). Die Adhäsionsstärke verwendeter

Bondingsysteme an Dentin kann durch die Behandlung mit NaOCl negativ beeinflusst werden (Ari 2003). Hinzu kommen gewebereizende bis toxische Eigenschaften mit steigender Konzentration (Becking 1991; Zhang 2003). Allergische Reaktionen sind ebenfalls möglich (Kaufman 1989).

Chlorhexidin (CHX) wird in 2-prozentiger Lösung als Ergänzung zur Spülung mit NaOCl empfohlen (Hülsmann 2005; Gomes 2013). CHX reagiert als zweifach positiv geladenes Kation mit negativ geladenen Lipopolysacchariden und Phosphatgruppen auf Zelloberflächen, was die Permeabilität der Zellmembran erhöht und zytoplasmatische Komponenten aus der Zelle entweichen lässt. In die Zelle eindringendes CHX führt zu Fällungsreaktionen im Zytoplasma (Gomes 2013). CHX ist wirksam gegenüber grampositiven und –negativen Bakterien und Pilzen (Elakanti 2015; Kadkhoda 2016) und entfaltet eine moderate Wirkung gegen einige Viren zu denen unter anderen typische virale Erreger respiratorischer Infektionen zählen (Yoon 2020). Unbehüllte Viren, Sporen und säurefeste Stäbchen sind unter *in vivo* Bedingungen gegen CHX resistent (Rikimaru 2000; Nerandzic 2015). CHX haftet über den Behandlungszeitraum hinaus an Geweben, was den Wirkungszeitraum verlängert (Khademi 2006). Die Haftstärke applizierter Bondingsysteme wird durch CHX im Gegensatz zu NaOCl nicht negativ beeinflusst (Erdemir 2004). CHX ist im Gegensatz zu NaOCl nicht in der Lage organisches Material und Biofilme aufzulösen (Okino 2004; Clegg 2006). Genau wie NaOCl kann es anorganisches Material nicht entfernen, reduziert jedoch die Mikrohärtigkeit des behandelten Dentins (Oliveira 2007) und kann allergische Reaktionen hervorrufen (Sharp 2016). CHX wirkt in üblicher Dosierung zytotoxisch auf humane Zellen (Liu 2018). Es bildet im direkten Kontakt mit NaOCl rotbraune Ausfällungen (Basrani 2007).

Um anorganische Reste der mechanischen Aufbereitung zu entfernen kann eine 10 - 17 prozentige EDTA-Lösung verwendet werden (Wu 2012). EDTA bindet Kalziumionen aus dem Dentin (Mohammadi 2013). Es ist jedoch nicht in der Lage organisches Material zu lösen (Lindemann 1985). EDTA reduziert die Wirksamkeit von NaOCl und darf somit nicht unmittelbar vor oder während des Einsatzes von NaOCl verwendet werden (Clarkson 2011).

Octenidin (OCT) wird vom Endodontiebeirat der DGZ nicht explizit zur Wurzelkanal desinfektion empfohlen (Hülsmann 2005), zeigt in Laboruntersuchungen aber in 0,1 - 2 prozentiger Lösung eine mit den Standardspüllösungen vergleichbare, bis überlegene Effektivität gegen endodontale Problemkeime (de Lucena 2013;

Ghivari 2017) bei geringer Gewebeschädlichkeit (Coaguila-Llerena 2020; Coaguila-Llerena 2020). In Hefen bewirkt OCT eine Destabilisierung der Zellmembran und ein Auslaufen des Zytoplasmas. Ursächlich wird eine Hemmung der Ergosterolsynthese angenommen (Prasad 1996). Trotz guter Gewebeverträglichkeit wurden im Rahmen der Applikationen von OCT unter Druck ins Gewebe massive, über Monate persistierende Ödeme beobachtet, die mit Gewebnekrosen assoziiert waren. Ursächlich wird eine mangelnde Absorption des Wirkstoffs angenommen (Wichtige Information Zur Arzneimittelsicherheit von Octenisept, 2008).

Jüngere Untersuchungen zeigen, dass Kreuzresistenzen bei gramnegativen Bakterien durch den Gebrauch von NaOCl, CHX und OCT in sublethalen Dosierungen auftreten können (Kampf 2018).

Im Gegensatz zu herkömmlichen Desinfektionsmitteln vereint CAP in *in vitro* Studien eine antimikrobielle Wirksamkeit (Jungbauer 2021) mit fehlenden Anzeichen für dauerhafte Gewebeschädigung (Schmidt 2017; Dijksteel 2020) und scheint somit eine vielversprechende Erweiterung des Spektrums der bisher in der Endodontologie angewendeten Desinfektionsmittel zu sein.

1.5. Atmosphärendruckplasma

Bei Plasma im physikalischen Sinne (Langmuir 1928) handelt sich um ein teilweise bis vollständig ionisiertes Gas. In Plasma erzeugenden Geräten werden Elektronen zum Beispiel durch das Anlegen eines ausreichend starken Wechselstroms aus der Atomhülle der Gasteilchen gelöst. Plasma enthält daher Ionen und frei bewegliche Elektronen. Plasma emittiert UV-Strahlung, sichtbares Licht und Wärme, sowie die in ihm enthaltenen Teilchen (Reuter 2018). Das primär ionisierte Gas wird als Arbeitsgas bezeichnet. Häufig kommen Argon und Helium zum Einsatz. Die reaktiven Teilchen wiederum führen im Umgebungsmedium zur Radikalbildung. Es wird zwischen direkten, indirekten und hybriden Plasmaquellen unterschieden. Während direkte Plasmaquellen den Patienten als Gegenelektrode zur Erzeugung des Plasmas nutzen (dielectric barrier discharge, DBD), besitzen indirekte Plasmaquellen zwei vom Patienten unabhängige Elektroden, zwischen denen das Plasma erzeugt wird und anschließend über einen Gasstrom zum Patienten transportiert wird (Metelmann 2016).

Plasma findet in der Medizin zunehmend breitere Anwendung dank seiner antibakteriellen Wirkung, seiner Fähigkeit die Mikrozirkulation anzuregen und somit

proliferationsfördernd auf gesunde Gewebe zu wirken (Kisch 2016) und seiner Apoptose befördernde Wirkung auf Krebszellen (Kim 2010b; Partecke 2012; Tanaka 2012). In der Endodontie ist insbesondere die antibakterielle Wirkung von Interesse. Für die Anwendung im Wurzelkanalsystem wurden einerseits Handstücke entwickelt, die einen Plasmastrahl in Richtung Wurzelkanal generieren und andererseits Plasmaquellen, die in den Wurzelkanal eingeführt werden können und so das Plasma direkt im Wurzelkanal produzieren (Liang 2015).

Es werden direkte und indirekte Wirkungen von Plasma unterschieden. Verantwortlich für die direkte antibakterielle Wirkung sind insbesondere Sauerstoff- und Stickstoffradikale (ROS, RNS), welche in der Umgebungsluft durch Interaktion mit dem Plasma entstehen, sowie UV-Strahlung und das elektrische Feld um die vom Plasma emittierten Ladungsträger (Metelmann 2016). Die Plasmabehandlung induziert oxidative Prozesse und elektrostatische Störungen sowie Beschädigungen an Zellwand und -membranen der Mikroorganismen, die Rasterelektronenmikroskopisch nachgewiesen wurden (Lerouge 2000; Zhou 2010; Handorf 2018b). Plasma wurde in verschiedenen Studien als wirksam gegen Bakterien, Pilze und Viren sogar in polymikrobiellen Besiedlungen beschrieben (Schaudinn 2013) und kann organisches Material von Oberflächen entfernen (Fricke 2012a). Aufgrund des unspezifischen Wirkmechanismus kann Plasma gegen multiresistente Keime eingesetzt werden (Hübner 2010; Matthes 2012; Klämpfl 2012). Resistenzentwicklungen scheinen nach Plasmaapplikation nicht induziert zu werden (Zimmermann 2012; Matthes 2014). Gramnegative Bakterien haben sich aber gegenüber Plasma als etwas empfindlicher gezeigt als grampositive (Lee 2006; Ermolaeva 2011).

Plasma ist ab einer Behandlungszeit von acht Minuten auch gegenüber Problemkeimen der Endodontie wie *E. faecalis* wirksamer als eine Ca(OH)_2 -Einlage (Pan 2013).

Neben der antimikrobiellen Wirkung verbessert die Plasmaanwendungen im Wurzelkanal die Benetzbarkeit des Dentins mit Flüssigkeiten und die Retention von Wurzelkanalfüllungen im Wurzelkanal (Stancampiano 2019; Bisag 2020).

Ein indirekter Plasmaeffekt ist die Ansäuerung von Wasser durch den Eintrag reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies. Im Wasser entstehen Nitrat- und Nitritverbindungen, sowie Wasserstoffperoxid, was infolge dessen als antimikrobielles Agens verwendet werden kann (Tasaki 2017).

Nebenwirkungen einer Plasmabehandlung wurden bislang nicht berichtet (Heinlin 2011). Eventuelle Schäden an menschlichen Zellen konnten entweder durch zelleigene Reparaturmechanismen korrigiert werden, oder führten zur Apoptose der Zelle (Wende 2014). Weder konnten Präkanzerosen (Metelmann 2013), noch Änderungen der Mikrohärtigkeit des Dentins infolge einer Plasmabehandlung beobachtet werden (Li 2015). Als Medizinprodukt zugelassene Plasmaquellen unterliegen Richtwerten für erzeugte Temperaturerhöhungen, Ableitstrom und UV-Strahlungsdosis.

Neben den genannten Vorteilen weisen moderne Plasmaquellen jedoch Limitationen auf, die für einen erfolgreichen Einsatz in der Endodontie überwunden werden müssen. Die Wirkung auf in extrazelluläre Matrix eingebettete Zellen ist im Vergleich zur Wirkung auf planktonische Zellen herabgesetzt (Das 2022). Eine weitere Herausforderung der Applikation von Plasma durch Handstücke ist die ungleichmäßige Verteilung der antimikrobiellen Wirksamkeit über die gesamte Wurzelkanaloberfläche. Im mittleren Kanaldrittel erreicht sie ihr Maximum (Üreyen Kaya 2014), vermutlich da die höchste Energiedichte im Abstand von 5 – 6 mm Entfernung von der Plasmaquelle erzielt wird (Kim 2010a; Kim 2010b). Die Keimreduktion in apikalen Regionen des Wurzelkanals ist somit herabgesetzt (Jiang 2009). Mikroorganismen dringen bis zu 800 µm ins Dentintubulsystem ein (Haapasalo 1987). Das für diese Studie verwendete Plasma erreicht jedoch lediglich eine radiale Ausbreitung von 30 µm (Bussiahn 2010). Auch wenn rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eine Reinigung der Dentintubuli zeigen konnten (Pan 2013; Üreyen Kaya 2014; Herbst 2015), nimmt die antimikrobielle Wirkung einer Plasmaquelle (kINPen®MED) mit zunehmender Dentinschichttiefe ab und unterliegt in 500-800 µm einer konventionellen Behandlung mit CHX (Herbst 2015).

2. Zielstellung

Die vorliegende *in vitro* Studie soll zur Klärung beitragen, welche Reinigungsleistung die Plasmaquelle kINPen08 betrieben mit einem Argon/ 1 % Sauerstoff Gemisch im Vergleich zu konventionellen desinfizierenden Lösungen gegen einen *C. albicans* Monospezies-Biofilm in Wurzelkanälen extrahierter humaner Zähne erzielen kann. In vorangegangenen Studien konnte die Plasmaquelle kINPen08 auf planen Oberflächen eine Wirksamkeit gegenüber Biofilmen des Problemkeims *C. albicans* unter Beweis stellen (Fricke 2012a). Jedoch wurde die Wirksamkeit des kINPen08 gegenüber *C. albicans* Biofilmen in humanen Wurzelkanälen nie untersucht. In der vorliegenden Studie wurde die Wirksamkeit von Plasma allein und von Plasma in Kombination mit jeweils einem von drei chemischen Standardtherapeutika der Endodontie (NaOCl 5,25 %, CHX 2 %, OCT) evaluiert.

Die Arbeitshypothese der vorliegenden Arbeit besagte erstens, dass Plasma der in dieser Studie verwendeten Plasmaquelle (kINPen08) eine höhere Keimreduktion innerhalb humaner Wurzelkanäle erreicht als die genannten chemischen Standardtherapeutika und zweitens, dass Plasma in Kombination mit chemischer Aufbereitung eine höhere Keimreduktion im Wurzelkanal erzielt als Plasma oder das jeweilige chemische Standardtherapeutikum allein.

3. Material und Methoden

Der experimentelle Aufbau der vorliegenden Dissertation ist in der anhängenden Veröffentlichung von Kerlikowski et al. 2020 beschrieben (Kerlikowski 2020). Vergleichbare Methoden zur Untersuchung der Wirkung von Plasma in Wurzelkanälen wurden zuvor angewandt (Pan 2013, Üreyen Kaya 2014 und Hufner 2017). Im Folgenden wird vertiefend auf Details eingegangen.

3.1. Präparation der Proben

166 menschliche Oberkieferfrontzähne und Unterkiefer-Prämolaren aus der Zahnbank des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universitätsmedizin Greifswald (Votum der Ethikkommission der Universitätsmedizin

Greifswald vom 30.03.2011, Reg.-Nr.: BB 30/11, siehe Anhang) wurden verwendet und vor Beginn des Experiments in 0,9 % NaCl-Lösung gelagert.

Die Eröffnung der Pulpenhöhle erfolgte mit einem zylindrischen Schwarzring-Diamanten Ø16 mm (Komet, Lemgo, Deutschland) und einem Langschaft – Hartmetallrosenbohrer Ø1,6 mm (Komet, Lemgo, Deutschland). Der Wurzelkanal wurde mittels K-Feilen (VDW, München, Deutschland) aufgefunden. Die Wurzelkanallänge wurde durch das Sichtbarwerden der Feile am Apex des Zahns bestimmt. Die Arbeitslänge entspricht der Wurzelkanallänge abzüglich eines Millimeters. Nach Bestimmung der Arbeitslänge wurde der Wurzelkanal zunächst manuell bis zur ISO-Größe 15 mit K-Feilen erweitert und anschließend bis zur ISO-Größe 06/30 mittels Nickel-Titanfeilen des Flexmaster-Systems (VDW, München, Deutschland) aufbereitet. Als Antrieb wurde der Endodontiemotor X-Smart™ (Dentsply, New York, USA) verwendet. Der Detritus wurde während der Aufbereitung intermittierend mittels 0,9 % NaCl-Lösung (B. Braun, Melsungen, Deutschland) entfernt.

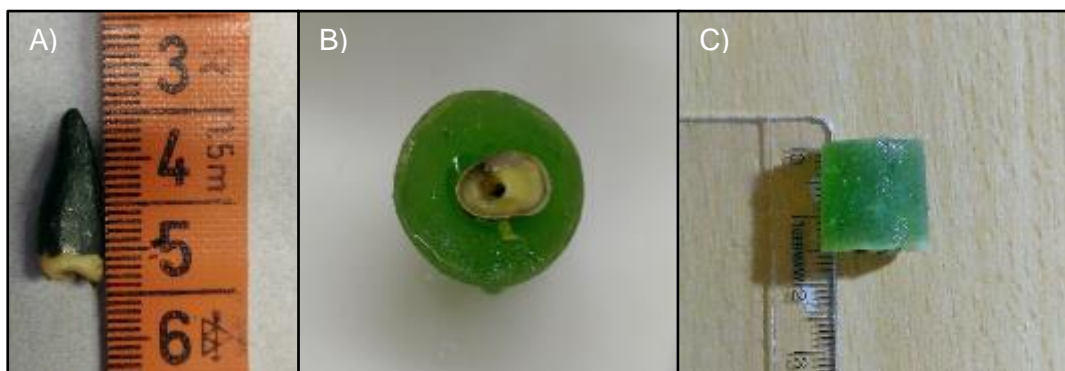


Abbildung I A) Mit Nagellack versiegelte Zahnwurzel, B) und C) Zahnwurzel im Kunststoffblock, zugeschnitten auf 15 mm Länge

Um Seitenkanäle und Apex zu verschließen wurden die Wurzeln der aufbereiteten Zähne mit Nagellack (basic, Interco Cosmetics GmbH, Wiesbaden, Deutschland) versiegelt (Abb. I A)). Zur besseren Handhabung wurden die Zähne senkrecht in einzelne Kunststoffsockel aus dem Kaltpolymerisat Technovit 4071 (Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) eingebettet und die Zahnwurzeln mit dem Sägemikrotom Leica SP 1600 (Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) auf eine einheitliche Länge von 15 mm gekürzt (Abb. I B) und C)).

Um die nach der Aufbereitung im Wurzelkanal verbliebene Schmierschicht zu entfernen, wurden die Zähne nach Anfertigung der Kunststoffblöcke in einem Ultraschallbad Elmasonic S 30 H (EMAG AG, Mörfelden-Walldorf, Deutschland) für 2

min mit 17 % EDTA Lösung (Universitätsapotheke Greifswald, Deutschland) behandelt, dann mit jeweils 10 ml 0,9 % NaCl-Lösung gespült und anschließend einer 3 % NaOCl-Lösung (Aug. Hedinger GmbH & Co. KG, Stuttgart, Deutschland) ausgesetzt. Das NaOCl wurde entsprechend DIN EN 1040 inaktiviert. Abschließend wurden die Zähne in Autoklavierbeutel verpackt und im Autoklaven 2540 EK (Tuttnauer, Maumee, USA) dampfsterilisiert. Eine Zusammenfassung des Aufbereitungsprozesses findet sich in Abb. II.

Zur Sterilitätsüberprüfungen wurden 10 Zähne für 7 Tage bei 37 °C im Inkubator BE400 (Mettler, Schwabach, Deutschland) mit einem im Autoklaven C8-V-Lab-HW/IDV (Webeco, jetzt Matachana, Selmsdorf, Deutschland) sterilisierten Universalnährmedium (YPD-Medium Y1375-250 g, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) bebrütet. Während der Inkubation befanden sich die Zähne in einer Zellkulturplatte (TPP, Trasadingen, Schweiz), welche mit Parafilm M (Bemis, Neenah, Wisconsin, USA) verschlossen wurde. Das Nährmedium wurde alle 24 h auf der Sicherheitswerkbank Herasafe KS 12 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) ausgetauscht. Nach der Inkubationszeit wurden mit jeweils 5 Papierspitzen der ISO-Größe 30 (Loser & Co GmbH, Leverkusen, Deutschland) durch 5-malige Auf- und Abbewegung innerhalb des Wurzelkanals pro Papierspitze Abstriche der Zähne genommen. Das Abstrichmaterial auf den Papierspitzen wurde in 1000 µl steriler isotoner Kochsalzlösung auf dem Vortexgerät VortexGenie 2 Rüttler (Scientific Industries, Inc., New York, USA) 5 min gevortext. Von der erhaltenen Suspension wurde anschließend ein Volumen von 100 µl auf Blutagar (Oxoid™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) ausgestrichen und für 2 Tage bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurde 1 ml der verwendeten Nährlösung auf Blutagar ausgestrichen und inkubiert.

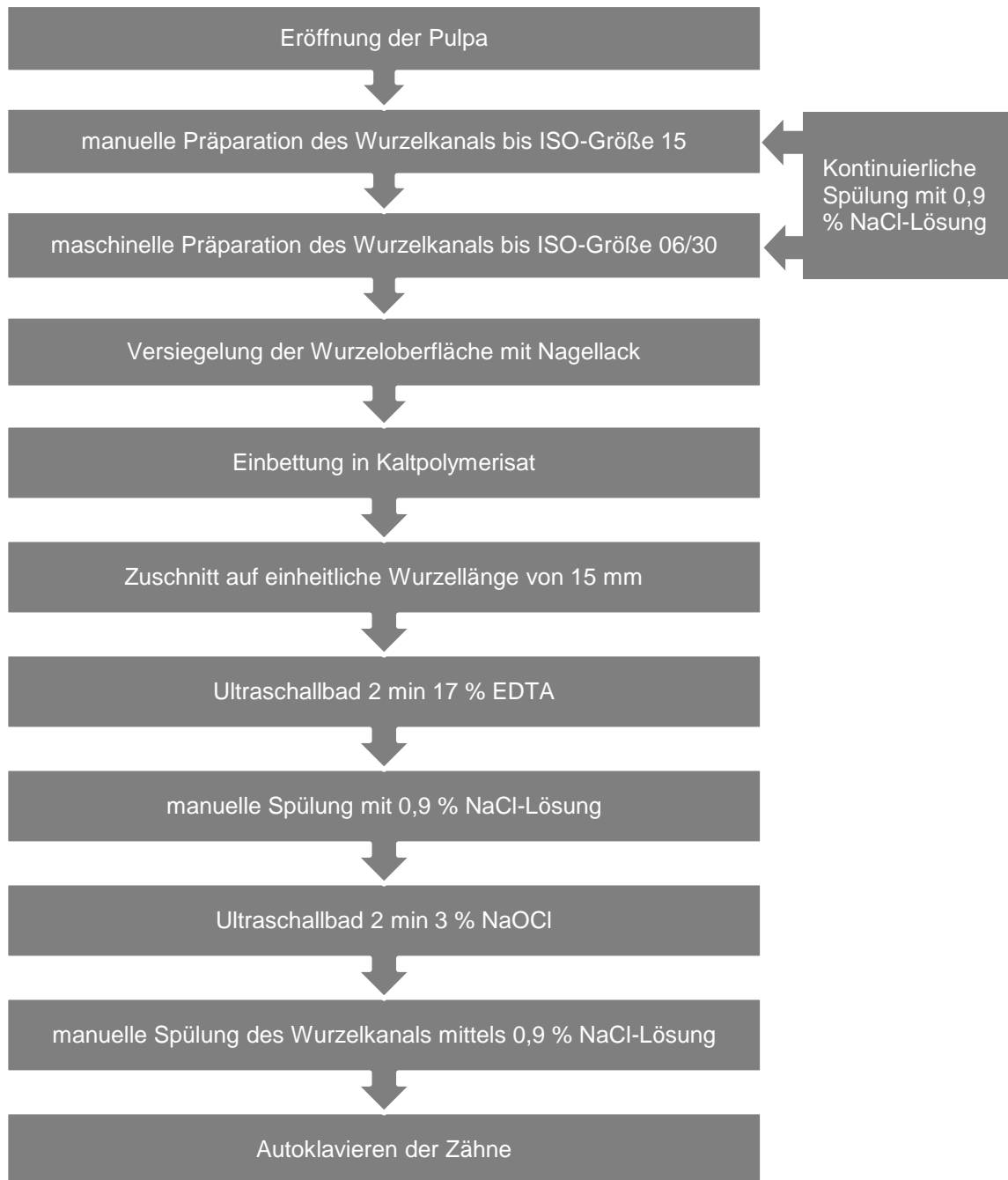


Abbildung II Fließschema Ablauf der Probenpräparation

3.2. Biofilmbildung

C. albicans ATCC 10231 (ATCC, Rockville, MD, USA) wurde zur Erstellung von Einzelzellkolonien auf Blutagar ausplattiert (Abb. III). Die Blutagarplatte wurde 2 Tage bei 37 °C bebrütet und anschließend bei 4 °C gelagert. Für jeden experimentellen Zyklus wurde jeweils eine Einzelkolonie entnommen um eine monoklonale *C. albicans* Suspension ($4 \cdot 10^7$ CFU/ml) in sterilisiertem YPD-Flüssigmedium herzustellen.



Abbildung III Einzelkolonien des Stamms ACTT 10231 *C. albicans*

Zur Etablierung eines Biofilms in den Wurzelkanälen wurden die Zähne in 24-well Zellkulturplatten gelagert, unter aseptischen Bedingungen jeweils vollständig bis zum Rand mit der Impflösung befüllt und für 7 Tage bei 37 °C bebrütet. Während dieser Phase wurde das Nährmedium täglich unter aseptischen Bedingungen gewechselt. Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Wurzelkanäle mit steriler 0,9 % NaCl-Lösung gespült, um planktonische Zellen aus dem Wurzelkanal zu entfernen. Die durchschnittliche Zellzahl innerhalb der Wurzelkanäle nach Inkubation betrug $6,67 \pm 0,33 \log_{10}$ CFU/ml.

3.3. Plasmaquelle

Für die vorliegende Studie wurde der kINPen08 (INP, Greifswald, Deutschland) verwendet. Die antimikrobielle Wirksamkeit dieser Plasmaquelle wurde bereits zuvor in verschiedenen Veröffentlichungen beschrieben (Fricke 2012a; Jablonowski 2013; Hüfner 2017). Die vorliegende Plasmaquelle wurde vom Leibniz Institut für Plasmaforschung und Technologie (INP) für Laborzwecke entwickelt.

Der beschriebene Aufbau des kINPen08 kann anhand von Abb. IV nachvollzogen werden.

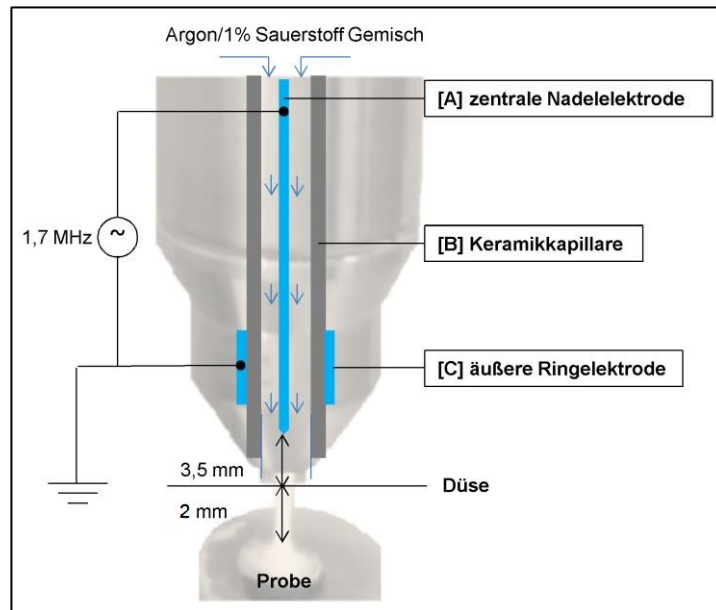


Abbildung IV Schematischer Aufbau des kINPen08 (Kerlikowski 2020)

Der kINPen08 ist eine indirekte Plasmaquelle und hat die Form eines Handstücks. Der Grundaufbau des kINPen08 besteht aus [A] einer zentralen Elektrode, an welche Wechselstrom angelegt wird, [B] einer geerdeten, äußeren Elektrode und [C] einem Dielektrikum (Keramikkapillare), welches beide Elektroden voneinander isoliert. Die zentrale Elektrode besitzt einen Durchmesser von 1 mm und läuft spitz aus. Die Spitze der Elektrode endet in 3,5 mm Entfernung von der Plasmaquellenöffnung (Düse). An die zentrale Elektrode wird eine Wechselspannung mit einer Frequenz von 1,7 – 2 MHz angelegt.

Die zentrale Elektrode befindet sich innerhalb einer Keramikkapillare, die eine Stärke von 0,2 mm aufweist und einem Innendurchmesser von 1,6 mm hat. Das zugeführte Gas, mit welchem die Plasmaquelle betrieben wird, wird entlang der zentralen Elektrode durch die Keramikkapillare geleitet. Die äußere Elektrode befindet sich innerhalb eines auswechselbaren Aufsatzes des Handstücks. In unserer Studie wurde der kINPen08 mit einem Aufsatz für den Betrieb mit Edelgas genutzt.

In unserem Versuchsaufbau wurde die Plasmaquelle mit einem Gemisch aus 99 % Argon (Alphagaz, Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland) und 1 % Sauerstoff (Alphagaz, Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland) betrieben. Der Gasfluss wurde auf 5 slm (Standard Liter pro Minute) festgelegt und

mittels des Multi Gas Controllers 647c (MKS Instruments Deutschland GmbH, München, Deutschland) durchgängig kontrolliert.



Abbildung V
Zahnprobe unter der
Plasmaquelle kINPen08

Die Plasmaquelle wird durch ein Fußpedal gezündet. Es wird ein Plasmajet erzeugt, dessen sichtbarer Anteil (Flamme) bei der Verwendung eines Argon/ 1 % Sauerstoff eine Länge von 8 mm aufweist. Die Düse der Plasmaquelle wurde in unserer Studie mit einem Abstand von 1 - 2 mm über der koronaren Öffnung des Wurzelkanals positioniert, sodass die Flamme in den Kanal gerichtet war (Abb. V).

3.4. Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau wurde bereits im, der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Artikel (Kerlikowski 2020) beschrieben, was jedoch aus Übersichtsgründen an dieser Stelle wiederholt werden soll.

Zur quantitativen Evaluation (Erfassung der \log_{10} CFU/ml) der antimikrobiellen Wirksamkeit des kINPen08 im Vergleich zu NaOCl, CHX und OCT wurden 150 Zähne (15 Gruppen mit je 10 Parallelen, Tab I) verwendet. Zusätzlich wurden 16 Zähne (ein Zahn pro Gruppe + eine Sterilkontrolle) behandelt, die der qualitativen Beschreibung potentieller Wirkung der Prozeduren auf die Beschaffenheit der Wurzelkanaloberfläche dienten (REM-Aufnahmen). Der Versuch wurde in vier identische Durchläufe unterteilt, die in vier aufeinander folgenden Wochen absolviert wurden. In jedem Durchlauf wurden die sterilisierten Zähne entsprechend der in Tab I aufgeführten Gruppen behandelt und anschließend entsprechend Abb. VI beprobt. Im ersten und zweiten Durchlauf wurden jeweils zwei Zähne pro Gruppe, im Durchlauf drei und vier wurden jeweils drei Zähne pro Gruppe behandelt.

Nr.	Gruppenbezeichnung	Behandlungsmethodik
1	NaCl	6 min Behandlungszeit mit 0,9 % NaCl Lösung
2	Gas	6 min Behandlungszeit mit nicht ionisiertem Argon/ 1 % Sauerstoff
3	NaOCl	6 min Behandlungszeit mit 5,25 % Natriumhypochlorit, anschließende Neutralisierung mit Inaktivatorlösung LTHTh (96.1 % YPD Flüssigmedium, 3 % Tween 80, 0.1 % Histidin, 0.3 % Lecithin, 0.5 % Natriumthiosulfat)
4	CHX	6 min Behandlungszeit mit 2 % Chlorhexidin, anschließende Neutralisierung mit 20 % Lipofundin MCT (B. Braun, Melsungen, Germany)
5	OCT	6 min Behandlungszeit mit Octenidindihydrochlorid, anschließende Neutralisierung mit 20 % Lipofundin MCT
6	Plasma	6 min Behandlungszeit mit Argon/ 1 % Sauerstoff Plasma
7	NaCl	12 min Behandlungszeit mit 0,9 % NaCl Lösung
8	Gas	12 min Behandlungszeit mit nicht ionisiertem Argon/ 1 % Sauerstoff
9	NaOCl	12 min Behandlungszeit mit 5,25 % Natriumhypochlorit, anschließende Neutralisierung mit Inaktivatorlösung LTHTh
10	CHX	12 min Behandlungszeit mit 2 % Chlorhexidin, anschließende Neutralisierung mit 20 % Lipofundin MCT
11	OCT	12 min Behandlungszeit mit Octenidindihydrochlorid, anschließende Neutralisierung mit 20 % Lipofundin MCT
12	Plasma	12 min Behandlungszeit mit Argon/ 1 % Sauerstoff Plasma
13	NaOCl + Plasma	6 min Behandlungszeit mit 5,25 % Natriumhypochlorit, direkt anschließend 6 min

		Behandlungszeit mit Argon/ 1 % Sauerstoff Plasma, abschließende Neutralisierung mit Inaktivatorlösung LTHTh nach Plasmaapplikation
14	CHX + Plasma	6 min Behandlungszeit mit Chlorhexidin, direkt anschließend 6 min Behandlungszeit mit Argon/ 1 % Sauerstoff Plasma, abschließende Neutralisierung mit 20 % Lipofundin MCT nach Plasmaapplikation
15	OCT + Plasma	6 min Behandlungszeit mit Octenidindihydrochlorid, direkt anschließend 6 min Behandlungszeit mit Argon/ 1 % Sauerstoff Plasma, abschließende Neutralisierung mit 20 % Lipofundin MCT nach Plasmaapplikation

Tabelle I Versuchsgruppen mit zugehörigen Behandlungsschemata

Die Wirksamkeit der Inaktivatorlösung LTHTh (96.1 % YPD Flüssigmedium, 3 % Tween 80, 0.1 % Histidin, 0.3 % Lecithin, 0.5 % Natriumthiosulfat) wurde gemäß DIN EN 1040 verifiziert (Böhm 2002; Gerten 2007). Die Wirksamkeit von Lipofundin MCT 20 % als Neutralisationslösung für OCT und CHX wurde von Khalil 2012 gezeigt (Khalil 2012).

Vor der Beprobung wurden die Wurzelkanäle abschließend mit 2 ml steriler 0,9 % NaCl Lösung gespült. Diese Prozedur diente der Verdünnung und Entfernung eventuell vorhandener Rückstände der Behandlungsagentien und deren Inaktivatoren. Die Flüssigkeit im Wurzelkanal wurde mit einer Einmalspritzenkanüle entfernt. Die anschließende Probenentnahme erfolgte mittels 5 Papierspitzen der ISO Größe 30 (Loser & Co, Leverkusen, Deutschland). Die Papierspitzen wurden 5 mal im Wurzelkanal auf und ab bewegt und anschließend in 1,5 ml Einmal-Reaktionsgefäße, gefüllt mit 1000 µl steriler 0,9 % NaCl Lösung, gegeben und auf dem VortexGenie 2 Rüttler (Scientific Industries, Inc., New York, USA) 5 min gevortext. Die entstandene Suspension wurde 5-mal in 10er Schritten mit steriler 0,9 % NaCl Lösung verdünnt (Abb. VII). Abschließend wurden jeweils 100 µl der verdünnten Suspensionen auf YPD-Agar ausplattiert und für 48 h bei 37 °C bebrütet (Abb. VI). Die CFU/ml wurden durch die Multiplikation der gezählten CFU jeder Platte mit dem Verdünnungsfaktor und dem Teilen des Produktes durch das ausplattierte Volumen in Millilitern (0,1 ml) errechnet. Anschließend wurde der Mittelwert aller zu einer Probe gehörigen Verdünnungsstufen gebildet. Der erhaltene

Wert wurde abschließend in den dekadischen Logarithmus (\log_{10} CFU/ml) transformiert (Gleichung 1).

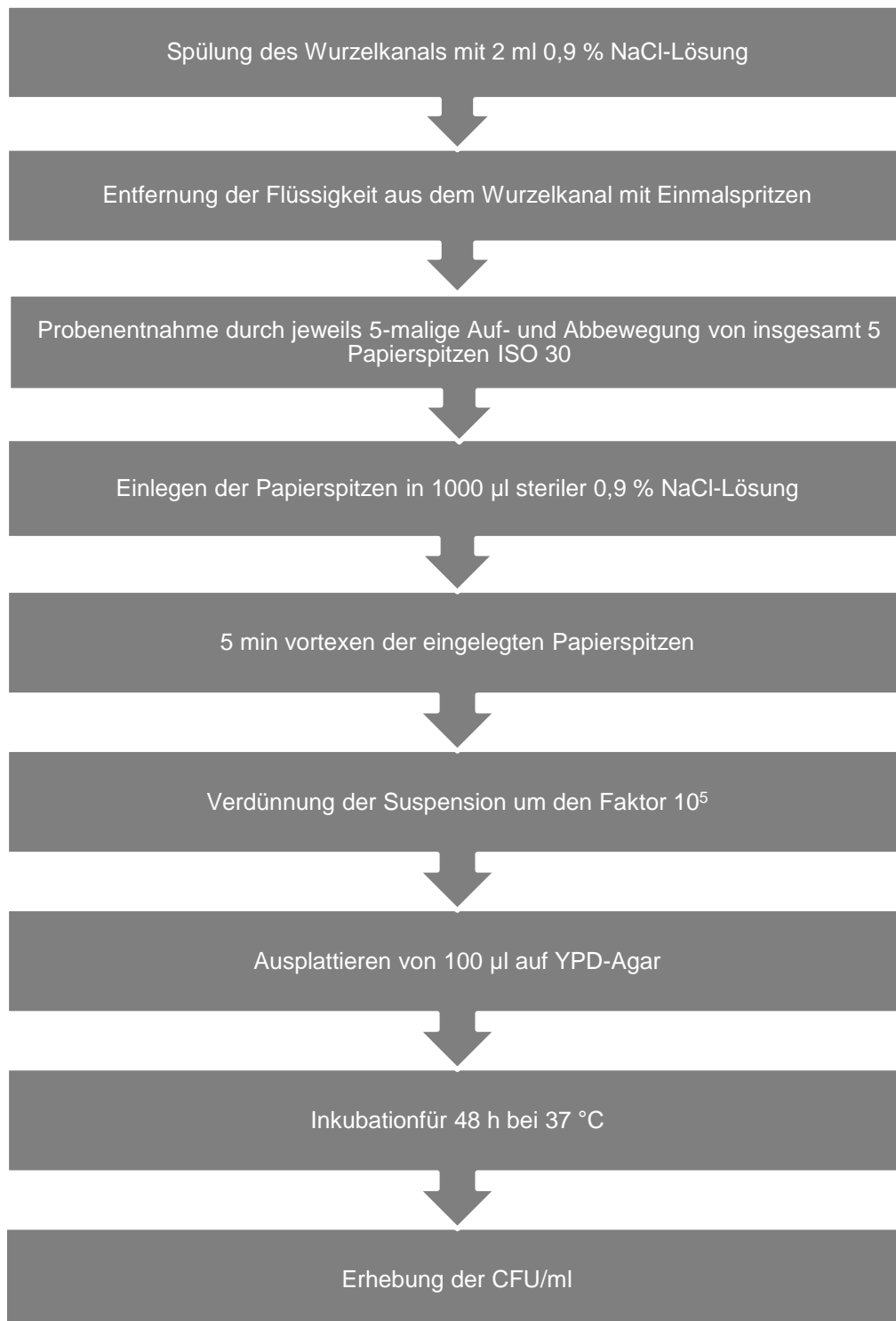


Abbildung VI Fließschema Ablauf Probenentnahme zur Erhebung der CFU/ml

$$(1) \quad \log_{10} CFU/ml = \log_{10} \frac{CFU \text{ der Platte } n \cdot \text{Verdünnungsfaktor } n}{\text{ausplattiertes Volumen [ml]}}$$

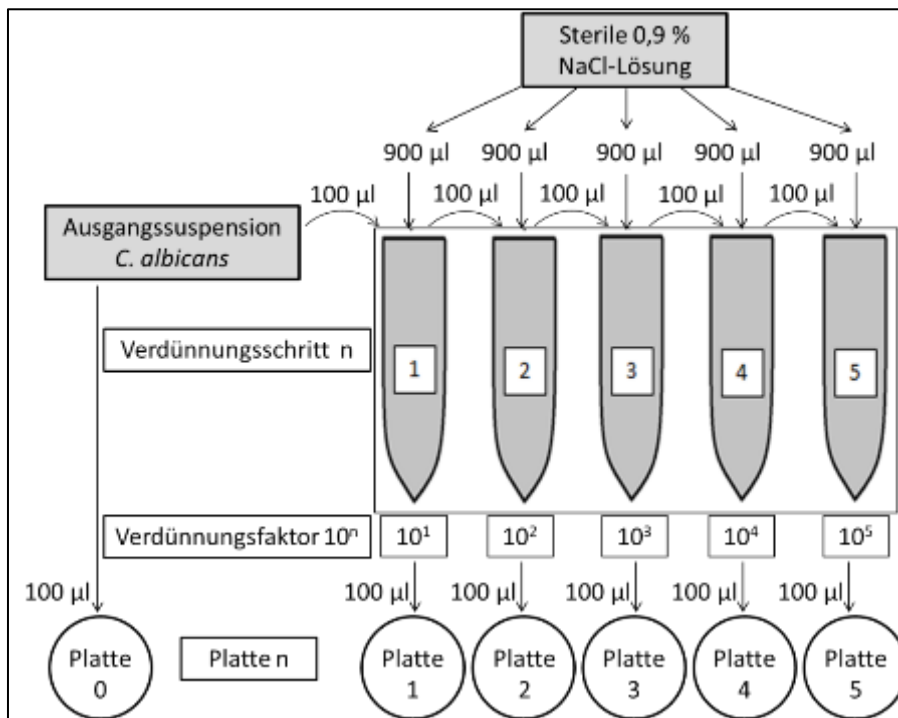


Abbildung VII Anfertigung der Verdünnungsreihen

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse mittels Erhebung der \log_{10} CFU/ml aus Wurzelkanalabstrichen sind bereits ausführlich im, der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Artikel (Kerlikowski 2020) beschrieben worden und werden im Folgenden nur kurz wiederholt. Die Ergebnisse der qualitativen Untersuchungen mittels REM werden vertiefend dargestellt.

4.1. Ergebnisse der quantitativen Analysen

Nach Prozeduren, in denen Plasma/O₂ zur Anwendung kam (Plasma/O₂ 6 und 12 min, kombinierte Behandlungen), konnten weniger \log_{10} CFU/ml nachgewiesen werden als in Gruppen in welchen kein Plasma angewendet wurde (Abb. VIII). Die erhobenen \log_{10} CFU/ml in den Gruppen Plasma/O₂ nach 6 und 12 min waren signifikant niedriger als die \log_{10} CFU/ml der Standardtherapeutika (NaOCl, CHX, OCT) bei gleichen Behandlungszeiten. Die Verlängerung der Behandlungszeit von 6 min auf 12 min Plasma/O₂ konnte keine signifikante Verminderung der \log_{10} CFU/ml bewirken. Ebenso konnte durch die Kombination von Standardtherapeutika und Plasma/O₂ (NaOCl + Plasma/O₂, CHX + Plasma/O₂, OCT + Plasma/O₂) keine

signifikante Reduktion der \log_{10} CFU/ml im Vergleich zu einer Einzelbehandlung mit 12 min Plasma/O₂ nachgewiesen werden. Kombinierte Behandlungen mit CHX + Plasma/O₂ und OCT + Plasma/O₂ zeigten sogar signifikant höhere \log_{10} CFU/ml als Plasma/O₂ 12 min. Gruppen, in denen Plasma/O₂ zur Anwendung kam, zeigten größere Standardabweichungen als Gruppen, in denen keine Plasma/O₂ verwendet wurde (Abb. VIII).

Die Streckung des Versuchs über vier Tage bedingte eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse in Abhängigkeit vom Versuchstag. Dabei zeigte sich, dass die Behandlungsergebnisse mit Plasmabeteiligung einer deutlich höheren Varianz in Abhängigkeit vom Versuchstag unterlagen, als Behandlungsschemata ohne Plasmaanwendung. Innerhalb ein und desselben Behandlungsschemas mit Plasmabeteiligung war die Varianz der Ergebnisse am selben Tag häufig klein, wohingegen die Varianz zwischen den verschiedenen Tagen oft groß ausfiel (Abb. IX).

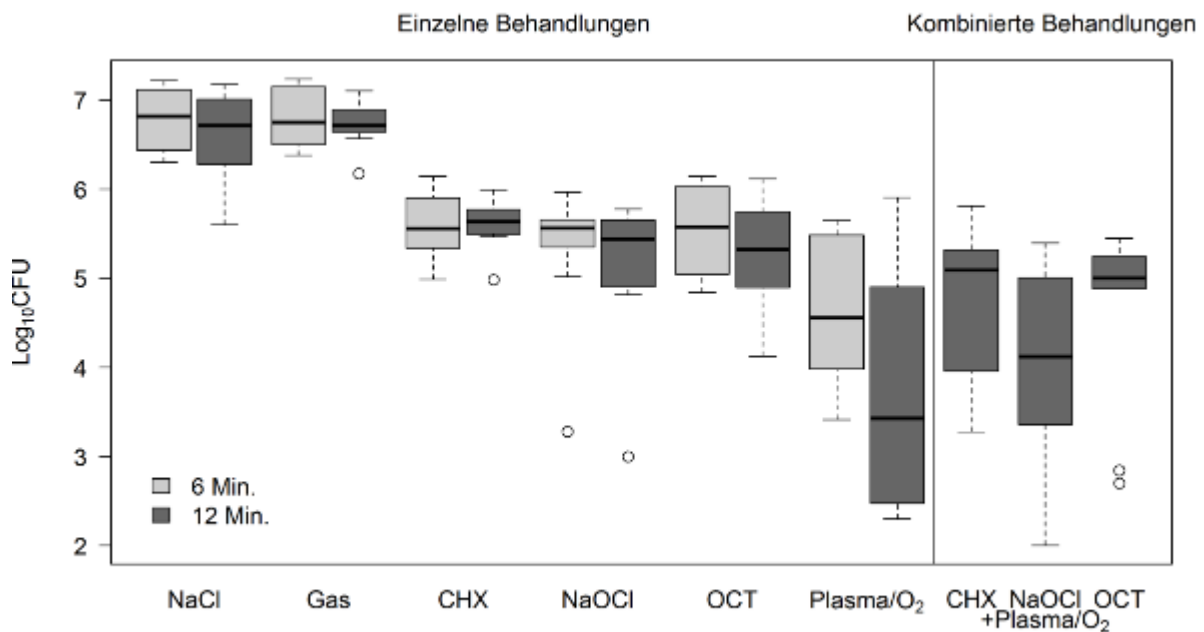


Abbildung VIII Box Plot der \log_{10} CFU/ml der einzelnen Behandlungen nach 6 und 12 min, sowie den kombinierten Behandlungen: NaOCl = Natriumhypochlorit, CHX = Chlorhexidin, OCT = Octenidin

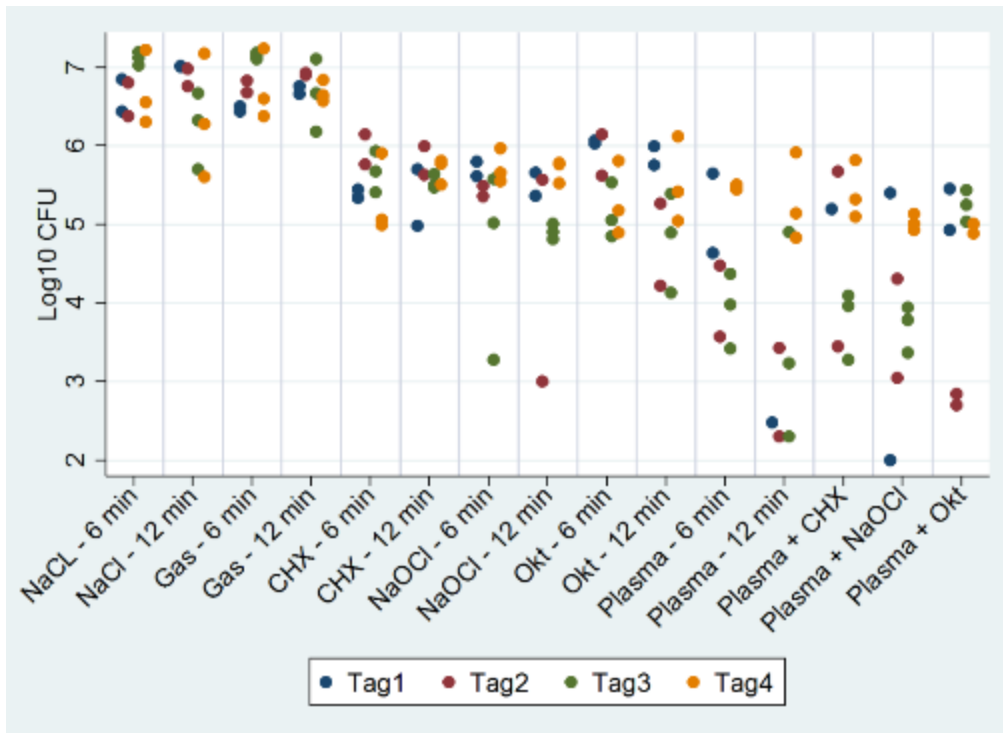


Abbildung IX Streudiagramm der Behandlungsergebnisse in logarithmierten koloniebildenden Einheiten (\log_{10} CFU) nach Behandlungstagen unterteilt: NaOCl = Natriumhypochlorit, CHX = Chlorhexidin, OCT = Octenidin

4.2. Ergebnisse der qualitativen Analysen

Es wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von jeweils einer zusätzlichen Probe jeder Versuchsgruppe in 20-, 500- und 2000-facher Vergrößerung angefertigt. Auf die Darstellungen in 20-facher Vergrößerung wird im Folgenden weitestgehend verzichtet, da anhand dieser Vergrößerung keine eindeutige Aussage zur mikrobiellen Besiedelung getroffen werden kann. Sie dienen als Übersichtsaufnahme über die Wurzelkanalmorphologie. Alle rasterelektronisch untersuchten Proben waren einkanlig und gerade verlaufend. Im Verlauf der Wurzelkanäle ist aus der Ferne eine ungleichmäßige Besiedelung der Wurzelkanaloberfläche mit dichten Konglomeraten nächstliegend extrazellulärer Substanz zu erkennen (Abb. X).

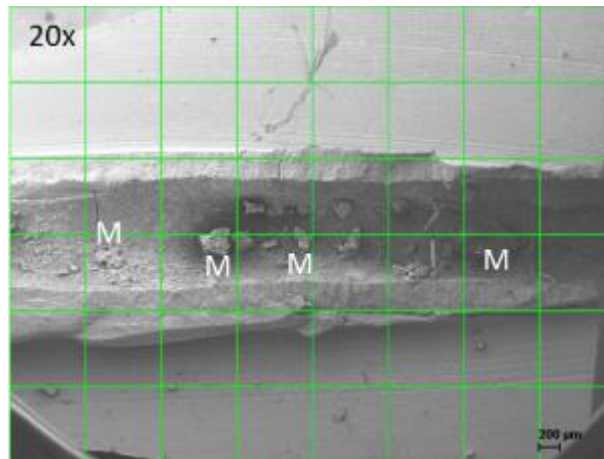


Abbildung X Versuchsgruppe 8. Gas 12 min, 20-fache Vergrößerung, M = Konglomerate extrazellulärer Matrix

Die Aufnahmen in 500- und 2000-facher Vergrößerung stammen aus dem Übergang des oberen zum mittleren Wurzelkanaldrittels. Das entspricht einer Tiefe von 3 – 5 mm oder dem 4. bis 6. Quadranten im am koronalen Zahnrands angelegten Raster in der Übersichtsaufnahme (Abb. X).

In den als Negativkontrollen dienenden Gruppen 1. NaCl 6 min (Abb. XI A) und B)), 2. Gas 6 min (Abb. XI C) und D)), und 8. Gas 12 min (Abb. XI E) und F)), war eine polymorphe Besiedelung mit überwiegend rundlich-ovalen, 3 bis 6 μm im Querschnitt messenden Einzelzellen, sowie Hyphenbildung nachzuweisen. In der Tiefe der Dentintubuli war ebenfalls eine Besiedelung durch Einzelzellen erkennbar. Extrazelluläre Substanz war partiell vorhanden, nahm jedoch optisch geschätzt kaum 10 % der abgebildeten Wurzelkanaloberfläche ein. Extrazelluläre Substanz kann im Rahmen des Präparationsprozesses für die REM-Aufnahmen zerstört werden (Ramage 2005). Ein mehrschichtiger Biofilm war in Gruppe 1. nicht zu erkennen und in den Gruppen 2. und 8. lediglich partiell zu erahnen.

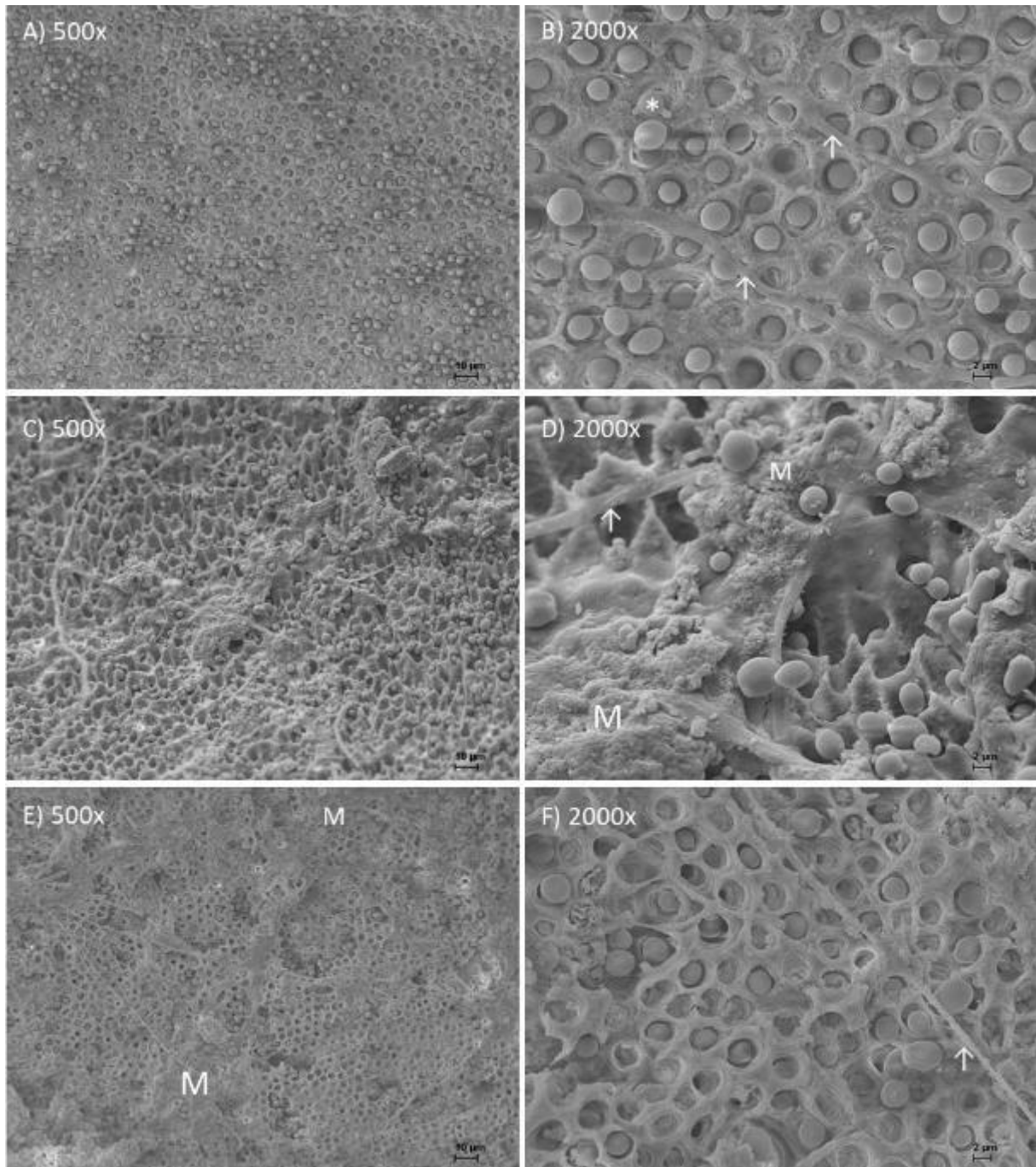


Abbildung XI Negativkontrollen A) und B) NaCl 6 min, C) und D) Gas 6 min, E) und F) Gas 12 min in 500- und 2000-facher Vergrößerung, M = extrazelluläre Matrix, Pfeil = Hyphe, * = ausknapende Hefezelle

In den REM-Aufnahmen der Gruppen 3. NaOCl 6 min (Abb. XII A) und B)) und 9. NaOCl 12 min (Abb. XII C) und D)) waren jeweils disseminierte Felder extrazellulärer Substanz zu erkennen. Optisch geschätzt nahmen diese Felder etwa 50 % der sichtbaren Wurzelkanaloberfläche in den Bildern beider Gruppen in 500-facher Vergrößerung ein. In der Tiefe der Dentintubuli und in Gruppe 9. seltener außerhalb der Dentintubuli unter der extrazellulären Matrix waren morphologisch intakte Einzelzellen auszumachen. Hyphen waren nicht eindeutig zu erkennen. In Gruppe 9.

waren fädige Strukturen wechselnden Durchmessers zu erkennen, die aufgrund der Größenschwankung von uns als extrazelluläre Substanz interpretiert wurden.

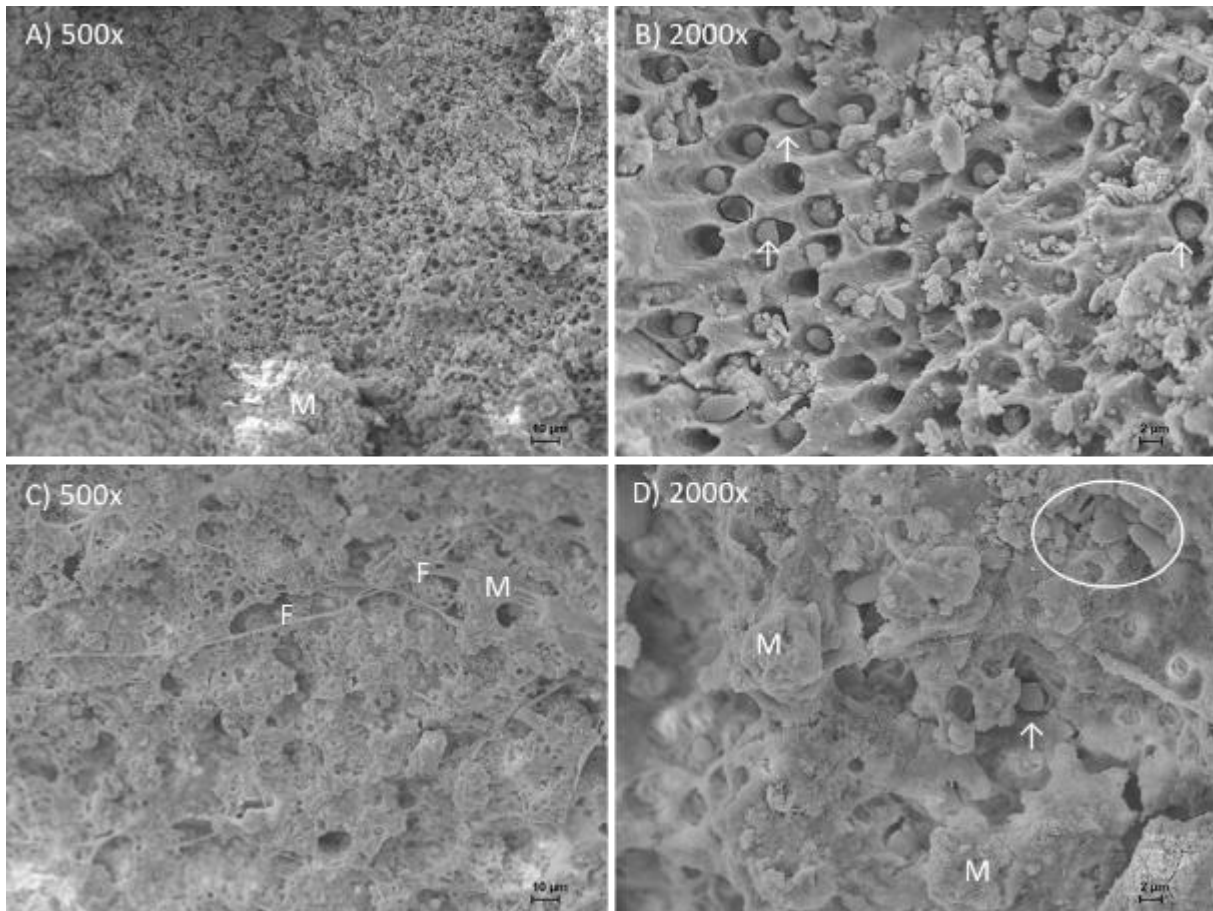


Abbildung XII A) und B) NaOCl 6 min, C) und D) NaOCl 12 min in verschiedenen Vergrößerungen, Pfeil = morphologisch intakte Einzelzellen in Dentintubuli, Ring = morphologisch intakte Einzelzellen unter extrazellulärer Matrix, M = extrazelluläre Matrix, F = fädige Ausläufer extrazellulärer Matrix

In den REM-Aufnahmen der Gruppen 4. CHX 6 min (Abb. XIII A) und B)) und 10. CHX 12 min (Abb. XIII C) und D)) waren Zellen mit faltenreicher Oberfläche erkennbar, deren Zellwand teilweise rupturiert erschienen. Die beschriebenen Veränderungen waren an Einzelzellen, sowie an Zellen mit Hyphenbildung nachweisbar (Abb. XIII D)). Jedoch waren ebenso morphologisch intakte Zellen zu finden. In Abb. XIII B) waren 49 der 101 sichtbaren Einzelzellen verändert. In Abb. XIII D) waren von 18 erkennbaren Zellen 9 verändert und 9 morphologisch intakt. Ebenfalls zu erkennen waren größere Ansammlungen extrazellulärer Matrix, die insbesondere in Abb. XIII C) die komplette Wurzelkanaloberfläche bedeckten.

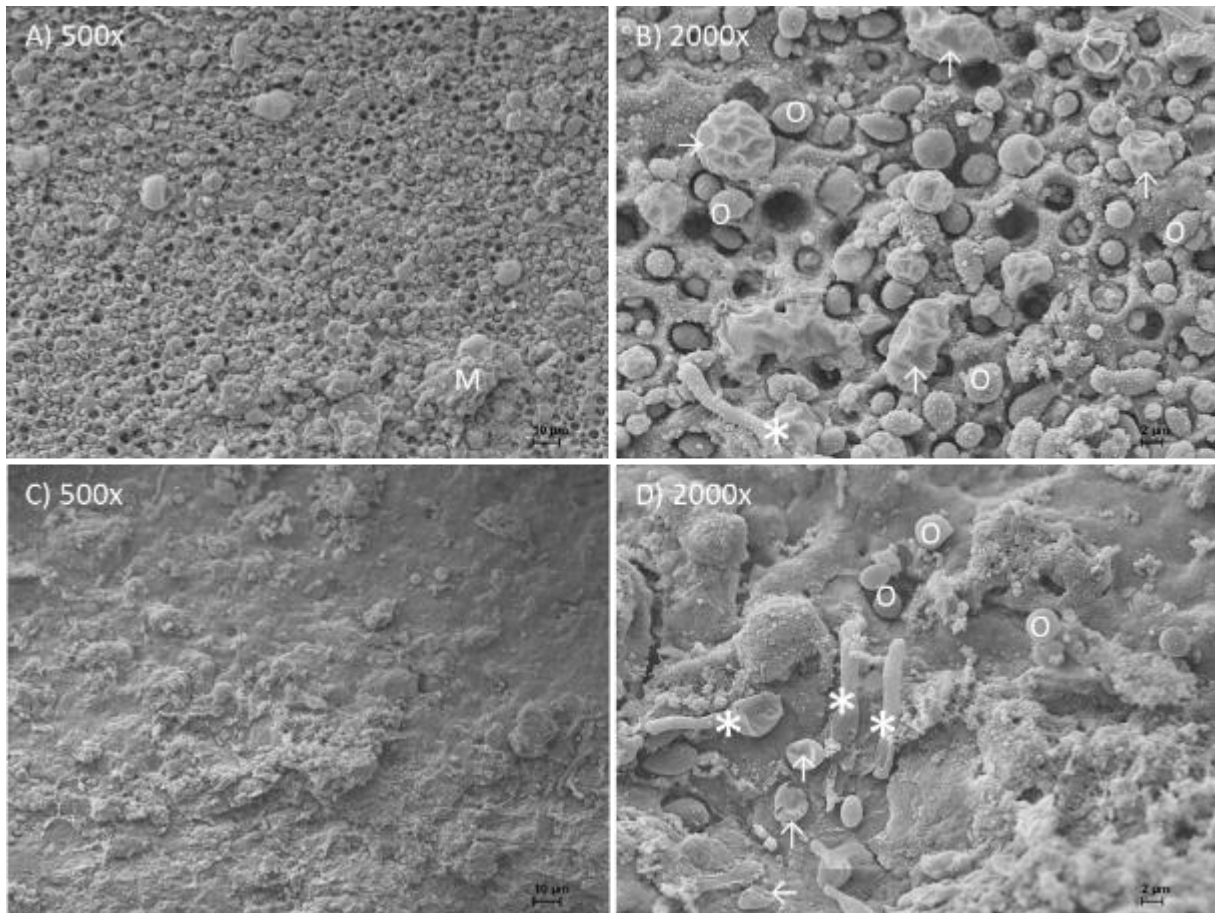


Abbildung XIII A) und B) CHX 6 min, C) und D) CHX 12 min in verschiedenen Vergrößerungen, Pfeil = veränderte Einzelzellen, O = morphologisch intakte Einzelzellen, M = extrazelluläre Matrix, * = veränderte Zellkörper mit Hyphenbildung

In Abb. XIV sind die behandelten Wurzelkanaloberflächen der Gruppen 5. OCT 6 min (Abb. XIV A) und B)) und 11. OCT 12 min (Abb. XIV C) und D)) dargestellt. Beide Zahnproben waren mit einer dichten Schicht extrazellulärer Matrix bedeckt, die in Abb. A) und C) fast die gesamte Wurzelkanaloberfläche zu verdecken schien. Es waren in beiden Zahnproben multiple Einzelzellen an der Wurzelkanaloberfläche, sowie in der Tiefe der Dentintubuli zu erkennen. In Abb. B) schienen die Zellen nicht morphologisch verändert und wiesen Hyphenbildung auf. In Abb. D) waren ein Viertel der erkennbaren Einzelzellen faltig verändert. Hyphenbildung war in dieser Abbildung nicht zu erkennen.

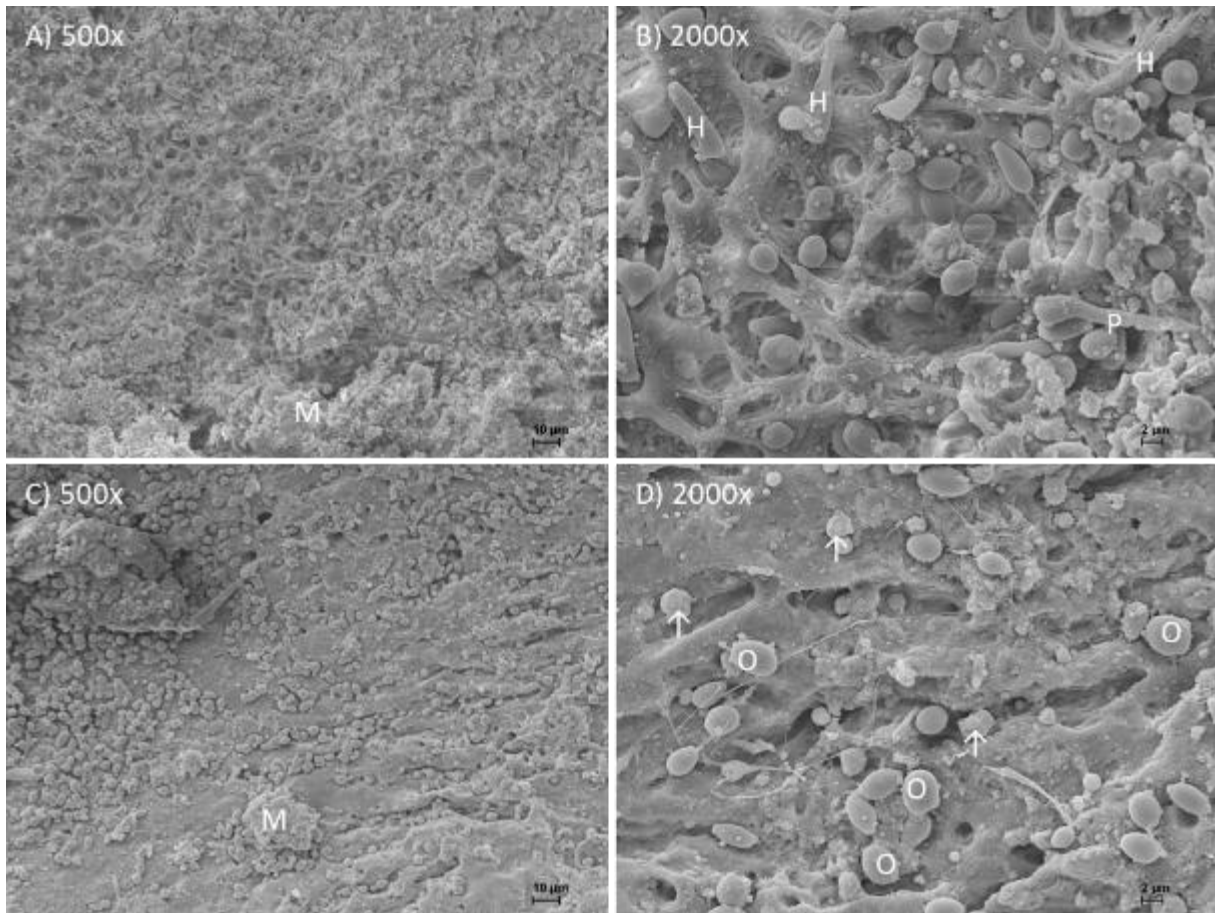


Abbildung XIV A) und B) OCT 6 min, C) und D) OCT 12 min in verschiedenen Vergrößerungen, Pfeil = veränderte Einzelzellen, O = morphologisch intakte Einzelzellen, M = extrazelluläre Matrix, H = Hyphenbildung, P = Pseudohyphae

Gruppe 6. Plasma 6 min (Abb. XV A) und B)) und 12. Plasma 12 min (Abb. XV C) und D)) zeigten unter unseren REM-Aufnahmen die geringste mikrobielle Besiedelung. In Abb. XV B) waren lediglich zwei Einzelzellen in der Tiefe der Dentintubuli zu erkennen. In Abb. XV A) war jedoch zu sehen, dass es sich hierbei um einen lokalen Effekt handelt. In koronal gelegenen Abschnitten waren disseminierte Einzelzellen und Hyphenbildung zu erkennen. Ebenso zeigte Abb. XV D) nur zwei klar erkennbare Einzelzellen. In Abb. XV C) war zu erkennen, dass sich bei der Abwesenheit von Biofilm ebenfalls um einen lokalen Effekt handelte, da große Areale der Wurzelkanaloberfläche von extrazellulärer Substanz bedeckt waren.

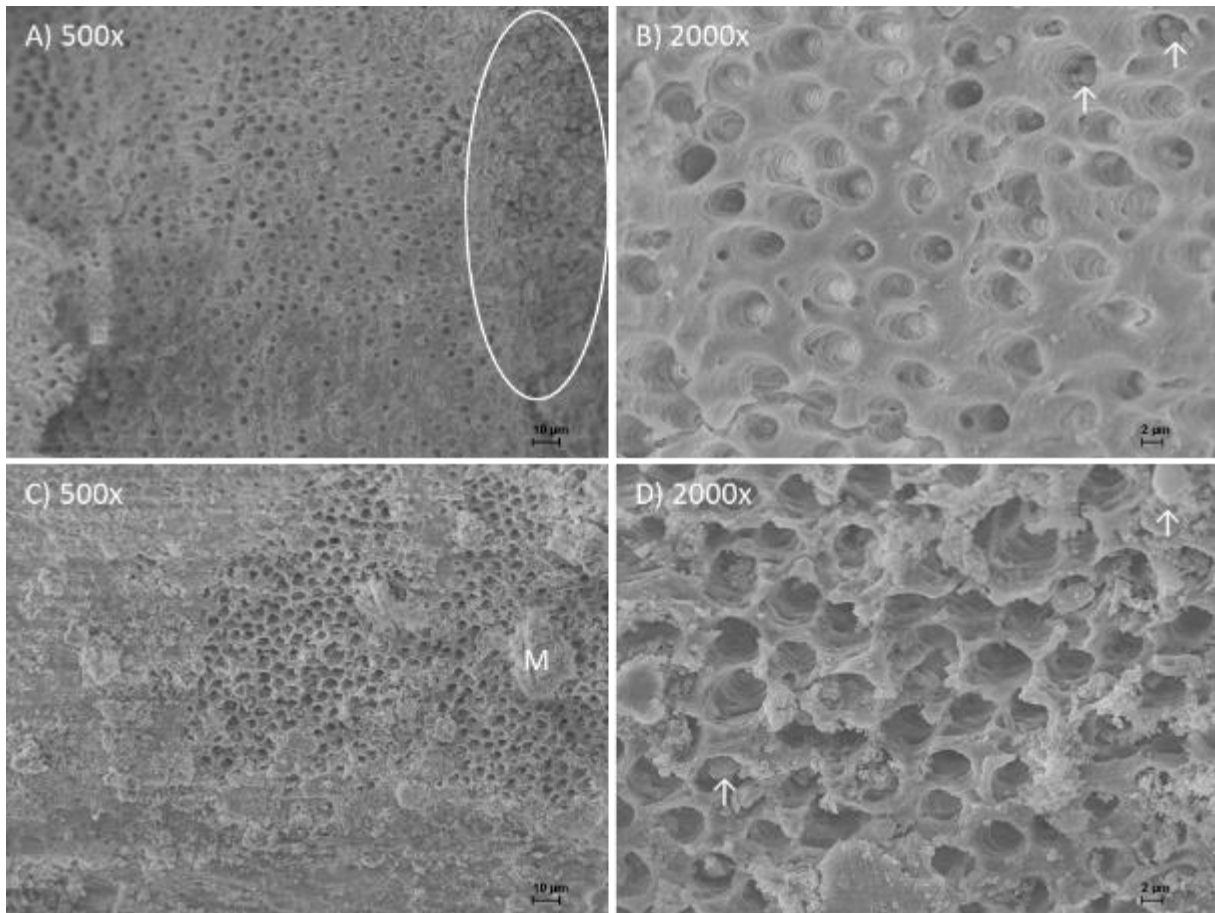


Abbildung XV A) und B) Plasma 6 min, C) und D) Plasma 12 min in verschiedenen Vergrößerungen, Pfeil = Einzelzellen, M = extrazelluläre Matrix, Ring = Areal mit multiplen Einzelzellen und Hyphenbildung

In Abb. XVI sind die behandelten Wurzelkanaloberflächen der Gruppen 13. NaOCl + Plasma (Abb. XVI A) und B)) 14. CHX + Plasma (Abb. XVI C) und D) und 15. OCT + Plasma (Abb. XVI E) und F)) dargestellt. Nach der Behandlung mit NaOCl + Plasma waren Hyphen und Einzelzellen erkennbar. Nach der Behandlung mit CHX und Plasma war neben unversehrten Einzelzellen und Zellen mit zerstörter Zellmembran auch extrazelluläre Matrix erkennbar. Die REM-Aufnahmen, die nach der Behandlung mit OCT + Plasma entstanden, waren zu großen Teilen mit einer Schicht kristallartiger extrazellulärer Matrix bedeckt unter der multiple Einzelzellen erkennbar waren.

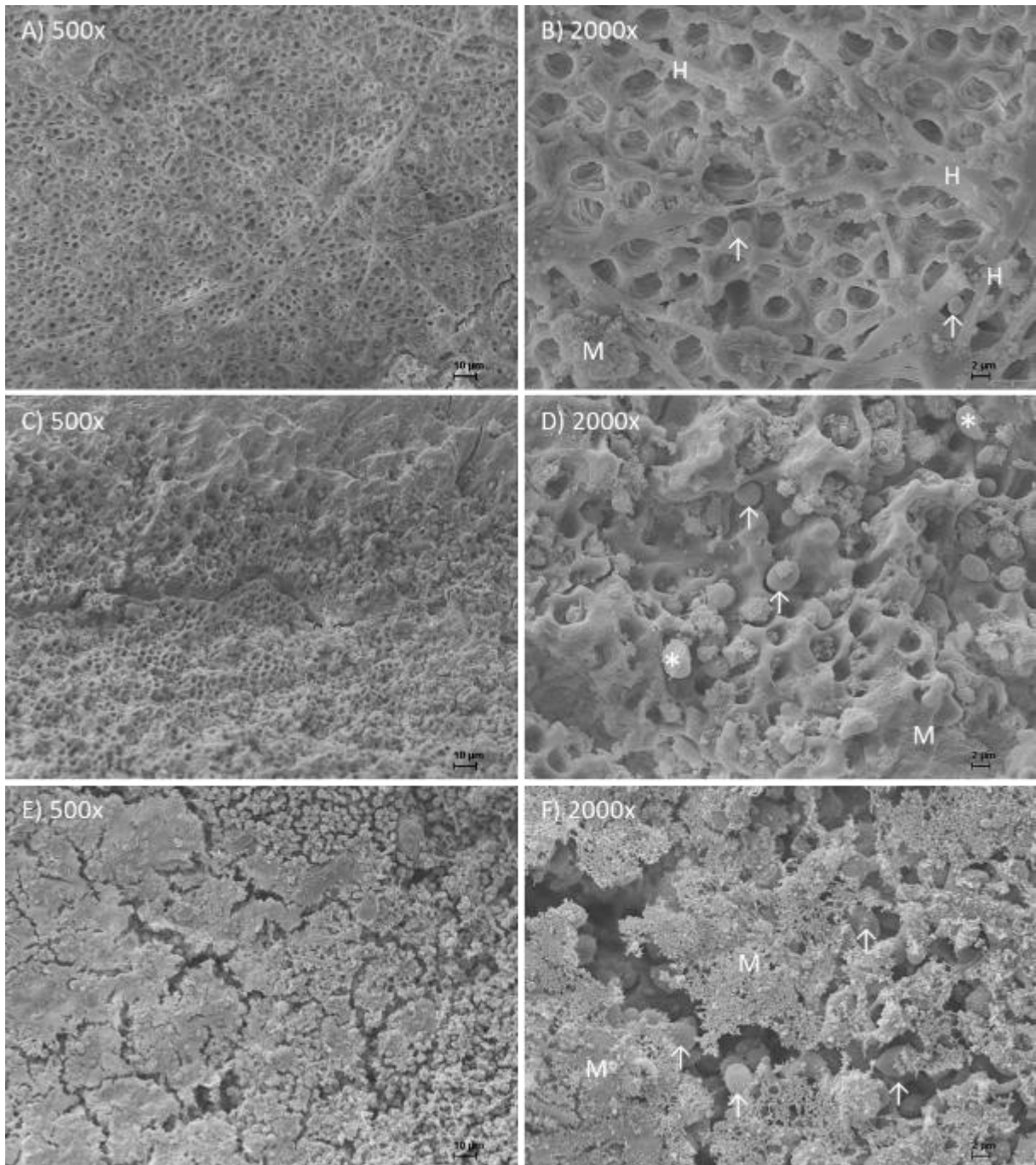


Abbildung XVI A) und B) NaOCl + Plasma, C) und D) CHX + Plasma, E) und F) OCT + Plasma in verschiedenen Vergrößerungen, Pfeil = Einzelzellen, M = extrazelluläre Matrix, H = Hyphen, * = Zellen mit zerstörter Zellmembran

Abb. XVII A) und B) bilden exemplarisch eine Sterilkontrolle ab. Sie zeigten jedoch eine deutliche mikrobielle Besiedelung mit Hyphenbildung und extrazellulärer Substanz. Abb. XVII C) und D) bilden exemplarisch Gruppe 7. NaCl 12 min ab. Hier wiederum fanden wir einen sterilen Wurzelkanal. Als naheliegende Erklärung schien uns an dieser Stelle eine Verwechslung der Proben der Sterilkontrolle und der

Behandlungsgruppe 7 als sehr wahrscheinlich. Unterstützt wird unsere Annahme von unseren quantitativen Analysen, die zuverlässig sterile Bedingungen in 10 als Sterilkontrolle dienenden Zähnen zeigen konnten und eine zuverlässige Besiedelung nach 7 Tagen Inkubationszeit in den Gruppen 1. NaCl 6 min, 2. Gas 6 min, 7. NaCl 12 min und 8. Gas 12 min bestätigten.

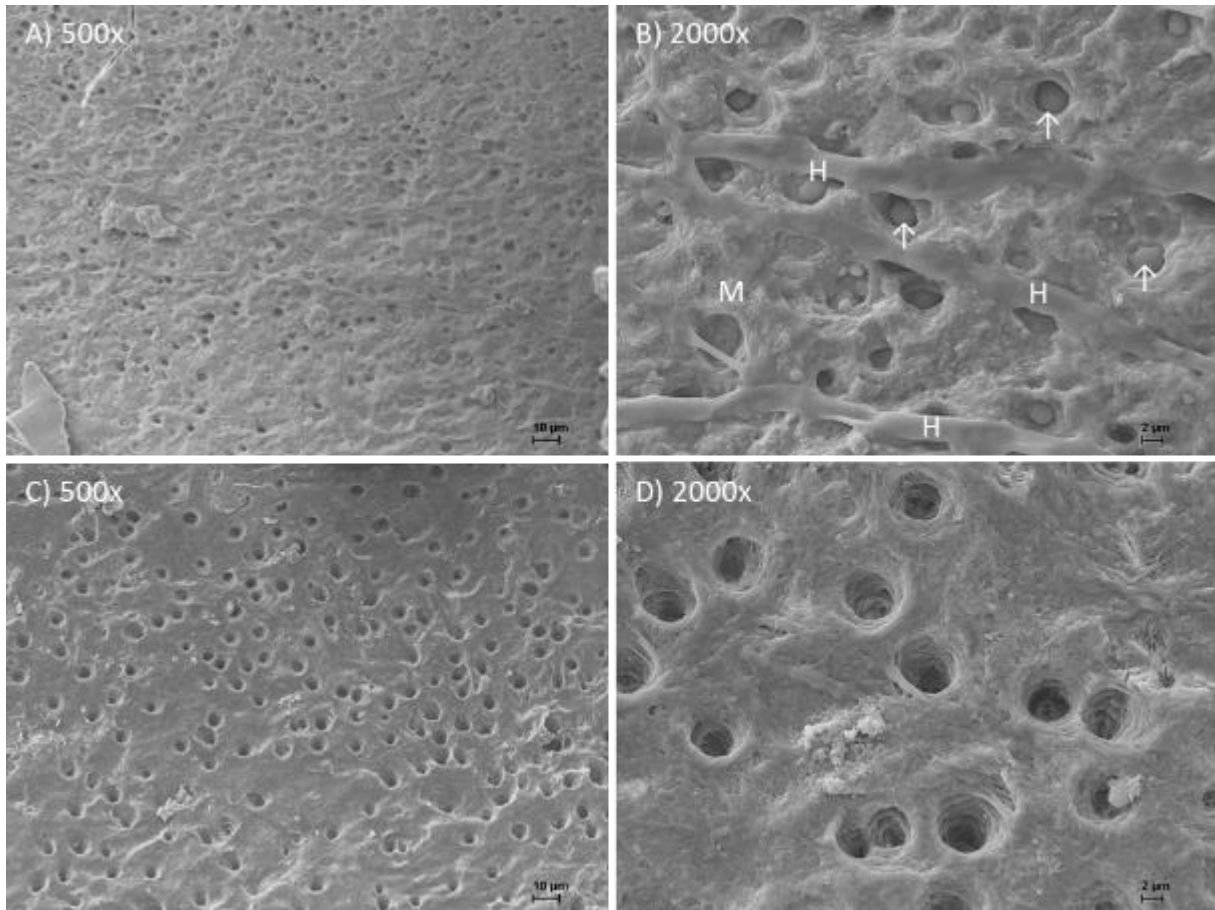


Abbildung XVII A) und B) Sterilkontrolle, C) und D) NaCl 12 min in verschiedenen Vergrößerungen, Pfeil = Einzelzellen, M = extrazelluläre Matrix, H = Hyphen

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht *in vitro* die Wirkung eines mit dem kINPen08 erzeugten Argon/ 1 % Sauerstoff Plasmas auf einen *C. albicans* Biofilm in humanen Wurzelkanälen. Die Ergebnisse dieser Studie sind bereits im Artikel Kerlikowski et al. 2020 diskutiert worden (Kerlikowski 2020). Im Folgenden sollen insbesondere die Methodik der Studie analysiert, und die Ergebnisse weiterführend beleuchtet werden.

5.1. Diskussion von Material und Methoden

Die Ergebnisse unserer Untersuchung sind lediglich unter den im Versuchsaufbau gewählten Bedingungen valide. Bereits die Verwendung eines anderen *C. albicans* Stammes kann veränderte Untersuchungsergebnisse zur Folge haben (Shinde 2012). So weisen direkt aus der Mundhöhle entnommene *C. albicans* Isolate im Vergleich mit Laborstämmen, wie sie in unserer Studie genutzt wurden, stärkere Resistenzmerkmale auf. Als ursächlich wird eine veränderte Zusammensetzung der Zellwandung angesehen (Sen 2000).

Mikrobiologisches Substrat und Modell

Die Anzucht der Mikroorganismen für zahnmedizinische Studien kann auf festen Nährmedien, Glas, Kunststoff, Titan oder in Zahnmodellen aus Kunststoff, sowie in bovinen oder humanen Zähnen erfolgen (Koban 2010; Klämpfl 2012; Jablonowski 2013; Hufner 2017). Es können entweder planktonische Zellen oder Biofilmmodelle, von einer einzelnen Spezies, oder einem Verbund verschiedener Mikroorganismen betrachtet werden (Koban 2013; Hufner 2017).

Die vorliegende Studie legte ein Monospezies Biofilmmodell in humanen Zähnen zu Grunde. Humane Zähne wurden gewählt, um eine der klinischen Situation möglichst entsprechende Versuchsumgebung zu imitieren. Die physikochemischen Eigenschaften des Untergrundes beeinflussen die Biofilmbildung von *C. albicans*. Auf Dentin ist die Fähigkeit Biofilme zu bilden im Vergleich zu künstlichen Wachstumsuntergründen, wie Polystyrol und Glas heraufgesetzt (Ning 2013). Dies könnte daran liegen, dass *C. albicans* das im Dentin enthaltenen Kollagen verstoffwechseln kann (Kaminishi 1986; Hagihara 1988). Trotzdem *C. albicans* in Monokultur nicht in der Lage ist Dentin eigenständig zu demineralisieren (Sampaio

2019), nehmen wir an, dass Kollagen durch die Behandlung der Zahnproben mit EDTA im Rahmen der Probenvorbereitung demineralisiert vorgelegen hat (Mohammadi 2013). Auch Kalzium, ein Bestandteil des Hydroxylapatits im Dentin, kann die Morphologie der Hefezellen beeinflussen. Holmes et al. 1991 beobachteten nach der Zugabe von Kalzium auf eine Zielkonzentration von 1 mM eine Rückbildung bereits ausgebildeter Hyphen (Holmes 1991).

Die von uns verwendeten Zähne wurden vor der Versuchsdurchführung in isotoner Kochsalzlösung gelagert. Die Dauer der Lagerung extrahierter Zähne, sowie das Lagerungsmedium beeinflussen jedoch die Zusammensetzung des Dentins. Die Lagerung in isotoner Kochsalzlösung erhöht den Natriumgehalt in der Zahnhartsubstanz (Secilmis 2011). Ein negativer Einfluss auf das Wachstum von *C. albicans* konnte bei einer 1-prozentigen NaCl-Lösung jedoch nicht über 3 Tage hinaus belegt werden (Combs 1968). Das Autoklavieren der Zahnpräparate beeinflusst ebenfalls die Eigenschaften des Dentins (Lee 2007). Dieser Arbeitsschritt ist jedoch zur Wahrung der Arbeitshygiene und insbesondere zur Sicherstellung des ausschließlichen Wachstums der von uns gewünschten Art *C. albicans* relevant (Kohn 2004; Curylofo-Zotti 2018). Alternativ können extrahierte Zähne durch eine 14 tägige Lagerung in 10 prozentiger Formaldehydlösung desinfiziert werden (Kohn 2004), wodurch die Eigenschaften des Dentins nicht beeinflusst zu werden scheinen (Lee 2007). Rückstände des Formaldehyds können jedoch das Wachstum des *C. albicans* Biofilms behindern (Thavarajah 2012; Tillmann 2015), weshalb unsere Arbeitsgruppe die Desinfektion durch Autoklavierung favorisierte.

Plasmawirkung auf unterschiedlichen Oberflächen

Die Wirkung von Plasmaquellen auf *C. albicans* wurde bereits auf unterschiedlichen Oberflächen nachgewiesen. Hierbei verwendeten die meisten Untersuchungen jedoch künstliche Wachstumsuntergründe (Jungbauer 2021). Auch die Wirkung des kINPen08 auf *C. albicans* Biofilme wurde zuvor lediglich auf planen Polystyrolplatten nachgewiesen (Fricke 2012a). In unserem experimentellen Aufbau werden Dentintubuli als anatomische Nischen für Mikroorganismen und die Röhrenform des Wurzelkanals bei der Beurteilung der Wirksamkeit des kINPen08 auf *C. albicans* mit einbezogen. Anatomische Besonderheiten und Therapieerschwerisse, wie Isthmen, Wurzelkanalramifikationen und Nebenkanäle wurden jedoch in unserem Modell nicht berücksichtigt. Da vorrangig die Wurzelkanalbehandlung mehrwurzeliger Zähne mit

häufig auftretenden Nebenkanälen scheitert (Iqbal 2007; Ahmed 2017), bietet die vorliegende Arbeit lediglich erste Hinweise in wie fern CAP als Therapieoption für endodontologische Problemzähne geeignet ist.

Biofilmbildung

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollte ein Monospezies Biofilm etabliert werden. Der verwendete Stamm ATCC 10231 ist zur Biofilmbildung befähigt (Hosida 2018). Die Parameter, die bestimmen in wie fern ein Biofilm zum Zeitpunkt des Experimentes vorgelegen hat, sind in wissenschaftlichen Arbeiten unterschiedlich definiert worden. Beispielsweise werden die Inkubationszeit und die Zelldichte als Parameter für die Etablierung eines Biofilms herangezogen (Maisch 2012). Ein *C. albicans* Biofilm konnte sowohl auf PMMA-Platten (Chandra 2001) als auch auf Dentinblöcken (Jacob 2020) nach 48 Stunden nachgewiesen werden. Eine Zelldichte von 1×10^7 CFU/ml wird ebenfalls als hinreichendes Indiz für eine Biofilmbildung angesehen (Jin 2003). Der eindeutige Nachweis eines *C. albicans* Biofilms erfolgt jedoch ausschließlich über die optische Darstellung von Hyphen und extrazellulärer Matrix (Ramage 2001). Beide Komponenten sind in den vorliegenden SEM Untersuchungen (Abb. XI) zu erkennen, doch es sticht ein Übergewicht von Hefeinzellen ins Auge. Eine Mehrschichtigkeit des Biofilms ist nicht eindeutig zu erkennen, da nur eine Aufsicht möglich ist. Ein reifer *C. albicans* Biofilm weist eine typische Schichtung auf, bestehend aus einer basal gelegenen, ein- bis zweilagigen Blastosporenschicht und einem von diesem ausgehenden, in extrazelluläre Matrix gebetteten, aufgelagerten Hyphennetz mit eingelagerten Hefezellen (Chandra 2001; Ramage 2001). Sen et al. 1997 zeigten jedoch, dass *C. albicans* lediglich auf mit einer Schmierschicht belegtem Dentin dichte Biofilme bildet (Sen 1997). Wie in Abb. XVII erkennbar ist, verfügten unsere Zahnproben aufgrund des Einsatzes von EDTA über keine Schmierschicht (siehe Absatz Präparationschemikalien und Inkubationsbedingungen).

C. albicans zeigte in vorangegangenen Studien im Hungerstoffwechsel ähnliche Verhaltensweisen wie in unserer Studie (Ning 2013). Obwohl die Nährstofflösung in den beimpften Zahnwurzeln alle 24 Stunden ersetzt wurde, ist nicht ausgeschlossen, dass es innerhalb dieser 24 Stunden durch das geringe zur Verfügung stehende Volumen im Wurzelkanal zur Nährstofflimitation kam. Einige Autoren vermuten, dass *C. albicans* Hefezellen im Hungerstoffwechsel stärker am Dentin haften (Uppuluri

2010) und daher schwerer bei Revisionen zu entfernen sind. *C. albicans* ist in der Lage über mindestens 6 Monate unter Nährstofflimitation zu überleben (Ning 2013). Sollten sich die Zellen innerhalb unseres Biofilms tatsächlich im Hungerstoffwechsel befunden haben, handelt es sich um einen von uns nicht beabsichtigten Effekt, der jedoch die Situation einer Revision gut wiedergibt.

Präparationschemikalien und Inkubationsbedingungen

Ursächlich für die mitunter schwächer als erwartet ausfallende Bildung eines Biofilms (Abb. XI) könnten die verwendeten Chemikalien und Inkubationsbedingungen gewesen sein. Sen et al. 2000 konnten einen starken fungiziden Effekt von EDTA auf verschiedene *C. albicans* Stämme nachweisen (Sen 2000). Der fungizide Effekt wird durch die Komplexbildung von für die Biofilmbildung relevanten Ionen erklärt (Casalini 2017). Klotz et al. 1993 zeigten, dass EDTA das Bindungsvermögen von *C. albicans* an Kollagen Typ I, wie es im Dentin vorkommt, herabsetzt (Klotz 1993). Zur Entfernung der Schmierschicht wurden unsere Zahnproben mit EDTA behandelt. Eine Entfernung der Schmierschicht ist im Rahmen einer Wurzelkanalbehandlung erwünscht, um die Wahrscheinlichkeit der Verblockung des Wurzelkanals, einer mikrobiellen Wiederbesiedelung (Sen 1997) oder einer Senkung der Haftfähigkeit des Füllungsmaterials im Wurzelkanal (Violich 2010) zu reduzieren. Somit sollte in einem primär, aber auch in einem wiederholt behandelten Wurzelkanal keine Schmierschicht der Kanaloberfläche aufliegen. Das daher verwendete EDTA wurde lediglich mit isotoner Kochsalzlösung entfernt und nicht neutralisiert, da im Wurzelkanal aufgrund des Überschusses von Kalziumionen davon auszugehen ist, dass das EDTA vollständig komplexiert und der fungizide Effekt somit nicht eintreten sollte. Das Autoklavieren einer EDTA-Lösung ist ein etabliertes Verfahren, weshalb angenommen wird, dass Autoklavieren, wie es im Verlauf unseres Experimentes durchgeführt wurde, keinen relevanten Einfluss auf die chemischen Eigenschaften einer EDTA-Lösung hat. Trotzdem kann nicht restlos ausgeschlossen werden, dass Reste der EDTA-Lösung wachstumshemmend auf den *C. albicans* Biofilm gewirkt haben.

Die verwendeten Standardtherapeutika NaOCl, CHX und OCT wurden mittels Neutralisationslösungen inaktiviert. Die entsprechenden Details sind dem Material- und Methodenteil zu entnehmen. Der Einfluss der Neutralisationslösungen auf das Wachstum von *C. albicans* wurde aktuell noch nicht untersucht. Ein kontinuierliches

Schütteln der Proben, sowie eine kontinuierliche Sauerstoffzufuhr können das Wachstum von *C. albicans* optimieren (Reeder 1989). Die Sauerstoffzufuhr ist möglicherweise durch den Verschluss der 24-well Platten kompromittiert worden. Auf den Verschluss konnte jedoch zur Wahrung der Asepsis und als Verdunstungsschutz nicht verzichtet werden. Ein aufwendigerer Versuchsaufbau hätte hier Abhilfe schaffen können.

Die Besiedelung des Wurzelkanals durch Befüllen mit Nährmedium ist eine häufig angewandte Technik zur Herstellung von Biofilmmodellen in humanen Zähnen. Swimberghe et al. 2019 analysierten 263 Arbeiten, die Biofilmmodelle in Wurzelkanälen etablierten (Swimberghe 2019). Wie auch in unserer Studie wurden in 48 % der untersuchten Studien ausschließlich die Wurzelkanäle beimpft, in 42 % lagerten die Zähne in Nährlösung, in zwei Arbeiten wurde eine Durchflusszelle genutzt und in weiteren zwei Studien wurden die Zähne direkt im Patientenmund gelagert (Swimberghe 2019). Wir favorisierten die Beimpfung des Kanals um eine hygienische Arbeitsweise zu ermöglichen. Jedoch kann es aufgrund des geringen Flüssigkeitsvolumens schneller zur Austrocknung des Zahnes zwischen den Medienwechseln aufgrund von Verdunstung, sowie zu Nährstofflimitationen oder Akkumulation von Stoffwechselprodukten kommen. Die in den inkubierten Wurzelkanälen gefundene Zelldichte von $6,67 \pm 0,33 \log_{10}$ CFU/ml ist vergleichbar mit Angaben anderer Arbeiten, die die Wirkung von Plasma auf *C. albicans* untersuchten (Doria 2015; Koban 2010; Handorf 2018b) und deutet darauf hin, dass die Inokulation der in dieser Studie verwendeten Wurzelkanäle vollumfänglich gelang.

Mikrobielle Beprobung

Der Zeitpunkt der mikrobiologischen Abstriche wurde unmittelbar anschließend an den Behandlungszeitraum gewählt, was in der Klinik dem Zeitpunkt des Verschlusses entspricht und daher in den meisten Veröffentlichungen favorisiert wird. Die Beprobungstechnik wiederum wird in verschiedenen Arbeiten unterschiedlich gewählt (Pan 2013; Schaudinn 2013; Üreyen Kaya 2014). Wir favorisierten die Entnahme der Mikroorganismen mittels Papierspitzen, da diese Entnahmetechnik gibt Aufschluss über die Anzahl der Mikroorganismen auf der Wurzelkanaloberfläche. In nicht zirkumferent aufbereiteten Kanälen wird durch den Abstrich mittels Papierspitzen unter Umständen nicht die komplette Wurzelkanaloberfläche

abgestrichen. Die geringe Streuung der Ergebnisse der quantitativen Analyse der Negativkontrollen zeigt eine Reproduzierbarkeit der verwendeten Probenentnahmemethode (Abb. VIII).

Die Erhebung der CFU/ml berücksichtigt lediglich vermehrungsfähige Zellen. Vitale, nicht vermehrungsfähige Zellen, wurden in unserer Untersuchung nicht beachtet. *C. albicans* ist grundsätzlich zur Ausbildung von Dauerformen, den Chlamydosporen, befähigt. Diese Form konnte jedoch nur sporadisch *in vivo* beobachtet werden (Jitsurong 1993). Welchen Einfluss diese morphologische Variante auf den klinischen Behandlungserfolg hat, ist nicht bekannt. Die Eindringtiefe der Desinfektiva in die Dentinkanäle konnte mit unserer Untersuchungsmethode ebenfalls nicht quantifiziert werden. Die REM-Aufnahmen geben hier lediglich einen qualitativen Anhalt. Zum Zweck der Untersuchung der Reinigungswirkung der Desinfektiva in der Tiefe der Dentintubuli werden in anderen Untersuchungen Dentinspäne entnommen (Üreyen Kaya 2014). Eine konkrete Angabe, welche Eindringtiefe Plasma in Dentintubuli hat, steht jedoch aktuell aus (Lata 2022). Nachteil der mechanischen Entnahme von Dentinspänen ist die mechanische Störung des Biofilms bei der Eröffnung des Wurzelkanals und der Entnahme der Späne. Da jedoch ein erhoffter Vorteil der Plasmabehandlung das potentielle Eindringen in Nischen ist, sollte in kommenden Studien eine konkrete Untersuchung der Tiefenwirkung von Plasma auf *C. albicans* im Dentin stattfinden und somit Aufschluss geben, inwiefern Plasma den konventionellen Spüllösungen in der Reinigung der Dentintubuli überlegen ist.

Plasmageometrie

Die Positionierung der Zahnproben unter der Plasmaquelle in unserem experimentellen Aufbau ist störanfällig, da sie manuell erfolgt. Dieser Umstand erklärt in unseren Untersuchungen möglicherweise die größere Streuung der Einzelergebnisse bei Mitverwendung von Plasma im Vergleich zu den Ergebnissen nach Einzelbehandlungen mit den Standardtherapeutika. Auch die Positionierung der Zahnprobe im Kunststoffsockel erfolgte manuell, womit die perfekt vertikale Ausrichtung des Wurzelkanals in Achse mit dem Plasmastrahl nicht garantiert werden kann. Vorangegangene Untersuchungen lösten dieses Problem durch speziell angefertigte Apparaturen, die aus einem Stift bestanden, der im Wurzelkanal positioniert wurde. Anschließend wurde eine parallel zum Stift ausgerichtete Gussform für den Kunststoffsockel über die Zahnprobe gestülpt, deren Boden im 90 °

Winkel zum Positionierungsstift orientiert war (Stancampiano 2019). Somit konnte garantiert werden, dass der Plasmastrahl nicht durch ungünstige Positionierung des Apex der Zahnprobe nicht erreichen kann. Diese Technik war zum Zeitpunkt der Durchführung unseres Experimentes nicht bekannt.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

Plasma versus Standardtherapeutika

Im Einsatz von Plasma gemeinsam mit den Standardtherapeutika zeigen unsere Ergebnisse eine Minderung der Wirkung des Plasmas beim Vorhandensein von Spüllösungen im Wurzelkanal und keine signifikante Verbesserung der keimreduzierenden Wirkung der Spüllösungen durch Kombination mit Plasma (Kerlikowski 2020). Eine direkte Kombination von Spüllösung und Plasma ist unseren Untersuchungsergebnissen zufolge daher zu vermeiden. Inwiefern eine Entfernung der Spüllösungen aus dem Kanal mittels Papierspitzen ausreichend ist, müssen weitere Untersuchungen klären.

Im separaten Einsatz von Plasma und Standardtherapeutika war im Rahmen unserer Studie, die Keimreduktion nach 6 und 12 min Plasmabehandlung signifikant höher als nach einer entsprechenden Behandlungszeit mit den Standardtherapeutika. Auffällig ist jedoch eine geringe Keimreduktion in unserer Studie durch die Standardspüllösungen (Abb IX). Eldeniz et al. 2015 erreichten eine vollständige Elimination von *C. albicans* Stamm ATCC 90028 aus humanen Wurzelkanälen nach 3-minütiger Behandlungszeit mit jeweils 5 ml NaOCl 5,25 %, OCT und CHX 2 % (Eldeniz 2015). Hierbei handelte es sich um eine Reduktion um 4 Logarithmusstufen während im Rahmen unseres Versuchs bei gleicher Konzentration der Spüllösungen lediglich Reduktionen von $-1,46 \log_{10}$ CFU/ml (NaOCl), $-1,22 \log_{10}$ CFU/ml (CHX) und $-1,27 \log_{10}$ CFU/ml (OCT) nach jeweils 6-minütiger Anwendung erreicht wurden (Abb. VIII, Kerlikowski 2020). Allerdings unterschied sich die Methodik von Eldeniz et al. 2015 in wichtigen Aspekten von der Unsrigen (Eldeniz 2015). Im Gegensatz zu Eldeniz et al. 2015, die $4.04 \pm 0.52 \log_{10}$ CFU in der Positivkontrolle nachwies, war in unserem Experiment die Keimlast im Wurzelkanal deutlich höher ($6,67 \pm 0,33 \log_{10}$ CFU/ml). Zwar zeigten die Positivkontrollen in den von Eldeniz et al. 2015 erstellten REM Aufnahmen eine dichte Besiedlung mit Hefezellen, jedoch kann laut Jin et al. 2003 erst ab einer Zelldichte von 10^7 CFU/ml von einer sicheren Biofilmbildung

ausgegangen werden (Jin 2003). Auch können einzelne REM-Aufnahmen nicht als repräsentativ für den gesamten Wurzelkanal angenommen werden.

Planktonische Zellen können durch die mechanische Wirkung einer von Eldeniz et al. 2015 durchgeführten Spülung aus dem Wurzelkanal entfernt worden sein. Auch wurden die Wurzelkanäle, im Gegensatz zu unserer Studie, vor der Probennahme mit Papierspitzen manipuliert, wodurch Keime von der Wurzelkanaloberfläche entfernt worden sein können. Weiterhin entfernten Eldeniz et al. 2015 die apikalen 3 mm der Zahnwurzeln. Somit reduzierten sie das apikale Wurzelkanaldelta, welches als Nische für Mikroorganismen dienen und somit die Reinigungsleistung der Spüllösungen mindern kann. Im Zuge dieser Eingriffe, lagen die Ergebnisse von Eldeniz et al. 2015 erwartbar am oberen Ende des Spektrums der *in vitro* in humanen Zähnen beobachteten Keimreduktionsleistung der Standardtherapeutika auf *C. albicans*.

Die Einwirkzeit der Standardtherapeutika spielt eine entscheidende Rolle. Elakanti et al. 2015 konnten nach 1 min keine signifikante Keimreduktion durch jeweils 3 ml NaOCl 5,25 % (von 3,33 log₁₀ CFU auf 2,46 log₁₀ CFU) und CHX 2 % (von 3,33 log₁₀ CFU auf 2,37 log₁₀ CFU) feststellen (Elakanti 2015). Ebenso beobachteten Onay et al. 2010 nach einer einminütigen Spülung mit 2 ml NaOCl 5,25 % lediglich eine Keimreduktion von $4,14 \pm 0,66 \cdot 10^6$ CFU/ml auf $2,48 \pm 0,9 \cdot 10^5$ CFU/ml (Onay 2010). Chandra et al. 2010 behandelten ebenfalls Wurzelkanäle für 1 Minute mit 2 ml Spüllösung und erreichte eine Endkeimlast von 4,125 log₁₀ CFU/ml nach einer Behandlung mit NaOCl 5,25 % und 4,314 log₁₀ CFU/ml nach einer Behandlung mit CHX 2 % (Chandra 2010). In dieser Studie ist keine präzise Startkeimlast angegeben, sodass die Desinfektionsleistung nicht abschließend beurteilt werden kann. In allen Studien wurde der Apex versiegelt. Tay et al. 2010 wiesen darauf hin, dass ein apikaler Stopp die Materialentfernung aus dem Wurzelkanal negativ beeinflusst (Tay 2010).

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Spoorthy et al. 2013 gehen wir davon aus, dass in unserer Studie die Spüllösungen die apikalen Bereiche der Wurzelkanäle nicht erreichten (Spoorthy 2013; Kerlikowski 2020). Ursächlich nehmen wir eine zu starke Verdunstung und somit eine Austrocknung des Dentins an, was die sekundäre Benetzung des Dentins mit Spüllösungen erschwerte. Im Unterschied zu den genannten Studien wurden in unserem Versuchsaufbau die Zähne nicht kontinuierlich gespült und während der Einwirkzeit der Spüllösungen nicht

instrumentiert, wodurch die Penetration der Flüssigkeit in die Tiefe des Wurzelkanals sehr wahrscheinlich herabgesetzt war. Zusätzlich zu einer reduzierten chemischen Desinfektion in der Tiefe, entfielen in unserer Studie mechanische Effekte durch die Spülung.

Plasma erzielte in unserer Studie eine Keimreduktion um $-2,71 \log_{10}$ CFU/ml auf $3,84 \pm 1,38 \log_{10}$ CFU/ml nach 12 min Behandlungszeit (Kerlikowski 2020). Unsere im Mittel erreichte Keimreduktion lag etwa 2 Logarithmusstufen über der Schwelle von $2 \log_{10}$ CFU/ml Restkeimlast, die für den klinischen Behandlungserfolg keinen Einfluss mehr hat (Peters 2002). Es ist jedoch zu bedenken, dass die desinfizierende Wirkung von Plasma in unserer Studie eine starke Streuung aufwies an deren unteren Ende Restkeimlasten zwischen 2 und $3 \log_{10}$ CFU/ml im Wurzelkanal erreicht wurden (Abb. IX). Als Grund für die starke Streuung gehen wir davon aus, dass die ungünstige manuelle Positionierung der Plasmaquelle über dem Wurzelkanal zu einer unzuverlässigen Penetration durch den Plasmajet führte (Kerlikowski 2020). Falls dieses, bei der intraoralen Anwendung in ähnlicher Weise bestehende Problem gelöst werden könnte, deuten unsere Beobachtungen darauf hin, dass Plasma das Potential besitzen könnte, reproduzierbar eine für den klinischen Erfolg hinreichende Reduktion der Keimlast zu erreichen.

Behandlungsdauer

Unsere Untersuchungsergebnisse legen nahe, dass eine 12-minütige Plasmaanwendung keinen signifikanten Vorteil gegenüber einer 6-minütigen Anwendung generiert (Kerlikowski 2020). Die Behandlungsdauer von 6 min pro Wurzelkanal ist jedoch im Kontext einer, unter Umständen zeitaufwändigen Revision kritisch zu bewerten, da insbesondere Zähne mit drei und mehr Kanälen revisionsbedürftig sind (Iqbal 2007; Ahmed 2017) und somit eine zusätzliche Behandlungszeit von ≥ 18 min entstünde. Es konnten jedoch in früheren Versuchsansätzen durch Plasma, erzeugt mit verschiedenen kINPen Plasmaquellen, ähnliche Reduktionsraten in kürzerer Zeit generiert werden. Auf Acrylharzplatten erzielte ein argonbetriebener kINPen bereits nach 1 min eine Keimreduktion von $1,7 \log_{10}$ CFU/ml (Delben 2016). Handorf et al. 2018a erreichten mit dem kINPen09, betrieben mit 99,99 % Argon, auf in 96-well Platten gewachsenen *C. albicans* Biofilmen nach 5 min einen Reduktionsfaktor von $2 \log_{10}$ CFU/ml (Handorf 2018a). Unter Umständen kann auch in Wurzelkanälen die Behandlungszeit weiter verkürzt

werden. Im Gegensatz zu klassischen Spüllösungen, die effektiv und zeitsparend parallel zur mechanischen Aufbereitungen angewendet werden, kann die von uns verwendete Plasmaquelle kINPen08 nicht zeitgleich mit anderen Behandlungsschritten betrieben werden.

REM – Aufnahmen

REM-Aufnahmen, erstellt im Rahmen von Untersuchungen zur Wirkung verschiedener Plasmaquellen auf *E. faecalis* Biofilme konnten trotz nachgewiesener Reduktion der vermehrungsfähigen Zellen optisch keine Entfernung des organischen Materials vom Substrat nachweisen (Pan 2013; Li 2015; Herbst 2015). In allen drei Studien handelte es sich bei den verwendeten Plasmaquellen um Plasmajets, wobei auch der kINPenMED zur Anwendung kam (Herbst 2015). Auch die Entfernung von *C. albicans* Biofilmen (ATCC 10231) auf Polyurethanplatten durch Argon und Argon/Luft Plasma wurde verneint (Doria 2015). In den nach 6- und 12-minütiger Plasmaapplikation von uns erstellten REM-Aufnahmen konnte ebenfalls nur eine lokale Abwesenheit vom *C. albicans* Biofilm gezeigt werden (Abb. XV). Inwiefern die lokale Abwesenheit von Zellmaterial reproduzierbar und auf die Plasmabehandlung zurückzuführen ist, kann anhand unserer Untersuchungen nicht belegt werden.

Pan et al. 2013 zeigten, dass *E. faecalis* Zellen innerhalb des mit Plasma behandelten Biofilms abgetötet wurden (Pan 2013). Darüber hinaus konnte die Wirkung des Plasmas trotz vorhandenem Biofilm in die Dentintubuli hinein nachgewiesen werden. Dass diese Beobachtung auf unseren *C. albicans* Biofilm übertragen werden kann, kann anhand der CFU-Analysen vermutet werden.

Die im Rahmen unserer Untersuchung erstellten REM-Aufnahmen dienen lediglich der Illustration der Untersuchungsergebnisse. Statistische Aussagen können, da es sich um die Untersuchung von Einzelproben handelt, nicht abgeleitet werden.

Mögliche Kollateralnutzen und -schäden einer Plasmabehandlung

Es wurde berichtet, dass Plasma die Benetzbarkeit von Oberflächen für hydrophile Substanzen durch die Anlagerung von polaren Sauerstoffgruppen verbessert (Fricke 2012b; Lehmann 2013; Matthes 2019). Die wässrigen Spüllösungen sollten demnach anschließend an eine Plasmabehandlung besser in die Tiefe des Wurzelkanals vordringen können. Während eine Verbesserung der Desinfektionswirkung durch eine Kombination der Plasmabehandlung mit einer Spüllösung unabhängig von der

Applikationsreihenfolge auf planen Oberflächen gezeigt werden konnte (Koban 2013), bestätigte sich dieser Effekt jedoch nicht in humanen Wurzelkanälen (Hüfner 2017). Jedoch applizierten Hüfner et al. 2017, ebenso die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegende Studie die Spüllösung vor der Plasmabehandlung (Hüfner 2017). Somit muss konstatiert werden, dass eine Optimierung der Benetzbarkeit der Wurzelkanaloberfläche durch Spüllösungen nach Plasmabehandlung nicht vorliegt und ergänzt werden sollte.

Die Polarität der Oberfläche hat auch Einfluss auf ihre Adhäsionseigenschaften. Stancampiano et al. 2019 zeigten eine Verbesserung der Hafteigenschaften der Wurzelkanalfüllung nach einer 3-minütigen Plasmabehandlung, jedoch lediglich nach einer vorherigen Anwendung chelatisierender Substanzen (Stancampiano 2019). Eine Verbesserung der Hafteigenschaften in Zähnen, welche nicht vorbehandelt wurden, konnte nicht beobachtet werden. Somit ergibt sich in dieser Hinsicht kein eindeutiges Argument für die Verwendung von kaltem Atmosphärenplasma in der Endodontie.

Eine kontinuierliche und möglichst vollständige Entfernung der Schmierschicht aus dem Wurzelkanal, die im Rahmen der mechanischen Aufbereitung entsteht, ist notwendig, um eine Verblockung des Kanals zu verhindern. Des Weiteren befördert die Schmierschicht eine mikrobielle Besiedlung des Wurzelkanals durch *C. albicans* (Sen 1997) und senkt die Haftfähigkeit des Füllungsmaterials im Wurzelkanal (Violich 2010). Plasma allein ist nicht in der Lage die Schmierschicht aus dem Wurzelkanal zu entfernen (Dong 2015). Jedoch scheint Plasma Komponenten der Schmierschicht in volatile Partikel umzusetzen, sodass die Schmierschicht teilweise durch anschließende Spülung mit Wasser entfernt werden kann (Lehmann 2013).

In vorangegangenen Studien wurde ein Ätzeffekt des Plasmas auf das Dentin diskutiert (Fricke 2012b; Hüfner 2017). Lehmann et al. 2013 zeigten mittels Laserprofilometrie, dass keine signifikanten Rauigkeitsunterschiede durch eine heliumbetriebene Plasmabehandlung detektierbar waren, wiesen jedoch auf leichte Irregularitäten in der Ausrichtung der Dentinkristalle nach einer Plasmabehandlung in REM-Bildern in 5000-facher Vergrößerung hin (Lehmann 2013). Rauigkeitsunterschiede sind im Rahmen unseres experimentellen Ansatzes nicht quantifizierbar. Auch sind eventuelle Effekte auf der Wurzelkanaloberfläche in unserem Aufbau nicht klar dem Plasma zuordenbar. So hat auch das im Rahmen der Vorbehandlung verwendete EDTA einen Einfluss auf physikalischen Eigenschaften

des Wurzelzementins (Mohammadi 2013). Somit erschien uns die Untersuchung hinsichtlich eventueller Strukturunterschiede der Wurzelkanaloberfläche im Rahmen unserer Studie nicht sinnvoll.

Der kINPen08 ist aktuell nicht für die Anwendung am Menschen zugelassen. Im Vergleich mit dem als Medizinprodukt zugelassenen kINPenMED wird der kINPen08 mit gleicher Spannung betrieben, hat jedoch mit 65 W eine größere Nennleistung als der kINPenMED mit 3,5 W. Auch die maximal erreichbare Temperatur des Gases ist beim kINPenMED auf 35 – 37 °C limitiert. Die Gastemperatur des kINPen08 kann abhängig von der Geräteeinstellung bis auf 80 °C steigen (Reuter 2018), womit er an lebendem Gewebe nicht mehr verwendbar wäre. Im Rahmen unserer Untersuchung wurde die Gastemperatur nicht erhoben, jedoch war die Gasflamme problemlos auf der Fingerkuppe tolerierbar. Untersuchungen, inwiefern das Plasma generiert durch den kINPen08 für lebende menschliche Zellen ungefährlich ist, stehen derzeit aus. Untersuchungen an lebenden Organismen mit dem kINPen09, kINPen11 und kINPenMED geben jedoch keine Hinweise auf langanhaltende Nebeneffekte der jeweiligen Behandlung innerhalb eines Beobachtungszeitraums von maximal einem Jahr (Preissner 2016; Schmidt 2017; Jablonowski 2019)

6. Schlussfolgerung

Trotzdem Plasma allein in der vorliegenden Studie die stärkste Reduktion anzüchtbarer Hefezellen bewirkte, scheint die erzielte Reduktion nicht ausreichend zuverlässig für eine zweifelsfrei erfolgreiche endodontologische Therapie zu sein. Die unsichere Positionierung des Plasmastrahls im Wurzelkanal und die vermutlich erhebliche Verlängerung der Behandlungsdauer bedenkend, deuten die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Studie nicht darauf hin, dass Plasma die bisher bekannten chemischen Desinfektiva ersetzen können wird. Auch die Kombination des Plasmastrahls mit einem chemischen Desinfektivum scheint aufgrund der beschriebenen, der Plasmaapplikation inhärenten Problematik, in Kombination mit einer im Vergleich zu Plasma allein abgeschwächten Desinfektionswirkung keine belastbare Alternative zum chemischen Desinfektivum oder aber zum Plasma allein zu sein. Trotzdem war die Desinfektionsleistung des kINPen08 in der vorliegenden Studie den klassischen Spüllösungen überlegen. In

weiteren Studien sollte geprüft werden, ob dieser Vorteil auch in Zähnen mit komplexer Wurzelkanalanatomie und mit polymikrobieller Besiedelung erhalten bleibt. Auch ist es dringend erforderlich zu prüfen, inwiefern der kINPen08, betrieben mit den in der Arbeit beschriebenen Einstellungen kurz- wie auch langfristig verträglich für humanes Gewebe ist. Darüber hinaus sollte das Design der Plasmaquelle für den Einsatz in der Endodontologie optimiert werden, um eine zuverlässige Positionierung des Plasmastrahls im Wurzelkanal zu garantieren.

Summa summarum betrachtet die vorliegende Arbeit ein stark vereinfachtes Model. Es konnten erste Hinweise darauf geben werden, dass kaltes Atmosphärendruckplasma generiert mit dem kINPen08 aus einem Argon/ 1 % Sauerstoff Gemisch geeignet ist den Problemkeime *C. albicans* aus dem Wurzelkanalsystem zu eliminieren. Inwiefern der kINPen08 tatsächlich geeignet ist im Rahmen von Revisionen klinisch zum Einsatz zu kommen, müssen weitere Studien klären.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von kaltem Atmosphärendruckplasma (CAP) auf *Candida albicans* in Wurzelkanälen extrahierter menschlicher Zähne untersucht. CAP wurde als Monotherapie und als Kombinationstherapie mit Spüllösungen (Natriumhypochlorit, Chlorhexidin und Octenidin) appliziert. Die antimikrobielle Wirksamkeit wurde als Logarithmus der koloniebildenden Einheiten (\log_{10} CFU/ml) aus Wurzelkanalabstrichen beurteilt. Ergänzend wurden exemplarisch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der behandelten Wurzelkanäle erstellt.

Die Plasmamonotherapie zeigte die höchste antimikrobielle Wirksamkeit. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Spüllösungen wurde bereits nach 6 min erreicht. Weder eine Steigerung der Behandlungszeit auf 12 min noch eine Kombinationstherapie führten zu einer signifikanten Verbesserung des Behandlungsergebnisses.

Summary

The aim of this study was to analyze the effect of cold atmospheric pressure plasma (CAP) on *Candida albicans* in root canals of extracted human teeth. CAP was applied as mono treatment and in combination with rinsing solutions (sodium hypochlorite, chlorhexidine and octenidine). Disinfection efficiency was evaluated as reduction of the logarithm of colony forming units per milliliter (\log_{10} CFU/mL) supported by scanning electron microscopy as imaging technique. A plasma mono treatment showed the best disinfection properties of all tested agents. A significant difference to the antimicrobial properties of the rinsing solutions was shown after 6 min. Neither the increase of the treatment duration with plasma to 12 min nor the combination with the rinsing solutions showed a significantly higher treatment effect.

8. Literaturverzeichnis

- Abou-Rass M. and Bogen G. (1998). "Microorganisms in Closed Periapical Lesions." *International Endodontic Journal* 31: 39–47. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.1998.t01-1-00088.x>.
- Ahmad I. A. and Al-Jadaa A. (2014). "Three Root Canals in the Mesio Buccal Root of Maxillary Molars: Case Reports and Literature Review." *Journal of Endodontics* 40 (12): 2087–94. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.07.034>.
- Ahmed H. M. A., Versiani M. A., De-Deus G., and Dummer P. M. H. (2017). "A New System for Classifying Root and Root Canal Morphology." *International Endodontic Journal* 50 (8): 761–70. <https://doi.org/10.1111/iej.12685>.
- Ari, H. Yaşar E., Belli S. (2003). "Effects of NaOCl on Bond Strengths of Resin Cements to Root Canal Dentin." *Journal of Endodontics* 29 (4): 248–51. <https://doi.org/10.1097/00004770-200304000-00004>.
- von Arx T. (2005). "Frequency and Type of Canal Isthmuses in First Molars Detected by Endoscopic Inspection during Periradicular Surgery." *International Endodontic Journal* 38 (3): 160–68. doi: 10.1111/j.1365-2591.2004.00915.x.
- Bagg J., Silverwood. R. W. (1986). "Coagglutination Reactions between *Candida Albicans* and Oral Bacteria." *Journal of Medical Microbiology* 22 (2): 165–69. <https://doi.org/10.1099/00222615-22-2-165>.
- Basrani B. R., Manek S., Sodhi R.N., Fillery E., and Manzur A. (2007). "Interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate." *Journal of Endodontics* 33 (8): 966–69. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.04.001>.
- Baumgartner J. C., Watts C. M., and Xia T. (2000). "Occurrence of *Candida Albicans* in Infections of Endodontic Origin." *Journal of Endodontics* 26 (12): 695–98. <https://doi.org/10.1097/00004770-200012000-00003>.
- Becking A. G. (1991). "Complications in the Use of Sodium Hypochlorite during Endodontic Treatment. Report of Three Cases." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 71 (3): 346–48. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(91\)90313-2](https://doi.org/10.1016/0030-4220(91)90313-2).
- Bisag A., Manzini M., Simoncelli E., Stancampiano A., Tonini R., Gherardi M., Colombo V. (2020). "Cold Atmospheric Pressure Plasma Treatment to Assist the Restoration of the Apical Region of a Root Canal in Endodontic Procedures." *Clinical Plasma Medicine* 19–20: 100100. <https://doi.org/10.1016/j.cpme.2020.100100>.
- Biswas S. K., Chaffin W. L. (2005). "Anaerobic Growth of *Candida Albicans* Does Not Support Biofilm Formation under Similar Conditions Used for Aerobic Biofilm." *Current Microbiology* 51 (2): 100–104. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-4552-3>.
- Böhm R., Strauch D. (2002). "Grundlagen Der Reinigung Und Desinfektion. Reinigung Und Desinfektion in Der Nutztierhaltung Und Veredelungswirtschaft." *Enke Verlag, Stuttgart*: ISBN-13: 978-3777317960.

- Bottone E. J., Hong T., Zhang D. Y. (1993). "Basic Mycology Undersoring Medically Important Fungi." *Otolaryngol Clin North Am.* 26 (6): 919–40. PMID: 8290286
- Bouillaguet S., Manoil D., Girard M., Louis J., Gaïa N., Leo S., Schrenzel J., Lazarevic V. (2018). "Root Microbiota in Primary and Secondary Apical Periodontitis." *Frontiers in Microbiology* Oct 9 (9): 2374. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02374>.
- Burns L. E., Kim J., Wu Y., Alzwaideh R., McGowan R., Sigurdsson A. (2022). "Outcomes of Primary Root Canal Therapy: An Updated Systematic Review of Longitudinal Clinical Studies Published between 2003 and 2020." *International Endodontic Journal* 55 (7): 714–31. <https://doi.org/10.1111/iej.13736>.
- Burry J. C., Stover S., Eichmiller F., Bhagavatula P. (2016). "Outcomes of Primary Endodontic Therapy Provided by Endodontic Specialists Compared with Other Providers." *Journal of Endodontics* 42 (5): 702–05. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.02.008>.
- Bussiahn R., Brandenburg R., Gerling T., Kindel E., Lange H., Lembke N., Weltmann K. D., von Woedtker T., Kocher T. (2010). "The Hairline Plasma: An Intermittent Negative Dc-Corona Discharge at Atmospheric Pressure for Plasma Medical Applications." *Applied Physics Letters* 96 (14): 2008–11. <https://doi.org/10.1063/1.3380811>.
- Byström A., Sundqvist G. (1981). "Bacteriologic Evaluation of the Efficacy of Mechanical Root Canal Instrumentation in Endodontic Therapy." *European Journal of Oral Sciences* 89 (4): 321–28. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1981.tb01689.x>.
- Casalinuovo I. A., Sorge R., Bonelli G., Di Francesco P. (2017) "Evaluation of the antifungal effect of EDTA, a metal chelator agent, on *Candida albicans* biofilm." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 21(6): 1413-1420.
- Chandra J., Kuhn D. M., Mukherjee P. K., Hoyer L. L., McCormick T., Ghannoum M. A. (2001). "Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida Albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance." *Journal of Bacteriology* 183 (18): 5385–94. <https://doi.org/10.1128/JB.183.18.5385-5394.2001>.
- Chandra S. S., Miglani R., Srinivasan M. R., Indira R. (2010). "Antifungal Efficacy of 5.25% Sodium Hypochlorite, 2% Chlorhexidine Gluconate, and 17% EDTA With and Without an Antifungal Agent." *Journal of Endodontics* 36 (4): 675–78. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.01.015>.
- Clarkson R. M., Podlich H. M., Moule A. J. (2011). "Influence of Ethylenediaminetetraacetic Acid on the Active Chlorine Content of Sodium Hypochlorite Solutions When Mixed in Various Proportions." *Journal of Endodontics* 37 (4): 538–43. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.01.018>.
- Clegg M. S., Vertucci F. J., Walker C., Belanger M., Britto L. R. (2006). "The Effect of Exposure to Irrigant Solutions on Apical Dentin Biofilms In Vitro." *Journal of Endodontics* 32 (5): 434–37. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.07.002>.

- Coaguila-Llerena H., Rodrigues E. M., Santos C. S., Ramos S. G., Medeiros M. C., Chavez-Andrade G. M., Guerreiro-Tanomaru J. M., Tanomaru-Filho M., Faria G. (2020). "Effects of Octenidine Applied Alone or Mixed with Sodium Hypochlorite on Eukaryotic Cells." *International Endodontic Journal* 53 (9): 1264–74. <https://doi.org/10.1111/iej.13347>.
- Coaguila-Llerena H., Rodrigues E. M., Tanomaru-Filho M., Guerreiro-Tanomaru J. M., Faria G. (2019). "Effects of Calcium Hypochlorite and Octenidine Hydrochloride on L929 and Human Periodontal Ligament Cells." *Brazilian Dental Journal* 30 (3): 213–19. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201902280>.
- Combs T. J., Guarneri J. J., Pisano M. A. (1968). "The Effect of Sodium Chloride on the Lipid Content and Fatty Acid Composition of *Candida Albicans*." *Mycologia* 60 (6): 1232–39. <https://doi.org/10.1080/00275514.1968.12018689>.
- Curylofo-Zotti F. A., Lorencetti-Silva F., de Almeida Coelho J., Monteiro R. M., Watanabe E., Corona S. A. M. (2018). "Human Teeth Biobank: Microbiological Analysis of the Teeth Storage Solution." *Microscopy Research and Technique* 81 (3): 332–37. <https://doi.org/10.1002/jemt.22984>.
- Das S., Gajula V. P., Mohapatra S., Singh G., Kar S. (2022). "Role of Cold Atmospheric Plasma in Microbial Inactivation and the Factors Affecting Its Efficacy." *Health Sciences Review* 4: 100037. <https://doi.org/10.1016/j.hsr.2022.100037>.
- Davis D., Wilson R. B., Mitchell A. P. (2000). "RIM101-Dependent and -Independent Pathways Govern PH Responses in *Candida Albicans*." *Molecular and Cellular Biology* 20 (3): 971–78. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.3.971-978.2000>.
- Delben J. A., Zago C. E., Tyhovych N., Duarte S., Vergani C. E. (2016). "Effect of Atmospheric-Pressure Cold Plasma on Pathogenic Oral Biofilms and in Vitro Reconstituted Oral Epithelium." *PLoS ONE* 11 (5): e0155427. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155427>.
- Dijksteel G. S., Ulrich M. M. W., Vlig M., Sobota A., Middelkoop E., Boekema B. K. H. L. (2020). "Safety and Bactericidal Efficacy of Cold Atmospheric Plasma Generated by a Flexible Surface Dielectric Barrier Discharge Device against *Pseudomonas Aeruginosa* in Vitro and in Vivo." *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 19 (1): 37. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00381-z>.
- Dong, Xiaoqing, Hao Li, Meng Chen, Yong Wang, and Qingsong Yu. (2015). "Plasma Treatment of Dentin Surfaces for Improving Self-Etching Adhesive/Dentin Interface Bonding." *Clinical Plasma Medicine* 3 (1): 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.cpme.2015.05.002>.
- Doria A. C. O. C., di Paula Costa Sorge C., Santos T. B., Brandão J., Gonçalves P. A. R., Maciel H. S., Khouri S., Pessoa R. S. (2015). "Application of Post-Discharge Region of Atmospheric Pressure Argon and Air Plasma Jet in the Contamination Control of *Candida Albicans* Biofilms." *Revista Brasileira de Engenharia Biomedica* 31 (4): 358–62. <https://doi.org/10.1590/2446-4740.01215>.
- Douglas L. J. (2003). "Candida Biofilms and Their Role in Infection." *Trends in Microbiology* 11 (1): 30–36. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)00002-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)00002-1).

- Dutner J., Mines P., Anderson A. (2012). "Irrigation Trends among American Association of Endodontists Members: A Web-Based Survey." *Journal of Endodontics* 38 (1): 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.08.013>.
- Elakanti S., Cherukuri G., Rao V. G., Chandrasekhar V., Rao A. S., Tummala M. (2015). "Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of QMix TM 2 in 1, Sodium Hypochlorite, and Chlorhexidine against Enterococcus Faecalis and Candida Albicans." *Journal of Conservative Dentistry* 18 (2): 128–31. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.153067>.
- Eldeniz A. U., Guneser M. B., Akbulut M. B. (2015). "Comparative Antifungal Efficacy of Light-Activated Disinfection and Octenidine Hydrochloride with Contemporary Endodontic Irrigants." *Lasers in Medical Science* 30 (2): 669–75. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1387-1>.
- Erdemir A., Ari H., Güngüneş H., Belli S. (2004). "Effect of Medications for Root Canal Treatment on Bonding to Root Canal Dentin." *J Endod.* 30 (2): 113–16. <https://doi.org/10.1097/00004770-200402000-00013>.
- Ermolaeva S. A., Varfolomeev A. F., Chernukha M. Y., Yurov D. S., Vasiliev M. M., Kaminskaya A. A., Moisenovich M. M., et al. (2011). "Bactericidal Effects of Non-Thermal Argon Plasma in Vitro, in Biofilms and in the Animal Model of Infected Wounds." *Journal of Medical Microbiology* 60 (1): 75–83. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.020263-0>.
- Estrela C., Bueno M. R., Couto G. S., Rabelo L. E. G., Alencar A. H. G., Silva R. G., Pécora J. D., Sousa-Neto M. D. (2015). "Study of Root Canal Anatomy in Human Permanent Teeth in a Subpopulation of Brazil's Center Region Using Cone-Beam Computed Tomography - Part 1." *Brazilian Dental Journal* 26 (5): 530–36. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302448>.
- Estrela C., Estrela C. R. A., Barbin E. L., Spanó J. C. E., Marchesan M. A., Pécora J. D. (2002). "Mechanism of Action of Sodium Hypochlorite." *Brazilian Dental Journal* 13 (2): 113–17. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402002000200007>.
- Fricke, Katja, Ina Koban, Helena Tresp, Lukasz Jablonowski, Karsten Schröder, Axel Kramer, Klaus Dieter Weltmann, Thomas von Woedtke, and Thomas Kocher. (2012a). "Atmospheric Pressure Plasma: A High-Performance Tool for the Efficient Removal of Biofilms." *PLoS ONE* 7 (8): 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042539>.
- Fricke K., Reuter S., Schröder D., Gathen V., Weltmann K. D., von Woedtke T. (2012b). "Investigation of Surface Etching of Poly (Ether Ether." *IEEE Transactions on Plasma Science* 40: 2900–2911. <https://doi.org/10.1109/tps.2012.2212463>.
- Gerten B., Lauer B. (2007). "Testing of the Disinfectant-Neutralizing Effect of Tryptic Soy Agar with the Neutralizers LTHTh in a Surface-Independent Method." In . Posterpräsentation der 59. Jahrestagung der DGHM.
- Ghivari S. B., Bhattacharya H., Bhat K. G., Pujar M. A. (2017). "Antimicrobial Activity of Root Canal Irrigants against Biofilm Forming Pathogens- An in Vitro Study." *J Conserv Dent* 20 (3): 147–51. https://doi.org/10.4103/JCD.JCD_38_16.

- Goldman M., Pearson A. H. (1969). "Postdébridement Bacterial Flora and Antibiotic Sensitivity." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 28 (6): 897–905. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(69\)90346-6](https://doi.org/10.1016/0030-4220(69)90346-6).
- Gomes B. P. F. A., Lilley J. D., Drucker D. B. (1996). "Variations in the Susceptibilities of Components of the Endodontic Microflora to Biomechanical Procedures." *International Endodontic Journal* 29 (4): 235–41. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.1996.tb01375.x>.
- Gomes B. P. F. A., Vianna M. E., Zaia A. A., Almeida J. F. A., Souza-Filho F. J., Ferraz C. C. R. (2013). "Chlorhexidine in Endodontics." *Brazilian Dental Journal* 24 (2): 89–102. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302188>.
- Gow N. A. R., van de Veerdonk F. L., Brown A. J. P., Netea M. G. (2011). "Candida Albicans Morphogenesis and Host Defence: Discriminating Invasion from Colonization." *Nature Reviews Microbiology* 10 (2): 112–22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2711>.
- Grigoratos D., Knowles J., Ng Y. L., Gulabivala K. (2001). "Effect of Sodium Hypochlorite and Calcium Hydroxide on the Modulus of Elasticity and Flexural Strength of Dentine." *International Endodontic Journal* 34 (2): 113–19. doi: 10.1046/j.1365-2591.2001.00356.x.
- Grimaudo N. J., Nesbitt W. E. (1997). "Coaggregation of Candida Albicans with Oral Fusobacterium Species." *Oral Microbiology and Immunology* 12 (3): 168–73. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.1997.tb00374.x>.
- Grossman L. I., Meiman B. W. (1941). "Solution of Pulp Tissue by Chemical Agents." *The Journal of the American Dental Association* 28 (2): 223–25. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1941.0060>.
- Haapasalo M., Ørstavik D. (1987). "In Vitro Infection and Disinfection of Dentinal Tubules." *Journal of Dental Research* 66 (8): 1375–79. <https://doi.org/10.1177/00220345870660081801>.
- Haapasalo M. (1989). "Bacteroides Spp. in Dental Root Canal Infections." *Dental Traumatology* 5 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1989.tb00330.x>.
- Hagihara Y., Kaminishi H., Cho T., Tanaka M., Kaita H. (1988). "Degradation of Human Dentine Collagen by an Enzyme Produced by the Yeast Candida Albicans." *Archives of Oral Biology* 33 (8): 617–19. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(88\)90138-0](https://doi.org/10.1016/0003-9969(88)90138-0).
- Handorf O., Weihe T., Bekeschus S., Graf A. C., Schnabel U., Riedel K., Ehlbeck J. (2018a). "Nonthermal Plasma Jet Treatment Negatively Affects the Viability and Structure of Candida Albicans SC5314 Biofilms." *Applied and Environmental Microbiology* 84 (21): e01163-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01163-18>.
- Handorf O., Weihe T., Bekeschus S., Graf A. C., Schnabel U., Riedel K., Ehlbeck J. (2018b). "Effects on Cell Viability, Growth and Morphology of C. Albicans SC5314 Biofilms after KINPen®09 Plasma Treatment." *bioRxiv* 323600 <https://doi.org/10.1101/323600>.

- Heineman H. S., Yunis E. J., Siemienski J., Braude A. I. (1961). "Chlamyospores and Dimorphism in *Candida Albicans* Endocarditis." *Archives of Internal Medicine* 108: 570 - 77. <https://doi.org/10.1001/archinte.1961.03620100062008>.
- Heinlin J., Isbary G., Stolz W., Morfill G., Landthaler M., Shimizu T., Steffes B., Nosenko T., Zimmermann J. L., Karrer S. (2011). "Plasma Applications in Medicine with a Special Focus on Dermatology." *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 25 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2010.03702.x>.
- Herbst S. R., Hertel M., Ballout H., Pierdzioch P., Weltmann K. D., Wirtz H. C., Abu-Sirhan S., Kostka E., Paris S., Preissner S. (2015). "Bactericidal Efficacy of Cold Plasma at Different Depths of Infected Root Canals In Vitro." *The Open Dentistry Journal* 9: 486–91. <https://doi.org/10.2174/1874210601509010486>.
- Hertel F., Schneider M. (2020). "Ist Die Wurzelspitzenresektion Noch Zeitgemäß?" *Der MKG-Chirurg* 13 (2): 119–27. <https://doi.org/10.1007/s12285-020-00247-5>.
- Hess W. (1917). "Zur Anatomie Der Wurzelkanäle Des Menschlichen Gebisses Mit Berücksichtigung Der Feineren Verzweigungen Am Foramen Apicale." *Buchdruckerei Berichthaus, Zürich*. Vol. 27.
- Hoehn M. M., Pink F. E. (2002). "Contemporary Endodontic Retreatments: An Analysis Based on Clinical Treatment Findings." *Journal of Endodontics* 28 (12): 834–36. <https://doi.org/10.1097/00004770-200212000-00010>.
- Holmes A. R., Cannon R. D., Shepherd M. G. (1991). "Effect of calcium ion uptake on *Candida albicans* morphology." *FEMS Microbiol Lett.* 61(2-3): 187-93. doi: 10.1016/0378-1097(91)90549-p.
- Hosida T. Y., Cavazana T. P., Henriques M., Pessan J. P., Delbem A. C. B., Monteiro D. B. (2018). "Interactions between *Candida Albicans* and *Candida Glabrata* in Biofilms: Influence of the Strain Type, Culture Medium and Glucose Supplementation." *Mycoses* 61 (4): 270–78. <https://doi.org/10.1111/myc.12738>.
- Hoyer L. L. (2001). "The ALS Gene Family of *Candida Albicans*." *Trends in Microbiology* 9 (4): 176–80. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)01984-9](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)01984-9).
- Hube B., Albrecht A., Bader O. et al. (2002). "Pathogenitätsfaktoren Bei Pilzinfektionen Arbeiten Der Nachwuchsgruppe 'Pathogenitätsfaktoren Bei Pilzinfektionen' Des Robert Koch-Instituts." *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 45 (2): 159–65. <https://doi.org/10.1007/s00103-001-0360-5>.
- Hübner N. O., Matthes R., Koban I., Rändler C., Müller G., Bender C., Kindel E., Kocher T., Kramer A. (2010). "Efficacy of Chlorhexidine, Polihexanide and Tissue-Tolerable Plasma against *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms Grown on Polystyrene and Silicone Materials." *Skin Pharmacology and Physiology* 23 (Suppl.): 28–34. <https://doi.org/10.1159/000318265>.

- Hüfner A., Steffen H., Holtfreter B., Schlüter R., Duske K., Matthes R., von Woedtke T., Weltmann K. D., Kocher T., Jablonowski L. (2017). "Effects of Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma and Sodium Hypochlorite Solution on Enterococcus Faecalis Biofilm: An Investigation in Extracted Teeth." *Plasma Processes and Polymers* 14 (3): 8–15. <https://doi.org/10.1002/ppap.201600064>.
- Hülsmann M., Petschelt A., Raab W., Schäfer E., Weiger R. (2005). "Good Clinical Practice: Die Wurzelkanalbehandlung." *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 60 (2): 1–7.
http://www.dgzmk.de/index.php?site=std150%5C&backlink=m034X%5CnL:%5C50%5C_Service%5CLiteratur-digital%5CDGZMK%5CGood-clinical-practice-Die-Wurzelkanalbehandlung-2004-07-01.pdf%5CnL:%5C50_Service%5CLiteratur-digital%5C00_mendeley%5CDeutsche%5CnZahn?rztlich.
- Iqbal M., Kim S., Yoon F. (2007). "An Investigation Into Differential Diagnosis of Pulp and Periapical Pain: A PennEndo Database Study." *Journal of Endodontics* 33 (5): 548–51. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.01.006>.
- Jablonowski L., Koban I., Berg M. H., Kindel E., Duske K., Schröder K., Weltmann K. D., Kocher T. (2013). "Elimination of E. Faecalis by a New Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Handheld Device for Endodontic Treatment. a Preliminary Investigation." *Plasma Processes and Polymers* 10 (6): 499–505. <https://doi.org/10.1002/ppap.201200156>.
- Jablonowski L., Kocher T., Schindler A., Müller K., Dombrowski F., von Woedtke T., Arnold T., et al. (2019). "Side Effects by Oral Application of Atmospheric Pressure Plasma on the Mucosa in Mice." *PLoS ONE* 14 (4): e0215099. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215099>.
- Jabra-Rizk M. A., Falkler W. A., Meiller T. F. (2004). "Fungal Biofilms and Drug Resistance." *Emerging Infectious Diseases* 10 (1): 14–19. <https://doi.org/10.3201/eid1001.030119>.
- Jacob V. P., Paião L. I., da Silva A. C. G., Magario M. K. W., Kaneko T. Y., Martins C. M., Monteiro D. R., Mori G. G. (2020). "Antimicrobial Action of NeoMTA Plus on Mono- and Dual-Species Biofilms of Enterococcus Faecalis and Candida Albicans: An in Vitro Study." *Archives of Oral Biology* 120 (Dec) 120:104925. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104925>.
- "Jahrbuch Endodontie 2016." (2016), 3. Auflage, OEMUS MEDIA AG, Leipzig.
- Jhajharia K., Parolia A., Shetty K. V., Mehta L. K. (2015). "Biofilm in Endodontics: A Review." *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry* 5 (1): 1-12. <https://doi.org/10.4103/2231-0762.151956>.
- Jiang C., Chen M. T., Gorur A., Schaudinn C., Jaramillo D. E., Costerton J. W., Sedghizadeh P. P., Vernier P. T., Gundersen M. A. (2009). "Nanosecond Pulsed Plasma Dental Probe." *Plasma Processes and Polymers* 6 (8): 479–83. <https://doi.org/10.1002/ppap.200800133>.

- Jin Y., Yip H. K., Samaranayake Y. H., Yau J. Y., Samaranayake L. P. (2003). "Biofilm-Forming Ability of *Candida Albicans* Is Unlikely to Contribute to High Levels of Oral Yeast Carriage in Cases of Human Immunodeficiency Virus Infection." *Journal of Clinical Microbiology* 41 (7): 2961–67. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.2961-2967.2003>.
- Jitsurong S., Kiamsiri S., Pattararangrong N. (1993). "New Milk Medium for Germ Tube and Chlamydoconidia Production by *Candida Albicans*." *Mycopathologia* 123 (2): 95–98. <https://doi.org/10.1007/BF01365086>.
- Jordan A. R., Micheelis W. (2016). "Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V)." Kassenzahnärztliche Bundesvereinigung und Bundeszahnärztekammer – Arbeitsgemeinschaft der Deutschen Zahnärztekammern e. V. (BZÄK), Köln.
- Jungbauer G., Moser D., Müller S., Pfister W., Sculean A., Eick S. (2021). "The Antimicrobial Effect of Cold Atmospheric Plasma against Dental Pathogens—a Systematic Review of in-Vitro Studies." *Antibiotics* 10 (2): 211. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020211>.
- Kadkhoda Z., Amarlu Z., Eshraghi S., Samiei N. (2016). "Antimicrobial Effect of Chlorhexidine on Aggregatibacter Actinomycetemcomitans Biofilms Associated with Peri-Implantitis." *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects* 10 (3): 176–80. <https://doi.org/10.15171/joddd.2016.028>.
- Kaminishi H., Hagihara Y., Hayashi S., Cho T. (1986). "Isolation and Characteristics of Collagenolytic Enzyme Produced by *Candida Albicans*." *Infection and Immunity* 53 (2): 312–16. <https://doi.org/10.1128/iai.53.2.312-316.1986>.
- Kampf G. (2018). "Biocidal Agents Used for Disinfection Can Enhance Antibiotic Resistance in Gram-Negative Species." *Antibiotics* 7 (4): 110. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040110>.
- Karabucak B., Bunes A., Chehoud C., Kohli M. R., Setzer F. (2016). "Prevalence of Apical Periodontitis in Endodontically Treated Premolars and Molars with Untreated Canal: A Cone-Beam Computed Tomography Study." *Journal of Endodontics* 42 (4): 538–41. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.12.026>.
- Karapinar-Kazandag M., Basrani B. R., Friedman S. (2010). "The Operating Microscope Enhances Detection and Negotiation of Accessory Mesial Canals in Mandibular Molars." *Journal of Endodontics* 36 (8): 1289–94. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.04.005>.
- Kaufman A. Y., Keila S. (1989). "Hypersensitivity to Sodium Hypochlorite" 15 (5): 224–26. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(89\)80241-9](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(89)80241-9).
- Kerekes K., Tronstad L. (1979). "Long-Term Results of Endodontic Treatment Performed with a Standardized Technique." *Journal of Endodontics* 5 (3): 83–90. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(79\)80154-5](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(79)80154-5).
- Kerlikowski A., Matthes R., Pink C., Steffen H., Schlüter R., Holtfreter B., Weltmann K. D., von Woedtke T., Kocher T., Jablonowski L. (2020). "Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma and Disinfecting Agents on *Candida Albicans* in Root Canals of Extracted Human Teeth." *Journal of Biophotonics* 13 (12): e202000221. <https://doi.org/10.1002/jbio.202000221>.

- Khademi A. A., Mohammadi Z., Havaee A. (2006). "Evaluation of the Antibacterial Substantivity of Several Intra-Canal Agents." *Australian Endodontic Journal* 32 (3): 112–15. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4477.2006.00033.x>.
- Khalighinejad N., Aminoshariae A., Kulild J. C., Williams K. A., Wang J., Mickel A. (2017). "The Effect of the Dental Operating Microscope on the Outcome of Nonsurgical Root Canal Treatment: A Retrospective Case-Control Study." *Journal of Endodontics* 43 (5): 728–32. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.01.015>.
- Khalil J. (2012). "Untersuchungen zur Neutralisierung der antiseptischen Wirkstoffe Chlorhexidindigluconat, Octenidindihydrochlorid und Polyhexamethylenbiguanidinhydrochlorid als Voraussetzung für die Bestimmung der antiseptischen Wirksamkeit in Vitro." *Inaugural-Dissertation Medizin*. Universität Greifswald.
- Kim S. J., Chung T. H., Bae S. H. (2010a). "Striation and Plasma Bullet Propagation in an Atmospheric Pressure Plasma Jet." *Physics of Plasmas* 17 (5): 053504. <https://doi.org/10.1063/1.3400220>.
- Kim S. J., Chung T. H., Bae S. H., Leem S. H. (2010b). "Induction of Apoptosis in Human Breast Cancer Cells by a Pulsed Atmospheric Pressure Plasma Jet." *Applied Physics Letters* 97 (2): 97–100. <https://doi.org/10.1063/1.3462293>.
- Kim Y., Chang S. W., Lee J. K., Chen I. P., Kaufman B., Jiang J., Cha B. Y., Zhu Q., Safavi K. E., Kum K. Y. (2013). "A Micro-Computed Tomography Study of Canal Configuration of Multiple-Canalled Mesio Buccal Root of Maxillary First Molar." *Clinical Oral Investigations* 17 (6): 1541–46. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0852-8>.
- Kisch T., Helmke A., Schleusser S., Song J., Liodaki E., Stang F. H., Mailaender P., Kraemer R. (2016). "Improvement of Cutaneous Microcirculation by Cold Atmospheric Plasma (CAP): Results of a Controlled, Prospective Cohort Study." *Microvascular Research* 104: 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2015.12.002>.
- Klämpfl T. G., Isbary G., Shimizu T., Li Y. F., Zimmermann J. L., Stolz W., Schlegel J., Morfill G. E., Schmidt H. U. (2012). "Cold Atmospheric Air Plasma Sterilization against Spores and Other Microorganisms of Clinical Interest." *Applied and Environmental Microbiology* 78 (15): 5077–82. <https://doi.org/10.1128/AEM.00583-12>.
- Klotz S. A., Rutten M. J., Smith R. L., Babcock S. R., Cunningham M. D. (1993). "Adherence of *Candida Albicans* to Immobilized Extracellular Matrix Proteins Is Mediated by Calcium-Dependent Surface Glycoproteins." *Microbial Pathogenesis* 14(2):133-47. <https://doi.org/10.1006/mpat.1993.1014>.
- Koban I., Geisel M. H., Holtfreter B., Jablonowski L., Hübner N. O., Matthes R., Masur K., Weltmann K. D., Kramer A., Kocher T. (2013). "Synergistic Effects of Nonthermal Plasma and Disinfecting Agents against Dental Biofilms In Vitro ." *ISRN Dentistry* 2013: 573262. <https://doi.org/10.1155/2013/573262>.

- Koban I., Matthes R., Hübner N. O., Welk A., Meisel P., Holtfreter B., Sietmann R., et al. (2010). "Treatment of *Candida Albicans* Biofilms with Low-Temperature Plasma Induced by Dielectric Barrier Discharge and Atmospheric Pressure Plasma Jet." *New Journal of Physics* 12: 073039. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/12/7/073039>.
- Kohn W. G., Harte J. A., Malvitz D. M., Collins A. S., Cleveland J. L., Eklund K. J. (2004). "Guidelines for Infection Control in Dental Health Care Settings - 2003." *Journal of the American Dental Association* 135 (1): 33–47. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2004.0019>.
- Kumamoto C. A. (2002). "Candida Biofilms." *Current Opinion in Microbiology* 5 (6): 608–11. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00371-5](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00371-5).
- Kumamoto C. A., Vines M. D. (2005). "Contributions of Hyphae and Hypha-Co-Regulated Genes to *Candida Albicans* Virulence." *Cellular Microbiology* 7 (11): 1546–54. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00616.x>.
- "KZBV Jahrbuch 2020" (2020). Kassenzahnärztliche Bundesvereinigung (KZBV), Köln.
- Langmuir I. (1928). "Oscillations in Ionized Gases." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 14 (8): 627–237. <https://doi.org/10.1073/pnas.14.8.627>.
- Lata S., Chakravorty S., Mitra T., Pradhan P. K., Mohanty S., Patel P., Jha E., Panda P. K., Verma S. K., Suar M. (2022). "Aurora Borealis in Dentistry: The Applications of Cold Plasma in Biomedicine." *Materials Today Bio* 13: 100200. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2021.100200>.
- Lee J.J., Mettey-Marbell A., Cook A., Pimenta L. A. F., Leonard R., Ritter A. V. (2007). "Using Extracted Teeth for Research: The Effect of Storage Medium and Sterilization on Dentin Bond Strengths." *Journal of the American Dental Association* 138 (12): 1599–1603. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2007.0110>.
- Lee K., Paek K. H., Ju W. T., Lee Y. (2006). "Sterilization of Bacteria, Yeast, and Bacterial Endospores by Atmospheric-Pressure Cold Plasma Using Helium and Oxygen." *J Microbiol* 44 (3): 269–75.
- Lehmann A., Rueppell A., Schindler A., Zylla I. M., Seifert H. J., Nothdurft F., Hannig M., Rupf S. (2013). "Modification of Enamel and Dentin Surfaces by Non-Thermal Atmospheric Plasma." *Plasma Processes and Polymers* 10 (3): 262–70. <https://doi.org/10.1002/ppap.201200088>.
- Lerouge S., Wertheimer M. R., Marchand R., Tabrizian M. Yahia L. (2000). "Effect of Gas Composition on Spore Mortality and Etching during Low-Pressure Plasma Sterilization." *Journal of Biomedical Materials Research* 51: 128–35. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(200007\)51:1<128::AID-JBM17>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(200007)51:1<128::AID-JBM17>3.0.CO;2-#).
- Li Y., Sun K., Ye G., Liang Y., Pan H., Wang G., Zhao Y., Pan J., Zhang J., Fang J. (2015). "Evaluation of Cold Plasma Treatment and Safety in Disinfecting 3-Week Root Canal *Enterococcus Faecalis* Biofilm in Vitro." *Journal of Endodontics* 41 (8): 1325–30. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.10.020>.

- Liang Y., Li Y., Sun K., Zhang Q., Li W., Zhu W., Zhang J., Fang J. (2015). "Plasma Thorns: Atmospheric Pressure Non-Thermal Plasma Source for Dentistry Applications." *Plasma Processes and Polymers* 12 (10): 1186–87. <https://doi.org/10.1002/ppap.201580185>.
- Lin L. M., Pascon E. A., Skribner J., Gängler P., Langeland K. (1991). "Clinical, Radiographic, and Histologic Study of Endodontic Treatment Failures." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 71 (5): 603–11. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(91\)90371-I](https://doi.org/10.1016/0030-4220(91)90371-I).
- Lindemann R. A., Hume W. R., Wolcott R. B. (1985). "Dentin Permeability and Pulpal Response to EDTA." *The Journal of Prosthetic Dentistry* 53 (3): 341–43. [https://doi.org/10.1016/0022-3913\(85\)90506-2](https://doi.org/10.1016/0022-3913(85)90506-2).
- Liu J. X., Werner J., Kirsch T., Zuckerman J. D., Virk M. S. (2018). "Cytotoxicity Evaluation of Chlorhexidine Gluconate on Human Fibroblasts, Myoblasts, and Osteoblasts." *Journal of Bone and Joint Infection* 3 (4): 165–72. <https://doi.org/10.7150/jbji.26355>.
- de Lucena J. M. V. M., Decker E. M., Walter C., Boeira L. S., Löst C., Weiger R. (2013). "Antimicrobial Effectiveness of Intracanal Medicaments on *Enterococcus Faecalis*: Chlorhexidine versus Octenidine." *International Endodontic Journal* 46 (1): 53–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2012.02093.x>.
- Luo G., Ibrahim A. S., Spellberg B., Nobile C. J., Mitchell A. P., Fu Y. (2010). "Candida Albicans Hyr1p Confers Resistance to Neutrophil Killing and Is a Potential Vaccine Target." *Journal of Infectious Diseases* 201 (11): 1718–28. <https://doi.org/10.1086/652407>.
- Maisch T., Shimizu T., Isbary G., Heinlin J., Karrer S., Klämpfl T. G., Li Y. F., Morfill G., Zimmermann J. L. (2012). "Contact-Free Inactivation of *Candida Albicans* Biofilms by Cold Atmospheric Air Plasma." *Applied and Environmental Microbiology* 78 (12): 4242–47. <https://doi.org/10.1128/AEM.07235-11>.
- Matthes R., Assadian O., Kramer A. (2014). "Repeated Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma Does Not Induce Resistance in *Staphylococcus Aureus* Embedded in Biofilms." *GMS Hygiene and Infection Control* 9 (3): Doc17. <https://doi.org/10.3205/dgkh000237>.
- Matthes R., Bekeschus S., Bender C., Koban I., Hübner N. O., Kramer A. (2012). "Pilot-Study on the Influence of Carrier Gas and Plasma Application (Open Resp. Delimited) Modifications on Physical Plasma and Its Antimicrobial Effect against *Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus Aureus*." *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplin* 7 (1): Doc02. <https://doi.org/10.3205/dgkh000186>.
- Matthes R., Jablonowski L., Holtfreter B., Gerling T., von Woedtke T., Kocher T. (2019). "Fibroblast Growth on Zirconia Ceramic and Titanium Disks After Application with Cold Atmospheric Pressure Plasma Devices or with Antiseptics." *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 34 (4): 809–18. <https://doi.org/10.11607/jomi.7285>.

- Metelmann H. R., von Woedtke T., Weltmann K. D. (2016). *Plasmamedizin - Kaltplasma in Der Medizinischen Anwendung*. Berlin/ Heidelberg: Springer Verlag. ISBN- 978-3662526446
- Metelmann H. R., Vu T. T., Do H. T., Le T. N. B., Hoang T. H. A., Phi T. T. T., Luong T. M. L., et al. (2013). "Scar Formation of Laser Skin Lesions after Cold Atmospheric Pressure Plasma (CAP) Treatment: A Clinical Long Term Observation." *Clinical Plasma Medicine* 1 (1): 30–35.
<https://doi.org/10.1016/j.cpme.2012.12.001>.
- Mohammadi Z., Shalavi S., Jafarzadeh H. (2013). "Ethylenediaminetetraacetic Acid in Endodontics." *European Journal of Dentistry* 7 (SupplUPPL. 1): 135–42.
<https://doi.org/10.4103/1305-7456.119091>.
- Monge R. A., Román E., Nombela C., Pla J. (2006). "The MAP Kinase Signal Transduction Network in *Candida Albicans*." *Microbiology* 152 (4): 905–12.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.28616-0>.
- Mountouris G., Silikas N., Eliades G.. (2004)"Effect of Sodium Hypochlorite Treatment on the Molecular Composition and Morphology of Human Coronal Dentin." *J Adhes Dent* 6 (3): 175–82.
- Nerandzic M. M., Donskey C. J. (2015). "Induced Sporicidal Activity of Chlorhexidine against *Clostridium Difficile* Spores under Altered Physical and Chemical Conditions." *PLoS ONE* 10 (4): e0123809.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123809>.
- Ning Y., Hu X., Ling J., Du Y., Liu J., Liu H., Peng Z. (2013). "Candida Albicans Survival and Biofilm Formation under Starvation Conditions." *International Endodontic Journal* 46: 62–70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2012.02094.x>.
- Odds F. C. (1988). *Candida and Candidosis*. 5th Edition, Elsevier Science Health Science Division.
- Okino L. A., Siqueira E. L., Santos M., Bombana A. C., Figueiredo J. A. P. (2004). "Dissolution of Pulp Tissue by Aqueous Solution of Chlorhexidine Digluconate and Chlorhexidine Digluconate Gel." *International Endodontic Journal* 37 (1): 38–41. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2004.00749.x>.
- Oliveira L. D., Carvalho C. A., Nunes W., Valera M. C., Camargo C. H., Jorge A. O. (2007). "Effects of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite on the Microhardness of Root Canal Dentin." *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 104 (4): 125–28.
<https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.04.019>.
- Onay E. O., Alikaya C., Seker E. (2010). "Evaluation of Antifungal Efficacy of Erbium, Chromium: Yttrium-Scandium- Gallium-Garnet Laser against *Candida Albicans*." *Photomedicine and Laser Surgery* 28 (Suppl. 1): 73-78.
<https://doi.org/10.1089/pho.2010.2780>.
- Pan J., Sun K., Liang Y., Sun P., Yang X., Wang J., Zhang J., Zhu W., Fang J., Becker K. H. (2013). "Cold Plasma Therapy of a Tooth Root Canal Infected with *Enterococcus Faecalis* Biofilms in Vitro." *Journal of Endodontics* 39 (1): 105–10.
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.08.017>.

- Paqué F., Balmer M., Attin T., Peters O. A. (2010). "Preparation of Oval-Shaped Root Canals in Mandibular Molars Using Nickel-Titanium Rotary Instruments: A Micro-Computed Tomography Study." *Journal of Endodontics* 36 (4): 703–7. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.12.020>.
- Partecke L. I., Evert K., Haugk J., Doering F., Normann L., Diedrich S., Weiss F. U., et al. (2012). "Tissue Tolerable Plasma (TTP) Induces Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells in Vitro and in Vivo." *BMC Cancer* 12: 12:473. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-473>.
- Pascon F. M., Kantovitz K. R., Sacramento P. A., Nobre-dos-Santos M., Puppini-Rontani R. M. (2009). "Effect of sodium hypochlorite on dentine mechanical properties. A review." *J Dent.* 37(12): 903-8. doi: 10.1016/j.jdent.2009.07.004.
- Pereira D. F. A., Seneviratne C. J., Koga-Ito C. Y., Samaranyake L. P. (2018). "Is the Oral Fungal Pathogen *Candida Albicans* a Cariogen?" *Oral Diseases* 24 (4): 518–26. <https://doi.org/10.1111/odi.12691>.
- Peters L. B., Wesselink P. R. (2002). "Periapical Healing of Endodontically Treated Teeth in One and Two Visits Obturated in the Presence or Absence of Detectable Microorganisms." *International Endodontic Journal* 35 (8): 660–67. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2002.00541.x>.
- Peters O. A., Schönenberger K., Laib A. (2001). "Effects of Four Ni-Ti Preparation Techniques on Root Canal Geometry Assessed by Micro Computed Tomography." *Int Endod J* 34 (3): 221–30. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2001.00373.x>.
- Prasad R., Ghannoum M. A. (1996). "Lipids of Pathogenic Fungi.", 243–246. CRC Press.
- Preissner S., Kastner I., Schütte E., Hartwig S., Schmidt-Westhausen A. M., Paris S., Preissner R., Hertel M. (2016). "Adjuvant Antifungal Therapy Using Tissue Tolerable Plasma on Oral Mucosa and Removable Dentures in Oral Candidiasis Patients: A Randomised Double-Blinded Split-Mouth Pilot Study." *Mycoses* 59 (7): 467–75. <https://doi.org/10.1111/myc.12495>.
- Punmia-Moorthy A. (1987). "Evaluation of PH Changes in Inflammation of the Subcutaneous Air Pouch Lining in the Rat, Induced by Carrageenan, Dextran and *Staphylococcus Aureus*." *Journal of Oral Pathology & Medicine* 16 (1): 36–44. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1987.tb00674.x>.
- Ramage G., Saville S. P., Thomas D. P., López-Ribot J. L. (2005). "Candida Biofilms: An Update." *Eukaryotic Cell* 4 (4): 633–38. <https://doi.org/10.1128/EC.4.4.633-638.2005>.
- Ramage G., Vandewalle K., Wickes B. L., López-Ribot J. L. (2001). "Characteristics of Biofilm Formation by *Candida Albicans*." *Revista Iberoamericana de Micología* 18 (4): 163–70.
- Reeder J. C., Ganguli L. A., Drucker D. B., Keaney M. G., Gibbs A. C. (1989). "The Improved Recovery of *Candida Albicans* from Fluid Culture Media." *Microbios.* 60 (243): 71–77.

- Reuter S., von Woedtke T., Weltmann K. D. (2018). "The KINPen - A Review on Physics and Chemistry of the Atmospheric Pressure Plasma Jet and Its Applications." *Journal of Physics D: Applied Physics* 51. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aab3ad>.
- Rikimaru T., Kondo M., Kondo S., Oizumi K. (2000). "Efficacy of Common Antiseptics against Mycobacteria." *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 4 (6): 570–76.
- Roberts W. E., Mangum J. E., Schneider P. M. (2022). "Pathophysiology of Demineralization, Part II: Enamel White Spots, Cavitated Caries, and Bone Infection." *Current Osteoporosis Reports* 20 (1): 106–19. <https://doi.org/10.1007/s11914-022-00723-0>.
- Sampaio A. A., Souza S. E., Ricomini-Filho A. P., Del Bel Cury A. A., Cavalcanti Y. W., Cury J. A. (2019). "Candida Albicans Increases Dentine Demineralization Provoked by Streptococcus Mutans Biofilm." *Caries Research* 53 (3): 322–31. <https://doi.org/10.1159/000494033>.
- Schaudinn C., Jaramillo D., Freire M. O., Sedghizadeh P. P., Nguyen A., Webster P., Costerton J. W., Jiang C. (2013). "Evaluation of a Nonthermal Plasma Needle to Eliminate Ex Vivo Biofilms in Root Canals of Extracted Human Teeth." *Int Endod J* 46 (10): 930–37. <https://doi.org/10.1111/iej.12083>.
- Schmidt A., von Woedtke T., Stenzel J., Lindner T., Polei S., Vollmar B., Bekeschus S. (2017). "One Year Follow-up Risk Assessment in SKH-1 Mice and Wounds Treated with an Argon Plasma Jet." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (4): 868. <https://doi.org/10.3390/ijms18040868>.
- Secilmis A., Dilber E., Gokmen F., Ozturk N., Telatar T. (2011). "Effects of Storage Solutions on Mineral Contents of Dentin." *Journal of Dental Sciences* 6 (4): 189–94. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2011.09.001>.
- Sen B. H., Piskin B., Demirci T. (1995). "Observation of Bacteria and Fungi in Infected Root Canals and Dentinal Tubules by SEM." *Dental Traumatology* 11 (1): 6–9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1995.tb00671.x>.
- Sen B. H., Akdeniz B. G., Denizci A. A. (2000). "The Effect of Ethylenediamine-Tetraacetic Acid on Candida Albicans." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 90 (5): 651–55. <https://doi.org/10.1067/moe.2000.109640>.
- Sen B. H., Safavi K. E., Spangberg L. S. W. (1997). "Colonization of Candida Albicans on Cleaned Human Dental Hard Tissues." *Arch Oral Biol* 42 (7): 513–20. doi: 10.1016/s0003-9969(97)00026-5.
- Sen B. H., Safavi L. S. W., Spångberg L. S. W. (1997a). "Growth Patterns of Candida Albicans in Relation to Radicular Dentin." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 84 (1): 68–73. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(97\)90298-5](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(97)90298-5).
- Sen B. H., Safavi K. E., Spångberg L. S. W. (1999). "Antifungal Effects of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine in Root Canals." *Journal of Endodontics* 25 (4): 235–38. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(99\)80149-6](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(99)80149-6).

- Sharp G., Green S., Rose M. (2016). "Chlorhexidine-Induced Anaphylaxis in Surgical Patients: A Review of the Literature." *ANZ Journal of Surgery* 86 (4): 237–43. <https://doi.org/10.1111/ans.13269>.
- Shinde R. B., Raut J. S., Karuppayil M. S. (2012). "Biofilm Formation by *Candida Albicans* on Various Prosthetic Materials and Its Fluconazole Sensitivity: A Kinetic Study." *Mycoscience* 53 (3): 220–26. <https://doi.org/10.1007/s10267-011-0155-y>.
- Siqueira J. F., Rôças I. N. (2005). "Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic Infections: Part 2 - Redefining the Endodontic Microbiota." *Journal of Endodontics* 31 (7): 488–98. <https://doi.org/10.1097/01.don.0000157990.86638.49>.
- Siqueira J. F., Rôças I. N., Lopes H. P., Elias C. N., de Uzeda M. (2002). "Fungal Infection of the Radicular Dentin." *Journal of Endodontics* 28 (11): 770–73. <https://doi.org/10.1097/00004770-200211000-00006>.
- Sjögren U., Hägglund B., Sundqvist G., Wing K. (1990). "Factors Affecting the Long-Term Results of Endodontic Treatment." *Journal of Endodontics* 16 (10): 498–504. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(07\)80180-4](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(07)80180-4).
- Slutzky-Goldberg I., Maree M., Liberman R., Heling I. (2004). "Effect of Sodium Hypochlorite on Dentin Microhardness." *Journal of Endodontics* 30 (12): 880–82. <https://doi.org/10.1097/01.DON.0000128748.05148.1E>.
- Song W., Wang H., Chen J. (2011). "Candida Albicans Sfl2, a Temperature-Induced Transcriptional Regulator, Is Required for Virulence in a Murine Gastrointestinal Infection Model." *FEMS Yeast Research* 11 (2): 209–22. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00710.x>.
- Spoorthy E., Velmurugan N., Ballal S., Nandini S. (2013). "Comparison of Irrigant Penetration up to Working Length and into Simulated Lateral Canals Using Various Irrigating Techniques." *International Endodontic Journal* 46 (9): 815–22. <https://doi.org/10.1111/iej.12065>.
- Spratt D. A., Pratten J., Wilson M., Gulabivala K. (2001). "An in Vitro Evaluation of the Antimicrobial Efficacy." *International Endodontic Journal* 34 (4): 300-07. <https://doi: 10.1046/j.1365-2591.2001.00392.x>.
- Stancampiano A., Forgione D., Simoncelli E., Laurita R., Tonini R., Gherardi M., Colombo V. (2019). "The Effect of Cold Atmospheric Plasma (CAP) Treatment at the Adhesive-Root Dentin Interface." *The Journal of Adhesive Dentistry* 21 (3): 229–37. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a42521>.
- Sudbery P., Gow N., Berman J. (2004). "The Distinct Morphogenic States of *Candida Albicans*." *Trends in Microbiology* 12 (7): 317–24. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.05.008>.
- Sun X., Li S., Wang S., Luo C., Hou B. (2018). "The Evaluation of *E. Faecalis* Colonies Dissolution Ability of Sodium Hypochlorite in Microenvironment by a Novel Device." *Biomedical Microdevices* 20 (2). <https://doi.org/10.1007/s10544-018-0279-3>.

- Sundqvist G. (1992). "Ecology of the Root Canal Flora." *Journal of Endodontics* 18 (9): 427–30. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)80842-3](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)80842-3).
- Sundqvist G. (1994). "Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity of the Root Canal Flora." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 78 (4): 522–30. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(94\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0030-4220(94)90047-7).
- Sundqvist G., Figdor D., Persson S., Sjögren U. (1998). "Microbiologic Analysis of Teeth with Failed Endodontic Treatment and the Outcome of Conservative Re-Treatment." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 85 (1): 86–93. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(98\)90404-8](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(98)90404-8).
- Sundstrom P. (1999). "Adhesins in *Candida Albicans*." *Current Opinion in Microbiology* 2 (4): 353–57. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80062-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80062-9).
- Swimberghe R. C. D., Coenye T., de Moor R. J. G., Meire M. A. (2019). "Biofilm Model Systems for Root Canal Disinfection: A Literature Review." *International Endodontic Journal* 52 (5): 604–28. <https://doi.org/10.1111/iej.13050>.
- Tanaka H., Iseki S., Nakamura K., Hayashi M., Kondo H., Kajiyama H., Kano H., Kikkawa F., Hori M. (2012). "Selective Killing of Ovarian Cancer Cells through Induction of Apoptosis by Nonequilibrium Atmospheric Pressure Plasma." *MRS Online Proceedings Library* 1469: 9-14. <https://doi.org/10.1063/1.3694928>.
- Tasaki T., Ohshima T., Usui E., Ikawa S., Kitano K., Maeda N., Momoi Y. (2017). "Plasma-Treated Water Eliminates *Streptococcus Mutans* in Infected Dentin Model." *Dental Materials Journal* 36 (4): 422–28. <https://doi.org/10.4012/dmj.2016-358>.
- Tay F. R., Gu L. S., Schoeffel G. J., Wimmer C., Susin L., Zhang K., Arun S. N., Kim J., Looney S. W., Pashley D. H. (2010). "Effect of Vapor Lock on Root Canal Debridement by Using a Side-Vented Needle for Positive-Pressure Irrigant Delivery." *Journal of Endodontics* 36 (4): 745–50. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.11.022>.
- Thavarajah R., Mudimbaimannar V. K., Elizabeth J., Rao U. K., Ranganathan K. (2012). "Chemical and Physical Basics of Routine Formaldehyde Fixation." *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 16 (3): 400–405. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.102496>.
- Thein Z. M., Samaranayake Y. H., Samaranayake L. P. (2007). "In Vitro Biofilm Formation of *Candida Albicans* and Non-*Albicans Candida* Species under Dynamic and Anaerobic Conditions." *Archives of Oral Biology* 52 (8): 761–67. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.01.009>.
- Thiele L., Hickel R., Folwaczny M. (2003). "Der Endodontische Misserfolg – von der Definition zur Strategie." *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 58: 144–50.
- Tian Y. Y., Guo B., Zhang R., Yu X., Wang H., Hu T., Dummer P. M. H. (2012). "Root and Canal Morphology of Maxillary First Premolars in a Chinese Subpopulation Evaluated Using Cone-Beam Computed Tomography." *International Endodontic Journal* 45 (11): 996–1003. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2012.02059.x>.

- Tillmann A. T., Strijbis K., Cameron G., Radmaneshfar E., Thiel M., Munro C. A., MacCallum D. M., Distel B., Gow N. A. R., Brown A. J. P. (2015). "Contribution of Fdh3 and Glr1 to Glutathione Redox State, Stress Adaptation and Virulence in *Candida Albicans*." *PLoS ONE* 10 (6): 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126940>.
- de Toubes K. M. P. S., de Souza Côrtes M. I. D., de Abreu Valadares M. A., Fonseca L. C., Nunes E., Silveira F. F. (2012). "Comparative Analysis of Accessory Mesial Canal Identification in Mandibular First Molars by Using Four Different Diagnostic Methods." *Journal of Endodontics* 38 (4): 436–41. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.12.035>.
- Uppuluri P., Chaturvedi A. K., Srinivasan A., Banerjee M., Ramasubramaniam A. K., Köhler J. R., Kadosh D., Lopez-Ribot J. L. (2010). "Dispersion as an Important Step in the *Candida Albicans* Biofilm Developmental Cycle." *PLoS Pathogens* 6 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000828>.
- Üreyen Kaya B., Kececi A. D., Güldaş H. E., Çetin E. S., Öztürk T., Öksüz L., Bozduman F. (2014). "Efficacy of Endodontic Applications of Ozone and Low-Temperature Atmospheric Pressure Plasma on Root Canals Infected with *Enterococcus Faecalis*." *Letters in Applied Microbiology* 58 (1): 8–15. <https://doi.org/10.1111/lam.12148>.
- Vianna M. E., Gomes B. P. F. A., Berber V. B., Zaia A. A., Ferraz C. C. R., de Souza-Filho F. J. (2004). "In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 97 (1): 79–84. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(03\)00360-3](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(03)00360-3).
- Violich D. R., Chandler N. P. (2010). "The Smear Layer in Endodontics - a Review." *International Endodontic Journal* 43 (1): 2–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2009.01627.x>.
- Wade W. G. (2013). "The Oral Microbiome in Health and Disease." *Pharmacological Research* 69 (1): 137–43. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.006>.
- Waltimo T. M. T., Sirén E. K., Ørstavik D., Haapasalo M. P. P. (1999). "Susceptibility of Oral *Candida* Species to Calcium Hydroxide in Vitro." *International Endodontic Journal* 32 (2): 94–98. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.1999.00195.x>.
- Waltimo T. M.T., Sirén E. K., Torkko H. L. K., Olsen I., Haapasalo M. P. P. (1997). "Fungi in Therapy-Resistant Apical Periodontitis." *International Endodontic Journal* 30 (2): 96–101. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.1997.00058.x>.
- Weiger R., el Ayouti A., Löst C. (2002). "Efficiency of Hand and Rotary Instruments in Shaping Oval Root Canals." *Journal of Endodontics* 28 (8): 580–83. <https://doi.org/10.1097/00004770-200208000-00004>.
- Weller R. N., Niemczyk S. P., Kim S. (1995). "Incidence and Position of the Canal Isthmus. Part 1. Mesiobuccal Root of the Maxillary First Molar." *Journal of Endodontics* 21 (7): 380–83. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)80975-1](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)80975-1).

- Wende K., Straßenburg S., Haertel B., Harms M., Holtz S., Barton A., Masur K., von Woedtke T., Lindequist U. (2014). "Atmospheric Pressure Plasma Jet Treatment Evokes Transient Oxidative Stress in HaCaT Keratinocytes and Influences Cell Physiology." *Cell Biology International* 38 (4): 412–25. <https://doi.org/10.1002/cbin.10200>.
- "Wichtige Information Zur Arzneimittelsicherheit von Octenisept® (Octenidindihydrochlorid, Phenoxyethanol) -Oedematöse Schwellungen Und Gewebeschädigungen Nach Einbringen Unter Druck in Stichwunden Bei Handchirurgischen Eingriffen." (2008) Schülke & Mayr GmbH
- Wolcott J., Ishley D., Kennedy W., Johnson S., Minnich S., Meyers J. (2005). "A 5 Yr Clinical Investigation of Second Mesio Buccal Canals in Endodontically Treated and Retreated Maxillary Molars." *Journal of Endodontics* 31 (4): 262–64. <https://doi.org/10.1097/01.don.0000140581.38492.8b>.
- Wu L., Mu Y., Deng X., Zhang S., Zhou D. (2012). "Comparison of the Effect of Four Decalcifying Agents Combined with 60°C 3% Sodium Hypochlorite on Smear Layer Removal." *Journal of Endodontics* 38 (3): 381–84. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.11.013>.
- Yoon J. G., Yoon J., Song J. Y., Yoon S. Y., Lim C. S., Seong H., Noh J. Y., Cheong H. J., Kim W. J. (2020). "Clinical Significance of a High SARS-CoV-2 Viral Load in the Saliva." *Journal of Korean Medical Science* 35 (20): e195. <https://doi.org/10.3346/jkms.2020.35.e195>.
- Zehnder M. (2006). "Root Canal Irrigants." *Journal of Endodontics* 32 (5): 389–98. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.09.014>.
- Zhang W., Torabinejad M., Li Y. (2003). "Evaluation of Cytotoxicity of MTAD Using the MTT-Tetrazolium Method." *Journal of Endodontics* 29 (10): 654–57. <https://doi.org/10.1097/00004770-200310000-00010>.
- Zhou X., Xiong Z., Cao Y., Lu X., Liu D. (2010). "The Antimicrobial Activity of an Atmospheric-Pressure Room-Temperature Plasma in a Simulated Root-Canal Model Infected with *Enterococcus Faecalis*." *IEEE Transactions on Plasma Science* 38 (12 part 2): 3370–74. <https://doi.org/10.1109/tps.2010.2078522>.
- Zimmermann J. L., Shimizu T., Schmidt H. U., Li Y. F., Morfill G. E., Isbary G. (2012). "Test for Bacterial Resistance Build-up against Plasma Treatment." *New Journal of Physics* 14. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/14/7/073037>.

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung I	Versiegelte Zahnwurzel und Zahnwurzel im Kunststoffblock	12
Abbildung II	Fließschema Ablauf der Probenpräparation.....	14
Abbildung III	Einzelkolonien des Stamms ACTT 10231 <i>C. albicans</i>	15
Abbildung IV	Schematischer Aufbau des kINPen08 (Kerlikowski 2020).....	16
Abbildung V	Zahnprobe unter der Plasmaquelle kINPen08	17
Abbildung VI	Fließschema Ablauf Probenentnahme zur Erhebung der CFU/ml ..	20
Abbildung VII	Anfertigung der Verdünnungsreihen.....	21
Abbildung VIII	Box Plot der log ₁₀ CFU/ml der einzelnen Behandlungen nach 6 und 12 min und den kombinierten Behandlungen	22
Abbildung IX	Streudiagramm der Behandlungsergebnisse nach Behandlungstagen unterteilt.....	23
Abbildung X	REM Gas 12 min	24
Abbildung XI	REM Negativkontrollen NaCl 6 min, Gas 6 min und Gas 12 min	25
Abbildung XII	REM NaOCl 6 min, NaOCl 12 min	26
Abbildung XIII	REM CHX 6 min und CHX 12 min.....	27
Abbildung XIV	REM OCT 6 min und OCT 12 min.....	28
Abbildung XV	REM Plasma 6 min und Plasma 12 min	29
Abbildung XVI	REM NaOCl + Plasma, CHX + Plasma und OCT + Plasma.....	30
Abbildung XVII	REM Sterilkontrolle und NaCl 12 min	31

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle I	Versuchsgruppen mit zugehörigen Behandlungsschemata	18 - 19
-----------	---	---------

11. Abkürzungen

Ø	Durchmesser
Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
Ca(OH) ₂	Kalziumhydroxid
CAP	cold atmospheric pressure plasma (kaltes Atmosphärendruckplasma)
CFU/ml	colony forming units pro millilitre (koloniebildende Einheiten pro Milliliter)
CHX	Chlorhexidin
DGZ	Deutsche Gesellschaft für Zahnerhaltung
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMF-T	decayed missing filled teeth
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EN	Europäische Norm
ISO	internationale Organisation für Normung
Mio.	Million
mM	Millimol je Liter
NaCl	Natriumchlorid
NaOCl	Natriumhypochlorit
OCT	Octenidin
REM	Rasterelektronenmikroskopie
Tab	Tabelle
TSB	Tryptic-Soja-Bouillon
UV	Ultraviolett
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose

12. Anhang

12.1. Publikation

Received: 5 June 2020 | Revised: 21 August 2020 | Accepted: 7 September 2020

DOI: 10.1002/jbio.202000221



FULL ARTICLE

JOURNAL OF
BIOPHOTONICS

Effects of cold atmospheric pressure plasma and disinfecting agents on *Candida albicans* in root canals of extracted human teeth

Anne Kerlikowski¹ | Rutger Matthes¹ | Christiane Pink¹ | Heike Steffen¹ |
Rabea Schlüter² | Birte Holtfreter¹ | Klaus-Dieter Weltmann³ |
Thomas von Woedtke^{3,4} | Thomas Kocher¹ | Lukasz Jablonowski^{1*}

¹Department of Restorative Dentistry, Periodontology, Endodontology, Preventive Dentistry and Pedodontics, Dental School, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany

²Imaging Center of the Department of Biology, University of Greifswald, Greifswald, Germany

³Department Plasma Life Science, Leibniz Institute for Plasma Science and Technology e.V., Greifswald, Germany

⁴Department of Hygiene and Environmental Medicine, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany

*Correspondence

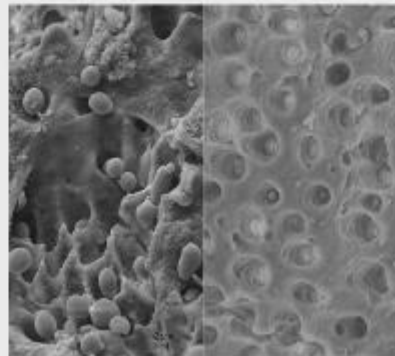
Lukasz Jablonowski, Department of Restorative Dentistry, Periodontology, Endodontology, Preventive Dentistry and Pedodontics, Dental School, University Medicine Greifswald, Rotgerberstr. 8, 17475 Greifswald, Germany.
Email: lukasz.jablonowski@uni-greifswald.de

Funding information

European Union, Grant/Award Number: ESF/IV-BM-B35-0010/13; Ministry of Education, Science and Culture of the State of Mecklenburg-Western Pomerania, Grant/Award Number: AU 11 038

Abstract

Reinfection in endodontically treated teeth is linked to the complexity of the root canal system, which is problematic to reach with conventional disinfection methods. As plasma is expected to have the ability to sanitize narrow areas, the aim of this study was to analyze the effect of cold atmospheric pressure plasma (CAP) on *Candida albicans* in root canals of extracted human teeth. CAP was applied as mono treatment and in combination with standard endodontic disinfectants (sodium hypochlorite, chlorhexidine and octenidine). Disinfection efficiency was evaluated as reduction of the logarithm of colony forming units per milliliter (\log_{10} CFU/mL) supported by scanning electron microscopy as imaging technique. Plasma alone showed the highest reduction of \log_{10} CFU, suggesting the best disinfection properties of all tested agents.



KEYWORDS

Candida albicans, cold atmospheric pressure plasma, human teeth, medical plasma, root canal

Abbreviations: *C. albicans*, *Candida albicans*; CAP, cold atmospheric plasma; CFU/ml, colony forming units per milliliter; CHX, chlorhexidine; *E. faecalis*, *Enterococcus faecalis*; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; OCT, octenidine; YPD, yeast extract peptone dextrose.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Journal of Biophotonics* published by Wiley-VCH GmbH.

1 | INTRODUCTION

A successful endodontic treatment highly depends on a sufficient reduction of the number of microorganisms [1]. Although after chemo-mechanic and medical preparation of the tooth a significant reduction of the microbial load could usually be achieved in the root canal [2], not all microorganisms are susceptible to conventional therapy [3] or can be reached by contemporary endodontic instruments. [4] In the majority of all treated roots, microbes remain in the root canal system [5] and may cause reinfection. Reinfection of the root canal system is linked to specific microorganisms. The most common bacteria in reinfected root canals are *Enterococcus faecalis* [6] and the most commonly found fungus is *Candida albicans* [7]. *C. albicans* belongs to the commensal flora in some humans' gastro-intestinal tracts [8] but may become infectious in patients whose immune system is suppressed or whose microbiome is unbalanced [9]. *C. albicans* is not susceptible to standard drugs in endodontic therapy, like calcium hydroxide [3]. Dentine tubules act as reservoirs for reinfection of *C. albicans* [10].

Because *C. albicans* is linked to reinfection of the root canal, it is desirable to find additional therapeutic options to reduce the load of *C. albicans*.

Cold atmospheric plasma (CAP) shows potential to become a promising tool in a number of applications in dentistry including inactivation of oral pathogens, the treatment of periodontitis, gingival wound healing, esthetic dentistry and cavity treatment [11]. Plasma is a gaseous matter in which molecules are divided into free electrons and ions. The charged carriers are able to move freely. Therefore, plasma can be formed by magnetic and electric fields [12]. CAP within physiological temperatures can be used on vital human tissue [13]. Gases frequently used to produce CAP are helium, argon, nitrogen, ambient air or mixtures of them [13]. Studies indicate a higher effectiveness when using an argon/oxygen [14] or argon/air mixture [15]. The effect of plasma is based on reactive oxygen and nitrogen species supported by electric field, temperature and radiation [16] and depends on of the liquid surroundings of the cells [13]. The composition of the plasma components can be controlled and therefore optimized according to the intended treatment optimized.

Plasma is able to reach narrow niches and hence able to reduce vital microorganisms in such reservoirs [17]; its endodontic effectiveness was frequently tested on *E. faecalis*. Experiments with CAP on *E. faecalis* showed satisfying but not overwhelming results both in disinfecting the root canal system as well as in disinfecting dentine tubules [17–20].

A former study from our lab reported a beneficial effect of an argon-plasma in combination with a disinfectant on monospecies (*Streptococcus mutans*) and multi-species (saliva, subgingival) dental biofilms on titanium discs [21]. It is unknown whether this beneficial effect also occurs in endodontic treatment.

This study analyses the effect of CAP with argon admixed 1% oxygen as working gas on *C. albicans* in human root canals in comparison to conventional disinfectants. In addition, the combination of conventional disinfectants with CAP is tested to investigate the potential additive effect of CAP treatment, and the influence of the test cycle was analyzed. The hypothesis of this study was that CAP treatment is more or comparable effective than the commonly used antiseptic solutions.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Specimens

Extracted human single rooted teeth (maxillary incisors and mandibular premolars) were used. They had to have neither caries within the root canal nor longitudinal cracks. The teeth were provided by the tooth bank of the Greifswald Dental School. The study was approved by the local ethics committee (BB 30/11).

The teeth were mechanically prepared up to ISO 30/06 (Flex Master, VDW, Munich, Germany) according to manufacturers' instructions and decoronated to a standard length of 15 mm. All teeth were sealed with nail varnish (Rival de Loop, Berlin, Germany) and embedded into plastic blocks (Technovit 4071, Heraeus Kulzer, Hanau, Germany). During the preparation period the teeth were stored in physiological saline solution (NaCl). Before starting the test series, detritus was removed through 2 minute ultrasonic baths (Elmasonic S 30 II, EMAG AG, Mörfelden-Walldorf, Germany) in 17% EDTA (University Pharmacy Greifswald, Germany) and subsequently in 3% sodium hypochlorite (NaOCl, Hedinger, Stuttgart, Germany). All specimens were autoclaved for initial sterility (2540 EK, Tuttnauer, Breda, Netherlands).

The root canals were filled to the edge with yeast extract peptone dextrose broth (YPD, Y1375-250 g, Sigma, Hamburg, Germany) inoculated with the strain *C. albicans* ATCC 10231 (Rockville, Maryland). The suspension's initial fungi concentration was 4×10^7 colony forming units per milliliter (CFU/mL). All specimens were incubated aerobically for 7 days at 37°C (incubator BE400, Memmert, Schwabach, Germany). All procedures were performed under sterile conditions (biological safety cabinet Herasafe KS 12, Thermo-Scientific, Waltham, Massachusetts).

2.2 | Plasma device and experimental groups of antiseptic treatments

The cold atmospheric-pressure plasma jet kINPen 08 (INP, Greifswald, Germany) was used as plasma source [22, 23]. The argon gas flow was set to 5 slm (standard liters per minute) with an admixture of 1% oxygen (Plasma/O₂). The flow rate was controlled by a flow controller (MKS Instruments, Munich, Germany). The tip of the plasma device was placed 1 to 2 mm apart from the canal entrance (Figure S1).

The specimens were sorted randomly into 15 groups containing 10 teeth each (Table 1). For mono treatments, teeth of six groups were treated for 6 min and teeth of additional six groups were treated for 12 min with 0.9% NaCl (negative control), gas, 2% chlorhexidine (CHX), 5.25% NaOCl, 0.1% octenidine (OCT), and plasma/O₂, respectively. The combined teeth treatments of the three remaining groups were carried out with (a) CHX and plasma/O₂, (b) NaOCl and plasma/O₂ and (c) OCT and plasma/O₂. At first, the chemical agent was applied for 6 min, followed by the plasma/O₂ treatment for another period of 6 min. Altogether 150 teeth were tested. For practical reasons, the experiment was divided into four identical test cycles, spread over 4 weeks. The 16 additional teeth for scanning electron microscopy were chosen randomly and treated in a separate cycle. Chemical agents were applied directly into the root canal with a sterile gauge needle (B. Braun, Melsungen, Germany). After the treatment OCT and CHX were neutralized for 20 min with 20% Lipofundin MCT (B. Braun, Melsungen, Germany) and NaOCl with an inactivator solution containing 96.1% YPD Broth, 3% Tween 80, 0.1% histidine, 0.3% Lecithin and 0.5% sodium thiosulfate. The inactivator was

certified by the quantitative suspension test of DIN EN 1040 (German Institute for Standardization). Roots treated with a combination of chemical agent and subsequent plasma/O₂ treatment were neutralized after the treatment with plasma/O₂ to investigate potential enhancing effects of plasma/O₂ on chemical disinfection.

After each treatment, the decade logarithms of the colony forming units per ml (CFU/mL) were assessed. To obtain the content of each root canal, the canal was brushed with five sterile paper points (ISO 30, Loser & Co, Leverkusen, Germany). The material on the paper points was dissolved in 1 mL sterile 0.9% NaCl solution. From this suspension, a serial dilution in 0.9% NaCl solution was prepared and 100 µL of the dilutions from 10⁻⁵ to 10⁻⁷ were plated on YPD-agar (Y1500-250 g, Sigma, Hamburg, Germany). After incubation at 37°C for 48 hours the CFU were counted to recalculate the log₁₀ CFU/mL for statistical analyses.

2.3 | Statistics

CFU values were log₁₀ transformed (referred to as log₁₀ CFU). Means and SD were reported. First, for treatment periods of 6 min, we tested whether log₁₀ CFU values after mono treatment procedures were significantly lower compared to log₁₀ CFU values of the negative control using one-sided unpaired *t* tests. Then, the effects of mono treatment procedures (ref. NaCl) on log₁₀ CFU values were further quantified using linear regression analyses. Linear regression coefficients (B) and 95% confidence intervals (CI) were reported. To detect significant effect differences between mono

TABLE 1 Description of treatment groups and exposure times

Mono treatment	Exposure time	Treatment
Negative control	6 min, 12 min	NaCl (0.9%)
Gas	6 min, 12 min	Non-ignited mixture of argon and 1% oxygen
NaOCl	6 min, 12 min	NaOCl (5.25%)
CHX	6 min, 12 min	Chlorhexidine (2%)
OCT	6 min, 12 min	Octenidine (0.1%)
Plasma/O ₂	6 min, 12 min	Argon +1% oxygen plasma
Combined treatment		
NaOCl + plasma/O ₂	12 min	6 min NaOCl (5.25%) followed by 6 min argon +1% oxygen plasma
CHX + plasma/O ₂	12 min	6 min CHX (2%) followed by 6 min argon +1% oxygen plasma
OCT + plasma/O ₂	12 min	6 min OCT (0.1%) followed by 6 min argon +1% oxygen plasma

Note: Each group comprises 10 teeth.

treatment procedures, posthoc linear combinations were calculated. Second, for mono treatment procedures it was tested whether \log_{10} CFUs values after treatment periods of 12 minutes were lower compared to \log_{10} CFU values after treatment periods of 6 minutes using one-sided unpaired *t* tests. Third, for treatment periods of 12 minutes, it was tested whether \log_{10} CFU values of mono and combined procedures were lower compared to \log_{10} CFU values of the negative control using one-sided unpaired *t* tests. Afterward, the effects of mono treatment procedures (ref. NaCl) on \log_{10} CFU values were further quantified using multilevel linear regression analyses including a random factor for examination day ($P = .0015$ from Likelihood Ratio test, favoring multilevel over ordinary linear model). To detect significant effect differences between plasma/O₂ and combined treatment procedures, posthoc linear combinations were calculated.

To adjust for multiple testing within each step, *P* values were corrected according to Bonferroni. Statistical differences were considered significant if $P < .05$. All statistical analyses were performed with Stata/SE Version 14.1 (StataCorp LP, Texas, USA).

2.4 | Scanning electron microscopy

One specimen per treatment group was notched with a microtome (Leica SP 1600, Leica Biosystems, Nußloch, Germany) without opening the root canal and then split into half. Each specimen was fixed (1% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde, 0.2% picric acid, 50 mM NaN₃ in 5 mM HEPES) for 1 hour at room temperature and then stored at 4°C until further processing. After that, samples were treated with 2% tannic acid in buffer (100 mM cacodylate buffer [pH 7.0], 1 mM CaCl₂, 50 mM NaN₃) for 1 hour, with 1% osmium tetroxide in buffer for 1 hour, and 1% thiocarbohydrazide for 30 min at room temperature—with washing steps in between. After

treatment with 1% osmium tetroxide in buffer over night at 4°C, the samples were dehydrated in a graded series of aqueous ethanol solutions (10%, 30%, 50%, 70%, 90% 100%) on ice for 15 minute each step. Before the final change of 100% ethanol, samples were allowed to reach room temperature and then critical point-dried with liquid CO₂. Finally, samples were mounted on aluminum stubs, sputtered with gold/palladium and examined with a scanning electron microscope EVO LS10 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Germany). Scanning electron micrographs were taken from the transition zone between upper and middle third of the teeth and illustrate the effects after 6 minute treatment time. All micrographs were edited by using Adobe Photoshop CS6.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

Plasma/O₂ treatment achieved the highest \log_{10} CFU reduction rates, both after 6 and 12 minute treatment time (Tables 2-4).

TABLE 3 \log_{10} CFU values for different treatments comparing 6 with 12 min treatment time

Treatment	6 min	12 min	<i>P</i> ^a value
Negative control	6.79 ± 0.35	6.55 ± 0.56	0.81
Gas	6.81 ± 0.33	6.73 ± 0.25	0.99
NaOCl	5.33 ± 0.76	5.14 ± 0.83	0.99
CHX	5.57 ± 0.38	5.60 ± 0.27	0.99
OCT	5.51 ± 0.50	5.22 ± 0.67	0.84
Plasma/O ₂	4.65 ± 0.84	3.84 ± 1.38	0.40

Note: Means ± SD are given.

Abbreviations: CFU, colony forming unit; CHX, chlorhexidine; OCT, octenidine.

^aOne-sided unpaired *t* test, *P*-values corrected according to Bonferroni.

Treatment	\log_{10} CFU/mL	<i>P</i> ^a value versus NaCl	B (95% CI)
Negative control	6.79 ± 0.35	—	0.00 (ref.)
Gas	6.81 ± 0.33	0.99	0.02 (-0.48; 0.53)
NaOCl	5.33 ± 0.76	<0.001	-1.46 (-1.96; -0.95)
CHX	5.57 ± 0.38	<0.001	-1.22 (-1.73; -0.72)
OCT	5.51 ± 0.50	<0.001	-1.27 (-1.78; -0.76)
Plasma/O ₂	4.65 ± 0.84	<0.001	-2.13 (-2.64; -1.63)

Note: Means ± SD and linear regression coefficients (B) with 95% confidence intervals (CI) are given, indicating treatment effects compared to NaCl.

Abbreviations: CFU, colony forming unit; CHX, chlorhexidine; OCT, octenidine.

^aTwo-sided unpaired *t* test, *P*-values corrected according to Bonferroni.

TABLE 2 \log_{10} CFU values of *Candida albicans* after 6 min treatment according to different procedure compared to the negative control

3.1 | Comparison of CFUs after 6 minute treatment time with the negative control

After treatment time of 6 minute, \log_{10} CFUs/mL were significantly lower for plasma/O₂ (4.65 ± 0.84 , $P < .001$), NaOCl (5.33 ± 0.76 , $P < .001$), OCT (5.51 ± 0.5 , $P < .001$) and CHX (5.57 ± 0.38 , $P < .001$) compared to NaCl ($6.79 \pm 0.35 \log_{10}$ CFU). Gas (6.81 ± 0.33 , $P = .999$) achieved no significant reduction of CFUs. Plasma/O₂ obtained the highest reduction of CFU ($-2.13 \log_{10}$ CFU) within this group (Table 2). Post hoc analyses indicated a significantly larger reduction of \log_{10} CFUs by plasma/O₂ than by NaOCl, CHX and OCT ($P = .01$).

3.2 | Comparison of CFUs after 6 and 12 minute treatment times

Neither a chemical agent nor plasma/O₂ achieved significantly lower CFUs after 12 minute of treatment

compared to 6 minute of treatment. Still, plasma/O₂ showed the highest reduction of CFUs (-0.81 , $P = .4$) after 12 minute treatment (3.84 ± 1.38) when compared to 6 minute treatment (4.65 ± 0.84) (Table 3).

3.3 | Comparison of CFUs after 12 minute treatment time after combined and mono plasma/O₂ treatment with the negative control

After application of 12 minute treatment, \log_{10} CFUs were significantly lower for plasma/O₂ (3.84 ± 1.38 , $P < .001$), NaOCl (5.14 ± 0.83 , $P < .001$), OCT (5.22 ± 0.67 , $P < .001$) and CHX (5.6 ± 0.27 , $P < .001$) compared to NaCl ($6.55 \pm 0.56 \log_{10}$ CFU). Gas did not achieve any significant reduction of CFU (6.73 ± 0.25 , $P = .999$). Plasma/O₂ obtained the highest reduction of CFU ($-2.71 \log_{10}$ CFU) after 12 minute of treatment.

TABLE 4 Comparison of \log_{10} CFU values of *Candida albicans* after 12 min treatment with mono and combined treatments

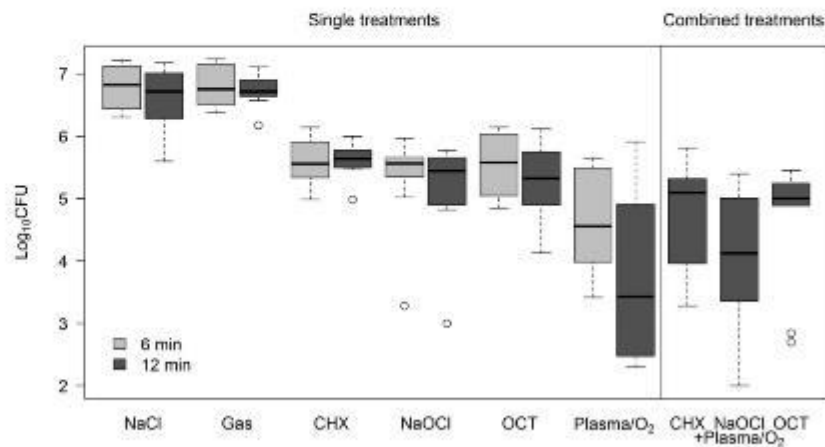
Treatment	\log_{10} CFU	P^a value versus NaCl	B (95% CI)
Negative control	6.55 ± 0.56	—	0 (ref.)
Gas	6.73 ± 0.25	0.99	0.17 (-0.58; 0.93)
NaOCl	5.14 ± 0.83	<0.001	-1.41 (-2.17; -0.66)
CHX	5.60 ± 0.27	<0.001	-0.95 (-1.70; -0.20)
OCT	5.22 ± 0.67	<0.001	-1.33 (-2.08; -0.58)
Plasma/O ₂	3.84 ± 1.38	<0.001	-2.71 (-3.49; -1.94)
NaOCl + Plasma/O ₂	4.09 ± 1.08	<0.001	-2.46 (-3.22; -1.71)
OCT + Plasma/O ₂	4.65 ± 1.01	<0.001	-1.90 (-2.65; -1.14)
CHX + Plasma/O ₂	4.65 ± 0.97	<0.001	-1.90 (-2.67; -1.12)

Note: Means \pm SD and linear regression coefficients (B) with 95% confidence intervals (CI) are given, indicating treatment effects compared to NaCl.

Abbreviations: CFU, colony forming unit; CHX, chlorhexidine; OCT, octenidine.

^aOne-sided unpaired *t* test, P -values corrected according to Bonferroni.

FIGURE 1 Box plot of mean \log_{10} CFU count sorted by treatment and treatment time (6 or 12 min). CFU, colony forming unit; CHX, chlorhexidine; OCT, octenidine



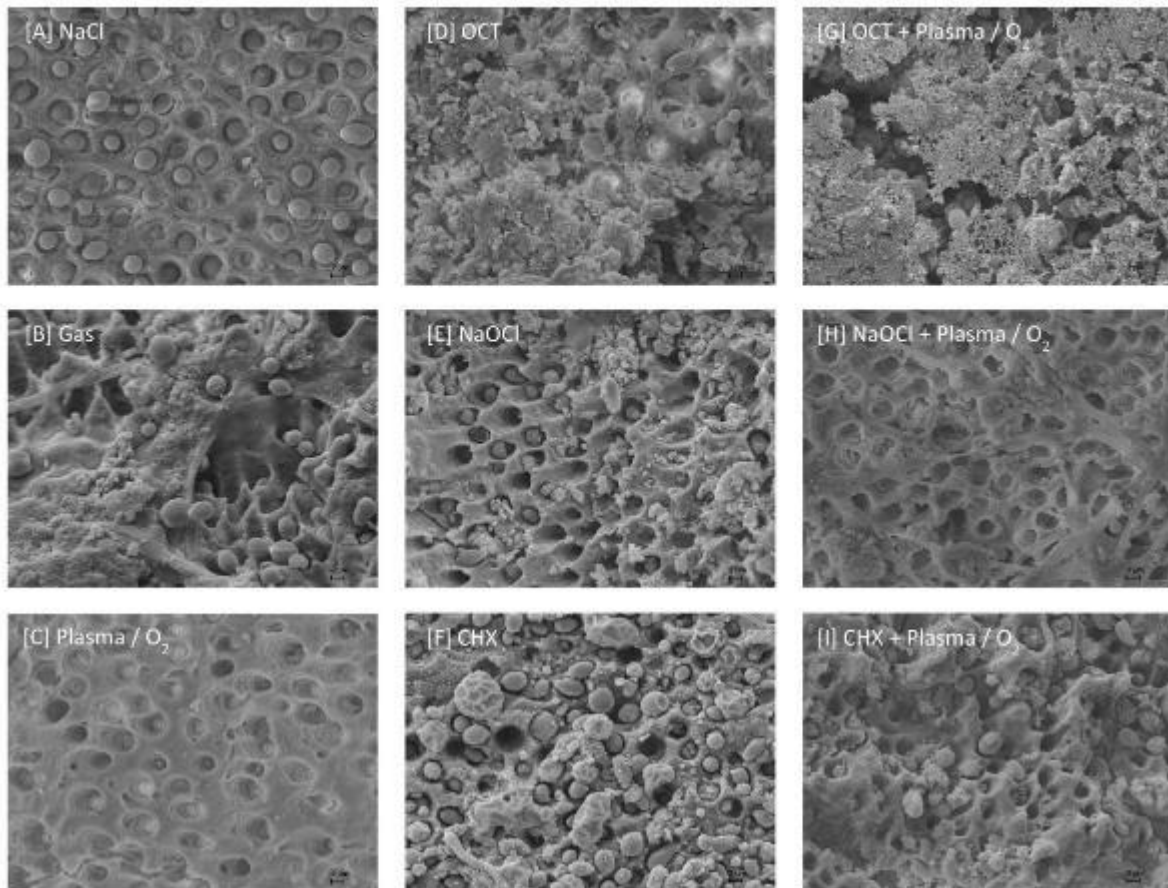


FIGURE 2 Scanning electron micrographs of the transition zone between the upper and the middle third of the root canal of extracted and *Candida albicans* infected teeth of the negative controls after 6 min treatment with A, 0.9% NaCl; B, gas (argon +1% oxygen) and C, plasma/O₂, of the positive controls after 6 min treatment with D, octenidine; E, NaOCl and F, chlorhexidine and of samples after combined treatment with G, octenidine and Plasma/O₂; H, NaOCl and plasma/O₂ and I, chlorhexidine and Plasma/O₂; CHX: chlorhexidine, OCT: octenidine, Scale bar = 2 μm

All combined treatments achieved significant reductions of log₁₀ CFU when compared to NaCl (NaOCl + plasma/O₂: 4.09 ± 1.08, $P < .001$; CHX + plasma/O₂: 4.65 ± 0.97, $P < .001$; OCT + plasma/O₂: 4.65 ± 1.01, $P < .001$) (Table 4). NaOCl + plasma/O₂ achieved the highest log₁₀ CFU reduction within combined treatments (Table 4). Post hoc analyses showed significantly less effects on log₁₀ CFUs for CHX + plasma/O₂ ($B = 0.82$ [0.14; 1.50]; $P = .019$) and OCT + plasma/O₂ ($B = 0.81$ [0.14; 1.47]; $P = .017$) as compared to plasma/O₂ alone.

3.4 | Influence of the test cycles

For combined treatments, test cycles 2 and 3 showed significantly higher reduction rates of log₁₀ CFU than

test cycles 1 and 4. In any test cycle, the SD was higher when using plasma/O₂ was used (±1.06 log₁₀ CFU) compared to chemical agents alone (±0.6 log₁₀ CFU) (Figure 1).

3.5 | Scanning electron microscopy

Scanning electron micrographs of treatment with NaCl and gas showed colonization by fungi within the dentinal tubules (Figure 2A and B). Some micrographs display a dense layer of extracellular matrix covering almost the complete surface of the root canal (Figure 2B, D, G).

The scanning electron micrographs of teeth treated with plasma/O₂ revealed a considerable reduction of cell number (Figure 2C).

Chemical agents seemed to affect the morphology of the cells. Treatment with CHX and NaOCl led to misshaping of the cells (Figure 2F,E). Larger amounts of extracellular matrix were preserved after treatment with OCT (Figure 2D). The cell number was reduced in Figure 2E,D.

Combined treatments revealed changes in the cell morphology similar to mono treatment with chemical agents. The cell number seemed to be reduced compared to negative controls and to NaOCl + plasma/O₂ and CHX + plasma/O₂-treated samples (Figure 2H,I). The greatest reduction in visible cell number among combined treatments was achieved after treatment with NaOCl + plasma/O₂ (Figure 2H). In concordance to mono treatments, OCT + plasma/O₂ displayed remaining extracellular matrix (Figure 2G).

3.6 | Discussion

The aim of the present study was to investigate the effectiveness of plasma/O₂ in reducing the cell count of *C. albicans* in root canals of extracted human teeth. In our experiments, 12 minute teeth treatment with plasma/O₂ was the most effective disinfecting treatment compared to the treatment time of 6 minute, conventional chemical agents and the combination of chemical agents with plasma/O₂, that confirm our hypothesis (Tables 2-4).

Our and other labs have reported a reduction of CFUs after the application of plasma/O₂ on *C. albicans* before [24–26]. Corresponding to our reduction rates (–2.13 log₁₀ CFU/mL after 6 minute, –2.71 log₁₀ CFU/mL after 12 minute), Handorf et al. achieved a reduction rate of –2 log₁₀ CFU/ml after 5 minute treatment time. [26] In contrast to this study, Handorf et al. used the kINPen09 with 99.99% argon gas on *C. albicans* biofilms grown on Sabouraud agar within 96-well plates. [26] Agar plates are flat surfaces that do not provide the cavity structure of natural teeth, which putatively acts as shelter for single cells diminishing CFU reduction. Duske et al. compared the disinfection capacity of different plasma sources on *Staphylococcus epidermidis* biofilms grown on cover slips, demonstrating a higher reduction rate using the kINPen08 compared to the kINPen09 or kINPenMED, which is one reason why our group favored the kINPen08 in this study [27]. Another reason is that we wanted to ensure comparability with our previous studies with the kINPen08 in the area of endodontics [17, 19]. The main difference between kINPen09, kINPenMED and kINPen08 is the higher power of the kINPen08 [27]. Since our results do not differ from the reduction rates achieved by Handorf et al. using a comparable plasma device on flat surfaces, we assume that a future version of the plasma source kINPen08 could be used as an adjuvant treatment in endodontics and suitable

instrument for root canal disinfection [26]. At the moment it is a pure laboratory device, which is not intended for clinical use.

In former experiments on dental biofilms grown on titanium discs Koban et al. observed a significant additive effect when applying combined treatments [21]. In contrast, Hübner et al. as well as this study did not show any beneficial effect of combined treatments [19]. Both latter studies used natural teeth with the disinfectant forming a liquid column in the tooth whereas on titanium discs the fluid formed a thin film. Both experimental setups illustrate different mechanisms. Koban et al. suspected an additive effect in the sense of destruction of the biofilm by the disinfecting agents and subsequent destruction of the cells by plasma [21]. In natural teeth we assume that the plasma effect is limited to the fluid. Plasma effects on disinfecting liquids are currently unknown. Experimental settings with water, saline solution and cell culture media indicated that plasma is leading to an acidification in liquids and an inlet of reactive oxygen and nitrogen species, with special emphasis on hydrogen peroxide (H₂O₂) [28]. It was also demonstrated repeatedly that such plasma-treated liquids are antimicrobially effective [20, 28–33]. In 2015, Simoncelli et al. demonstrated a relevant cell reducing effect of plasma activated water on *E. faecalis* in model root canals of artificial teeth. A relevant antimicrobial effect of plasma activated water could be demonstrated on planctonic *C. albicans*, as well. Nevertheless, they emphasized that the direct antimicrobial effect of the plasma source within the root canal is superior to the antimicrobial effect of plasma activated water, particularly in a dry environment. In addition, plasma-activated water is a medication, whereas treatment with a medical device, such as a plasma source, also has advantages when it comes to further approval. For this reason, our study refrained from an investigation of the effects of plasma activated water on *C. albicans*.

Liquid disinfectants are susceptible to not reaching the apex due to their surface tension. Hence, reactive species in the disinfectant would not reach the apex either. This hypothesis is corroborated by the data. Each disinfectant in combination with plasma/O₂ showed reduction rates slightly higher than the chemical disinfectant alone, but significantly less reduction of CFU/mL than plasma/O₂ treatment. In a promising experimental setup on dentinal discs, Du et al. demonstrated a significant additive effect when adding 2% CHX into the gas inlet so that the gas and the chemical agent were excited at the same time [34]. Further experiments could give more insight into whether this set up is capable of exceeding the effect of plasma/O₂ in extracted teeth.

SEM showed no colonization in the dentinal tubules after using plasma/O₂. Similar effects were shown by

others and our working group [18, 19]. Unlike our CFU analysis, scanning electron micrographs indicate an additive effect of the combined therapies. We consider the data from of the CFU analysis more reliable, because pictures were taken only from the upper third of the root canals. Therefore, a surface-near effect that does not perpetuate deeper into the root canal could be depicted.

Antifungal activity of plasma/O₂ was time-dependent. Earlier studies could demonstrate similar observations [19, 26]. Previous studies indicated oxidation processes caused by reactive oxygen species to be responsible for the disinfecting effect of plasma [14]. With longer treatment time more reactive oxygen species reacted with the cell surfaces making a destruction of membrane molecules more probable, hence the time-dependent disinfection effect.

Our results indicate that plasma is a promising method in endodontic therapy, but some limitations were identified. Although plasma/O₂ was unambiguously identified as the technique with the highest disinfecting effect, the standard deviations among the results for all groups using plasma/O₂ were higher than for groups using chemical disinfectants alone. We assume that in our set-up the plasma jet could not reproducibly access all surfaces inside the root canal evenly. It has to be borne in mind that the plasma jet is positioned manually, thus our experimental method is prone to inaccuracies. The correct application angle decides on whether the plasma plume is drawn into the canal or swirls at its entrance, which is to be seen when using transparent plastic blocks. It appears to be necessary to design a plasma source or a guiding pin for the plasma plume that can be deeply inserted into the root canal. In an experiment of our lab a different plasma device (hairline plasma devices, plume length 15 mm) showed promising results to reach the apex of natural teeth [35]. Liang et al. tested a polytetrafluoroethylene filament with multiple radially emitted plasma plumes inserted into an agar tube (6 mm in length, 44 mm in diameter) [36]. The results indicated a significantly higher antimicrobial efficacy on *Bacillus aureus* than conventional axial plasma sources.

Anatomical niches, such as the apical region of the root canal, narrow side canals or deeper regions of dentinal tubules, are often responsible for reinfection. Unfortunately, these areas could not be scrutinized with our scanning electron micrographs or investigated with our CFU sample acquisition method. As expectations are for CAP to sanitize narrow areas more efficiently than conventional chemical agents, further studies have to concentrate on a more precise examination of those niches. Within our experimental set up the CFU reduction rates of the liquid disinfectants appeared to be unusually low. We have to assume, that the teeth dried out during the 7d incubation period despite the water saturation within the incubation chamber. It is

known that the wetting properties of dehydrated dentine deteriorate significantly [37]. This circumstance is not transferable to the clinical situation where the teeth are hydrated by saliva. Further research with molars and/or multispecies biofilms is needed. If CAP produces more reliable results in more complex root anatomies, an in vivo study is necessary to examine its clinical suitability.

4 | CONCLUSION

This study showed that plasma/O₂ treatment significantly reduced the number of living cells of *C. albicans* in extracted human teeth. Therefore, we assume it to be an effective extension to treatment options in endodontic therapy. Concerning the precise application of the plasma plume into the root canal, we emphasize the need of a plasma source that reliably extends into the entire root canal applicable even in the spatially limited oral cavity.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was conducted within the framework of "Plas-mamedical Research–New pharmaceutical and medical fields of application", particularly within the multi-disciplinary project "PlasmaDent".

The authors acknowledge that this work was supported by a grant funded by the Ministry of Education, Science and Culture of the State of Mecklenburg-Western Pomerania and European Union, European Social Fund Grant number: AU 11 038; ESF/IV-BM-B35-0010/13. The authors thank Kerstin Scholz and Stefan Bock for excellent technical assistance. Open access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Anne Kerlikowski was involved in conceptualization, investigation and writing of the original draft. Rutger Matthes and Lukasz Jablonowski were involved in conceptualization, investigation and reviewing/ editing of the article. Christiane Pink and Birte Holtfreter were involved in statistical analysis and reviewing of the article. Rabea Schlüter was involved in SEM analysis and reviewing of the article. Klaus-Dieter Weltmann, Thomas von Woedtke, Thomas Kocher and Heike Steffen were involved in reviewing and editing of the article.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Lukasz Jablonowski  <https://orcid.org/0000-0001-7155-6522>

REFERENCES

- [1] L. M. Lin, J. E. Skribner, P. Gaengler, *J. Endod.* **1992**, *18*(12), 625. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)81335-X](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)81335-X).
- [2] A. Law, H. Messer, *J. Endod.* **2004**, *30*(10), 689. <https://doi.org/10.1097/01.DON.0000129959.20011.EE>.
- [3] T. M. T. Waltimo, D. Ørstavik, E. K. Sirén, M. P. P. Haapasalo, *Int. Endod. J.* **1999**, *32*(6), 421. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.1999.00237.x>.
- [4] J. F. Siqueira, *J. Endod.* **1997**, *23*(8), 499. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(97\)80309-3](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(97)80309-3).
- [5] P. N. R. Nair, S. Henry, V. Cano, J. Vera, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2005**, *99*(2), 231. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2004.10.005>.
- [6] G. Sundqvist, D. Figdor, S. Persson, U. Sjögren, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **1998**, *85*(1), 86. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(98\)90404-8](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(98)90404-8).
- [7] T. M. T. Waltimo, E. K. Sirén, H. L. K. Torkko, I. Olsen, M. P. P. Haapasalo, *Int. Endod. J.* **1997**, *30*(2), 96. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.1997.00058.x>.
- [8] A. D. S. Dantas, A. Day, M. Ikeh, I. Kos, B. Achan, J. Quinn, *Bio-molecules* **2015**, *5*(1), 142. <https://doi.org/10.3390/biom5010142>.
- [9] B. Spellberg, *PLoS Pathog.* **2008**, *4*(2), 1. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040038>.
- [10] B. H. Sen, K. E. Safavfi, L. S. W. Spangberg, *Arch. Oral Biol.* **1997**, *42*(7), 513-520.
- [11] M. Gherardi, R. Tonini, V. Colombo, *Trends Biotechnol.* **2018**, *36*(6), 583-585. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.06.009>.
- [12] V. Arora, *Dentistry* **2013**, *04*(01), 1. <https://doi.org/10.4172/2161-1122.1000189>.
- [13] K. D. Weltmann, T. Von Woedtke, *Plasma Phys. Control. Fusion.* **2017**, *59*(1), 1-11. <https://doi.org/10.1088/0741-3335/59/1/014031>.
- [14] K. Fricke, I. Koban, H. Tresp, L. Jablonowski, K. Schröder, A. Kramer, K. D. Weltmann, T. von Woedtke, T. Kocher, *PLoS One* **2012**, *7*(8), 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042539>.
- [15] A. C. O. C. Doria, C. D. P. C. Sorge, T. B. Santos, J. Brandão, P. A. R. Gonçalves, H. S. Maciel, S. Khouri, R. S. Pessoa, *Rev. Bras. Eng. Biomed.* **2015**, *31*(4), 358. <https://doi.org/10.1590/2446-4740.01215>.
- [16] S. Bekeschus, A. Schmidt, F. Niessner, T. Gerling, K. D. Weltmann, K. Wende, *J. Vis. Exp.* **2017**, *2017* (129), 1-9. DOI: <https://doi.org/10.3791/56331>.
- [17] L. Jablonowski, I. Koban, M. H. Berg, E. Kindel, K. Duske, K. Schröder, K. D. Weltmann, T. Kocher, *Plasma Process. Polym.* **2013**, *10*(6), 499. <https://doi.org/10.1002/ppap.201200156>.
- [18] J. Pan, K. Sun, Y. Liang, P. Sun, X. Yang, J. Wang, J. Zhang, W. Zhu, J. Fang, K. H. Becker, *J. Endod.* **2013**, *39*(1), 105. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.08.017>.
- [19] A. Hüfner, H. Steffen, B. Holtfreter, R. Schlüter, K. Duske, R. Matthes, T. von Woedtke, K. D. Weltmann, T. Kocher, L. Jablonowski, *Plasma Process. Polym.* **2017**, *14*(3), 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1002/ppap.201600064>.
- [20] E. Simoncelli, D. Barbieri, R. Laurita, A. Liguori, A. Stancampiano, L. Viola, R. Tonini, M. Gherardi, V. Colombo, *Clin. Plasma Med.* **2015**, *3*(2), 77-86. <https://doi.org/10.1016/j.cpme.2015.11.001>.
- [21] I. Koban, M. H. Geisel, B. Holtfreter, L. Jablonowski, N.-O. Hübner, R. Matthes, K. Masur, K.-D. Weltmann, A. Kramer, T. Kocher, *ISRN Dent.* **2013**, *2013*, 1. <https://doi.org/10.1155/2013/573262>.
- [22] S. Reuter, T. Von Woedtke, K. D. Weltmann, *J. Phys. D Appl. Phys.* **2018**, *51*(23), 1-51. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aab3ad>.
- [23] K. D. Weltmann, E. Kindel, R. Brandenburg, C. Meyer, R. Bussiahn, C. Wilke, T. von Woedtke, *Contrib. Plasma Phys.* **2009**, *49*(9), 631. <https://doi.org/10.1002/ctpp.200910067>.
- [24] I. Koban, R. Matthes, N. O. Hübner, A. Welk, P. Meisel, B. Holtfreter, R. Sietmann, E. Kindel, K. D. Weltmann, A. Kramer, et al., *New J. Phys.* **2010**, *12*, 1-15. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/12/7/073039>.
- [25] T. Maisch, T. Shimizu, G. Isbary, J. Heinlin, S. Karrer, T. G. Klämpfl, Y. F. Li, G. Morfill, J. L. Zimmermann, *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*(12), 4242. <https://doi.org/10.1128/AEM.07235-11>.
- [26] O. Handorf, T. Weihe, S. Bekeschus, A. C. Graf, U. Schnabel, K. Riedel, J. Ehlbeck, *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*(21), 1. <https://doi.org/10.1128/AEM.01163-18>.
- [27] K. Duske, K. Wegner, M. Donnert, U. Kunert, A. Podbielski, B. Kreikemeyer, T. Gerling, K. D. Weltmann, B. Nebe, R. Bader, *Plasma Process. Polym.* **2015**, *12*(10), 1050. <https://doi.org/10.1002/ppap.201400176>.
- [28] H. Jablonowski, T. von Woedtke, *Clin. Plasma Med.* **2015**, *3*(2), 42. <https://doi.org/10.1016/j.cpme.2015.11.003>.
- [29] S. Ikawa, K. Kitano, S. Hamaguchi, *Plasma Process. Polym.* **2010**, *7*(1), 33. <https://doi.org/10.1002/ppap.200900090>.
- [30] M. Naitali, G. Kamgang-Youbi, J. M. Herry, M. N. Bellon-Fontaine, J. L. Brisset, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*(22), 7662. <https://doi.org/10.1128/AEM.01615-10>.
- [31] K. Oehmigen, J. Winter, M. Hähnel, C. Wilke, R. Brandenburg, K. D. Weltmann, T. Von Woedtke, *Plasma Process. Polym.* **2011**, *8*(10), 904. <https://doi.org/10.1002/ppap.201000099>.
- [32] R. Laurita, D. Barbieri, M. Gherardi, V. Colombo, P. Lukes, *Clin. Plasma Med.* **2015**, *3*(2), 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.cpme.2015.10.001>.
- [33] J. Julák, V. Scholtz, S. Kotúčová, O. Janoušková, *Phys. Medica* **2012**, *28*(3), 230. <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2011.08.001>.
- [34] T. Du, Q. Shi, Y. Shen, Y. Cao, J. Ma, X. Lu, Z. Xiong, M. Haapasalo, *J. Endod.* **2013**, *39*(11), 1438. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.06.027>.
- [35] R. Bussiahn, R. Brandenburg, T. Gerling, E. Kindel, H. Lange, N. Lembke, K. D. Weltmann, T. Von Woedtke, T. Kocher, *Appl. Phys. Lett.* **2010**, *96*(14), 2008. <https://doi.org/10.1063/1.3380811>.
- [36] Y. Liang, Y. Li, K. Sun, Q. Zhang, W. Li, W. Zhu, J. Zhang, J. Fang, *Plasma Process. Polym.* **2015**, *12*(10), 1086. <https://doi.org/10.1002/ppap.201580185>.
- [37] J. I. Rosales, G. W. Marshall, S. J. Marshall, L. G. Watanabe, M. Toledano, M. A. Cabrerizo, R. Osorio, *J. Dent. Res.* **1999**, *78*(9), 1554-1559. <https://doi.org/10.1177/00220345990780091001>.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Kerlikowski A, Matthes R, Pink C, et al. Effects of cold atmospheric pressure plasma and disinfecting agents on *Candida albicans* in root canals of extracted human teeth. *J. Biophotonics*. 2020; e202000221. <https://doi.org/10.1002/jbio.202000221>

12.2. Votum der Ethikkommission

ERNST MORITZ ARNDT
UNIVERSITÄT GREIFSWALD



Wissen
lockt.
Seit 1456

Medizinische Fakultät · Fleischmann Strasse 8 · D-17475 Greifswald

Herrn L. Jablonowski
Universitätsmedizin Greifswald
Poliklinik für Zahnerhaltung,
Parodontologie und Endodontologie
Walther-Rathenau-Str. 42a

D-17475 Greifswald

Votum der Ethikkommission

Titel der Studie: Untersuchungen zur Biofilmentfernung und
Charakterisierung der antimikrobiellen Wirkung
verschiedener Plasmaquellen an extrahierten Zähnen

Antrag vom: 24.02.2011

Eingegangen am: 28.02.2011

Reg.-Nr.: BB 30/11

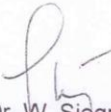
Sehr geehrter Herr Jablonowski,

die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald hat die zum o.g. Versuchsplan eingereichten Unterlagen in ihrer Sitzung am 29.03.2011 geprüft.

Die Kommission stellte mehrheitlich fest, dass gegen die Durchführung der Studie keine ethischen und rechtlichen Bedenken bestehen und befürwortet deshalb das Vorhaben.

Die Mitglieder der Kommission wünschen Ihnen viel Erfolg bei der Durchführung des Vorhabens.

Mit freundlichen Grüßen


Prof. Dr. W. Siegmund
Vorsitzender der Ethikkommission

Ethikkommission

GESCHÄFTSSTELLE
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Medizinische Fakultät
Ethikkommission
Institut für Pharmakologie
Friedrich-Löffler Strasse 23 d
D-17487 Greifswald

BEARBEITER
Frau Dr. K. Kindermann

DATUM: 30.03.2011

Telefon:
03834 – 86 5644

Telefax:
03834 – 86 5631

e-mail:
ethik@uni-greifswald.de

Internet:
www.medizin.uni-greifswald.de

Bankverbindung:
Deutsche Bundesbank Rostock
Konto-Nr. 130 015 30
BLZ 130 000 00

US: ID: DE137584813

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei **Herrn Prof. Dr. Thomas Kocher** für die Überlassung des überaus spannenden Themas und des Arbeitsplatzes, sowie die Unterstützung während des Veröffentlichungsprozesses bedanken.

An vorrangiger Stelle möchte ich **Herrn Dr. Lukasz Jablonowski** danken, der mich durch den gesamten Prozess der Forschungsarbeit und Promotion dauerhaft unterstützt hat und jederzeit als Ratgeber zur Verfügung stand. Ich bedanke mich für die sehr gute Betreuung, die Geduld und die immer freundliche und konstruktive Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin danke ich **Frau Dr. Birte Holtfreter und Frau Christiane Pink** für die überaus wertvolle Hilfe bei der statistischen Auswertung der Arbeit.

Ich danke **Frau Dr. Rabea Schlüter** für ihre fachliche Expertise und ihre Geduld bei der Anfertigung und Interpretation der REM-Aufnahmen.

Weiterhin danke ich der **Arbeitsgruppe PlasmaDent** und möchte insbesondere **Herrn Dr. Rutger Matthes** benennen, der stets mit Interesse und fachlich wertvollem Rat den Publikationsprozess begleitet hat.

Ebenso möchte ich **Kerstin Scholz** für die immer freundliche Hilfe bei den Versuchen im Labor danken.

Ich danke dem **INP Greifswald** für die Zurverfügungstellung der Plasmaquelle.

Ich möchte mich bei meinen **Ausbildern während des Zahnmedizinstudiums an der Universität Greifswald** bedanken, die mit einer wissenschaftlich und menschlich hervorragenden Ausbildung das Fundament der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit gelegt haben.

Ganz besonders danke ich meinen **Eltern**, die mich während meines langen Ausbildungsweges immens unterstützt haben und mir so die Möglichkeit gegeben haben mich frei und meinen Interessen folgend entwickeln zu können.

Ebenso wichtig ist mir der Dank bei meinem **Mann**, für sein unermüdliches Zuhören, seine Motivation und herausragende Hilfe. Ich danke ihm für seinen wissenschaftlichen Geist, der mir eine große Inspiration und Motivation ist.

Abschließend danke ich meiner **Tochter** für alle kleinen und großen Ablenkungen, in denen ich neue Kraft und Inspiration finde.