

***In vitro*-Studie zur Auswirkung von Kaltplasma
auf bakteriell-induzierte Infektionen
in parodontalen Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med. dent.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Lennard Seher

aus Essen

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: PD Dr. med. dent. Svenja Beisel-Memmert
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dipl.-phys. Christoph BouraueI

Tag der Mündlichen Prüfung: 03.09.2025

Aus der Klinik und Poliklinik für Kieferorthopädie des Zentrums für Zahn-, Mund-, und
Kieferheilkunde der Universität Bonn

Für mich

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	8
1.	Einleitung	11
1.1	Nicht-invasives physikalisches Plasma	11
1.1.1	Quellen des nicht-invasiven physikalischen Plasmas	13
1.1.2	Nicht-invasives physikalisches Plasma in medizinischen Anwendungen	15
1.2	Parodontium	17
1.2.1	Parodontale Ligamentzellen	18
1.2.2	Parodontitis	19
1.2.2.1	Parodontitistherapie	21
1.2.2.2	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	22
1.3	Die parodontale Wundheilung	24
1.3.1	Interleukin-6	25
1.3.2	Interleukin-8	26
1.4	Zielsetzung und Fragestellung	26
2.	Material und Methode	27
2.1	Material	27
2.1.1	Parodontale Ligamentzellen	27
2.1.2	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	27
2.1.3	Geräte	28
2.1.4	Verbrauchsmaterial, Plastik- und Glasware	30
2.1.5	Chemikalien	31
2.1.6	Medium, Puffer und Lösungen	32
2.1.7	Kits	34
2.1.8	Antikörper	35
2.1.8.1	ELISA	35
2.1.8.2	Immunfluoreszenz	35
2.1.9	Oligonukleotide	36
2.1.9.1	QuantiTect Primer Assays	36
2.2	Methode	36
2.2.1	Parodontale Ligamentzellen	36

2.2.1.1	Passagieren von parodontalen Ligamentzellen	37
2.2.1.2	Kryokonservierung	38
2.2.1.3	Auftauen von Zellen	38
2.2.2	<i>Fusobacterium nucleatum</i> -Stimulation	38
2.2.3	Plasma-Stimulation	39
2.2.4	Versuchsansatz	42
2.3	Genexpression in parodontalen Ligamentzellen	44
2.3.1	Analyse der mRNA	44
2.3.2	RNA-Isolation	44
2.3.3	Umwandlung der RNA in cDNA	45
2.3.4	Quantitative realtime-PCR	47
2.4	ELISA	48
2.4.1	Proteinanalyse ELISA	48
2.5	Immunfluoreszenzfärbung	49
2.5.1	Färbung zur Zellmorphologie und Lebensfähigkeit	49
2.5.2	Bestimmung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies	50
2.6	Statistische Auswertung	51
2.6.1	Software und Online-Tools	51
3.	Ergebnisse	52
3.1	Einfluss von nicht-invasivem physikalischem Plasma auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in parodontalen Ligamentzellen	52
3.2	Einfluss von nicht-invasivem physikalischem Plasma auf die Morphologie und die Lebensfähigkeit von parodontalen Ligamentzellen	54
3.3	Einfluss des <i>Fusobacterium nucleatum</i> s auf die Regulierung von Interleukin-6 und Interleukin-8 in parodontalen Ligamentzellen	55
3.4	Einfluss von nicht-invasivem physikalischem Plasma und <i>Fusobacterium nucleatum</i> auf die Regulierung von Interleukin-6 in parodontalen Ligamentzellen	57
3.5	Einfluss von nicht-invasivem physikalischem Plasma und <i>Fusobacterium nucleatum</i> auf die Regulierung von Interleukin-8 in parodontalen Ligamentzellen	58

4.	Diskussion	59
4.1	Plasma ONE-Gerät	59
4.2	Interleukin-6 und -8	60
4.3	<i>Fusobacterium nucleatum</i> und <i>In vitro</i> -Modell der Infektion	60
4.4	Wirkung des nicht-invasiven physikalischen Plasmas	62
5.	Zusammenfassung	64
6.	Abbildungsverzeichnis	66
7.	Tabellenverzeichnis	67
8.	Literaturverzeichnis	68
9.	Erklärung zum Eigenanteil	86
10.	Veröffentlichungen	87
11.	Danksagung	88

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine (Bovines Serumalbumin)
DBE	Dielektrische Barriereentladung
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate (Zyklisches Adenosinmonophosphat)
cDNA	Complementary DNA (Komplementäre DNA)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	Fetal bovine serum (Fetales Kälberserum)
<i>F.n.</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HCl	Chlorwasserstoff
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Hs	Homo sapiens
IL-1β	Interleukin-1β

IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
KCL	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
MOI	Multiplicity of infection (Multiplizität der Infektion)
mRNA	Messenger ribonucleic acid (Boten Ribonukleinsäure)
Na ₂ EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NIPP	Nicht-invasives physikalisches Plasma
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Stickstoffdioxid
O ₂ -	Hyperoxid
OD	Optische Dichte
OH-	Hydroxylradikal
ONOO-	Peroxinitrit-Anions
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat gepuffertes Salz)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDL	Parodontales Ligament
PDL-Zellen	Parodontale Ligament-Zellen
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pH	pondus Hydrogenii
RLT	RNeasy lysis tissue
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
ROS	Reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)
RONs	Reactive oxide and nitrogen species (Reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies)
rpm	Rounds per minute (Runden pro Minute)

Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

1. Einleitung

1.1 Nicht-invasives physikalisches Plasma

Es gibt viele Synonyme für den Begriff des „kalten Atmosphärendruckplasmas“ (engl. „cold atmospheric pressure plasma“). In der Literatur variieren die Bezeichnungen und die Definitionen für diese Art der Plasmaanwendung. Beispielsweise zu nennen sind „Kaltplasma“ oder „kaltes Plasma“, „Niedertemperaturplasma“ oder auch „körperwarmes Plasma“. In dieser Dissertation wird die Bezeichnung nicht-invasives physikalisches Plasma (NIPP) verwendet. Der Begriff beschreibt einen besonderen, angeregten Gaszustand, welcher neben den vertrauten drei Aggregatzuständen fest, flüssig und gasförmig oftmals als sogenannter „vierter Aggregatzustand“ bezeichnet wird (Hoffmann et al., 2013).

Die Prägung des Begriffes „Plasma“ für eine Gasentladung erfolgte im Jahr 1928 durch den US-amerikanischen Nobelpreisträger Irving Langmuir (Langmuir, 1928). Die Bezeichnung des physikalischen Phänomens des Plasmas hat eine Beziehung zu der zellfreien Blutkomponente (Metelmann et al., 2016). Die Entladung wirkt wie ein Medium, welches Teilchen (Ionen, freie Elektronen und angeregte Gasmoleküle) transportiert. Dieser Transport erinnerte Irving Langmuir an die Art, wie Blutplasma rote und weiße Blutkörperchen sowie Keime transportiert. So schlug er vor, die Entladung als „Plasma“ zu bezeichnen (Mott-Smith, 1971).

Physikalisches Plasma ist ein ionisiertes, hochreaktives Gasmisch. Es setzt sich aus geladenen Teilchen (Ionen), elektrisch neutralen Teilchen (Atomen, Molekülen), freien Elektronen sowie Photonen, Radikalen und elektromagnetischer Strahlung zusammen (Lendeckel et al., 2015). Diese Komponenten befinden sich in ständiger Wechselwirkung sowohl untereinander als auch mit ihrer Umgebung (Moisan et al., 2001). Kaltplasma wird nur unter bestimmten Bedingungen erzeugt. Die Entstehung ist abhängig von dem Druck, der Temperatur und der Energiezufuhr (Vajenine, 2010). Kalte Plasmen für technische Anwendungen werden in den meisten Fällen durch Anlegen eines elektrischen Feldes an ein neutrales Gas bzw. Gasmisch wie z.B. Luft oder Stickstoff erzeugt (von Woedtke et al., 2013). Die Phasenübergänge von fest, flüssig über gasförmig hin zum Plasma bedingen einer Energiezufuhr, z.B. in Form von Wärme oder elektrischen Feldern. Im

Rahmen der Phasenübergänge nimmt die Beweglichkeit der Atome und Moleküle stetig zu, bis im Plasmazustand die Elektronen aus den Atomen und Molekülen dissoziieren. Die Atome und Moleküle werden ionisiert. Durch diese freien beweglichen Elektronen und ionisierten Atome besitzt Plasma eine erhöhte Reaktivität sowie eine elektrische Leitfähigkeit und ist in der Lage, bakterielle und menschliche Zellen zu beeinflussen (Metelmann et al., 2016; von Woedtke et al., 2013). Die Wirksamkeit des Plasmas beruht auf weiteren Komponenten, diese setzen sich aus der UV-Strahlung, dem sichtbaren Licht, elektromagnetischen Feldern, der Wärmestrahlung und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zusammen. Jeder dieser Komponenten ist in der Lage eine Wirkung auf lebendige Organismen wie eine Zelle zu erzielen (von Woedtke et al., 2013). Bei der Plasmatherapie kommen diese Komponenten vermutlich gleichzeitig zur Anwendung, wobei die Hauptwirkung von der UV-Strahlung, den elektrischen Felder und den ROS erzielt wird (Gerling und Weltmann, 2016).

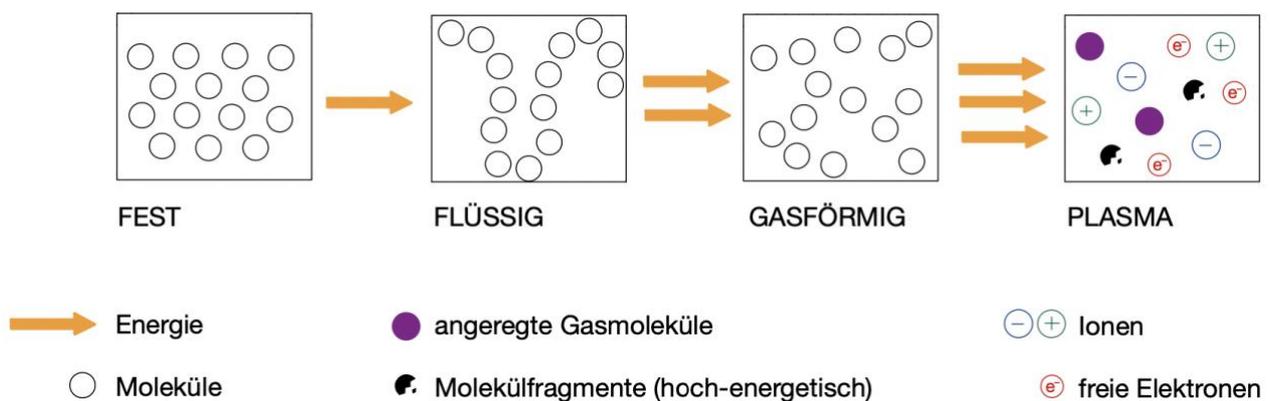


Abb. 1: Schematische Darstellung der Aggregatzustände.
(Modifiziert nach Metelmann et al., 2016)

Es werden Hochdruck-, Normaldruck- bzw. Atmosphärendruck- und Niederdruckplasma sowie heiße (thermische) und kalte (nicht-thermische) Plasmen unterschieden (Rehman et al., 2016; Weiss et al., 2015). Wenn auch die Plasmamedizin ein neues Forschungsgebiet darstellt, ist die Plasmatechnik bereits in unseren Alltag eingezogen. Beispielsweise zu nennen sind hier die Plasmafernseher und die Energiesparlampe (Suchentrunk et al., 1997). Bei den in der Natur vorkommenden Plasmaformen handelt es sich um heiße Plasmen mit Temperaturen bis zu mehreren Millionen Grad Celsius. Als Beispiele wären Sterne und Gewitterblitze zu nennen (Hoffmann et al., 2013).

1.1.1 Quellen des nicht-invasiven physikalischen Plasmas

In der medizinischen Anwendung werden hauptsächlich die Techniken des Plasmajets und der dielektrischen (elektrisch nicht-leitend) Barriereentladung (DBE) verwendet. Der Plasmajet verwendet Argon oder Helium als Arbeitsgas. Bei einer DBE wird in der Regel die Umgebungsluft verwendet. Ein Arbeitsgas kann optional zum Einsatz kommen (Hoffmann et al., 2013). Im Hinblick auf Temperatur und Druck des Trägergases variieren physikalische Plasmen. NIPP erzeugt Temperaturen unter 40 °C und gilt daher als besonders gewebeverträglich (Reuter et al., 2018). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden mit dem plasma ONE der plasma MEDICAL SYSTEMS GmbH, Nassau gearbeitet. Bei diesem Plasmagerät handelt es sich um ein DBE. Eine schematische Darstellung der Arbeitsweise des plasma ONE ist in Abbildung 2 dargestellt. In Abbildung 3 ist die eingeschaltete Plasmasonde mit fadenförmigen Mikroentladungen zu sehen.

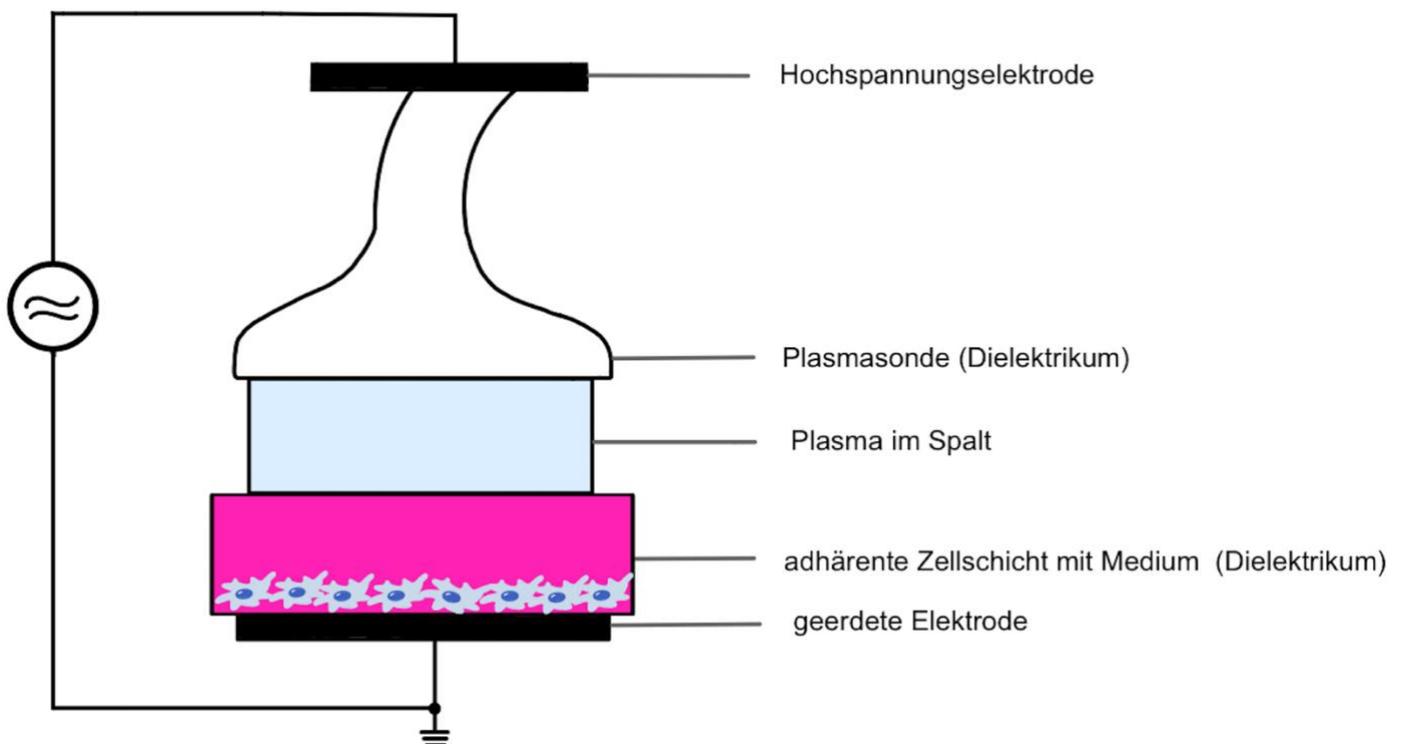


Abb. 2: Schematische Darstellung der DBE (plasma ONE).
(Modifiziert nach von Woedtke et al., 2013)

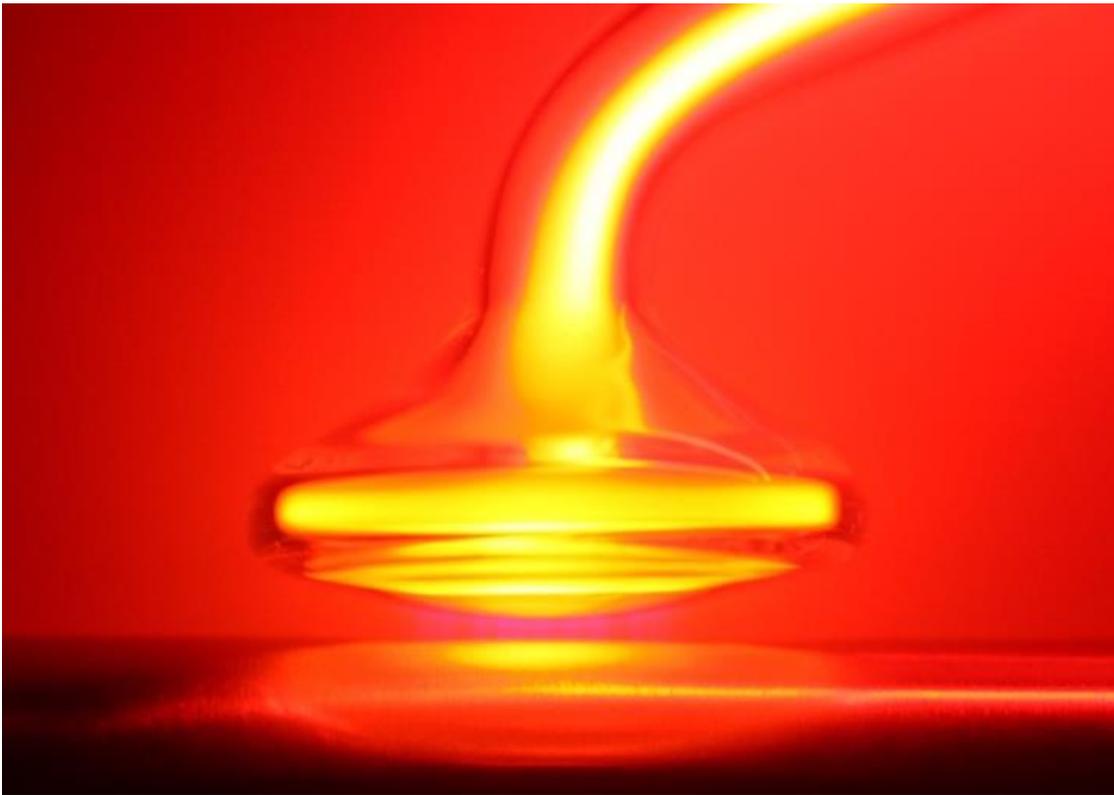


Abb. 3: Eingeschaltete Plasmasonde mit fadenförmigen Mikroentladungen.

Die DBE gehört zu den direkten Plasmaquellen. Das zu behandelnde Medium (z.B. Gewebe, Nährmedium oder Wasser) ist Teil des elektrischen Stromkreises der Plasmaquelle und übernimmt die Funktion der Gegenelektrode (von Woedtke et al., 2013). Die DBE besteht aus zwei flachen Metallelektroden, einer Hochspannungselektrode und einer geerdeten Elektrode, welche sich durch einen Gasspalt voneinander getrennt gegenüberstehen (Jantschek, 2022). Mindestens eine der Elektroden ist von einem Dielektrikum, in diesem Fall Glas, umschlossen. Das Trägergas zwischen den Elektroden wird ionisiert, wodurch NIPP erzeugt wird. Das Plasma bildet sich fadenförmig in Form von Mikroentladungen mit einem Durchmesser von bis zu 200 μm in dem Gasspalt aus (Kogelschatz, 2002). Hierfür sind hohe Spannungen erforderlich. Mit Wechselstrom erzeugte Hochspannungen treiben im Allgemeinen DBEs mit Frequenzen im kHz-Bereich an. Die Leistung liegt hierbei zwischen 10 und 100 W (Eliasson und Kogelschatz, 1991; Pietsch, 2001). Aufgrund dieser Eigenschaften ermöglicht die DBE die simultane Behandlung größerer Oberflächenbereiche (Helmke et al., 2014).

1.1.2 Nicht-invasives physikalisches Plasma in medizinischen Anwendungen

Die großen biomedizinischen Anwendungsfelder des kalten Atmosphärendruckplasmas sind die Oberflächenmodifikation, die biologische Dekontamination, die Blutstillung und die therapeutische Anwendung am Patienten wie die Wundheilung (d'Agostino et al., 2005; Daeschlein et al., 2012; Moreau et al., 2008).

Durch den vermehrten Gebrauch von Antikoagulantien kommt es zu verlängerten Blutungszeiten, welche den Behandelnden im Rahmen von Operation vor Herausforderungen stellen kann (Langer und Connors, 2020). Eine weitere Aufgabe besteht in der Versorgung von Nachblutungen, beispielsweise im Zusammenhang mit Zahnextraktion (Krishnan et al., 2021; Kumbargere Nagraj et al., 2018). Studien zeigen, dass eine NIPP-Anwendung zu einer signifikanten Verkürzung der Blutungszeit führte (Aleinik et al., 2017; Nomura et al., 2017).

Interessanterweise scheint NIPP auch eine apoptotische Wirkung auf einige Arten von Krebszellen zu haben (Nieuwenhuyzen-de Boer et al., 2022). Aufgrund des zunehmenden Auftretens von Antibiotikaresistenzen ist es ein großer Vorteil der Dekontamination durch eine Plasmaanwendung, dass bisher keine Resistenzbildungen von Bakterien bekannt sind (Larsson und Flach, 2022; Zimmermann et al., 2012). Es sind sowohl gramnegative als auch grampositive Bakterien in adhärenter, planktonischer oder vegetativer Form sowie Hefen und Pilze erfolgreich abgetötet worden (Ehlbeck et al., 2010; Helmke et al., 2014, 2012). Eine antibakterielle Wirkung der Plasmaanwendung konnte auch gegen multiresistente Mikroorganismen wie methicillinresistente *Staphylococcus aureus* und extremophile Gattungen wie *Deinococcus radiodurans* nachgewiesen werden. Die Plasmamedizin als neue Entwicklung der Medizintechnik verspricht eine schnelle und potente antimikrobielle und anti-inflammatorische Wirkung (Cooper et al., 2009; Joshi et al., 2010; Napp et al., 2016).

Die aktuelle Plasmaforschung beschäftigt sich mit der Erweiterung der bisher bekannten, letalen Effekte auf Mikroorganismen hin zu einer nichtletalen Plasmawirkung und den positiven Einfluss auf spezifische zelluläre Funktionen wie der Zytokinregulation im Rahmen der Wundheilung (Scholtz et al., 2015). Die zellulären und molekularen Mechanismen der Wirkung von NIPP sind noch unklar und Gegenstand aktueller Studien

(Almeida-Ferreira et al., 2022; Bagheri et al., 2023; Eggers et al., 2023; Faramarzi et al., 2022).

Die biologischen Effekte von NIPP auf zellulärer wie molekularer Ebene werden in aktuellen Studien erforscht.

Nach den Erkenntnissen des Nationalen Zentrums für Plasmamedizin spielen in der aktuellen Grundlagenforschung zur Wechselwirkung von Niedertemperaturplasmen wesentliche Mechanismen eine Rolle, bei denen biologische Effekte durch Veränderungen in der flüssigen Zellumgebung vermittelt werden. Diese Veränderungen werden durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) verursacht, die ursprünglich in der Gasphasenchemie des Plasmas gebildet wurden (Weltmann und von Woedtke, 2016). Die bei der Anwendung entstehenden verschiedenen ROS und RONS sind vermutlich für die biomedizinischen Wirkungen verantwortlich (Bagheri et al., 2023). In den vergangenen Jahren wurde NIPP vor allem im Bereich der Wundheilung und der Behandlung infektiöser Hautkrankheiten eingesetzt (Reuter et al., 2018). NIPP fördert die Wundheilung bei kurzen Behandlungszeiten und niedriger Intensität, wobei die antibakterielle Aktivität von NIPP vermutlich eine bedeutende Rolle spielt (Isbary et al., 2013, 2010; Stratmann et al., 2020). Diese wird offenbar durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies hervorgerufen, die ein hohes Reduktionspotenzial besitzen (Vatansever et al., 2013). RONS, insbesondere atomarer Sauerstoff, Ozon, Hydroxyl-Radikale und Wasserstoffperoxid, die durch NIPP erzeugt werden, können die Phospholipid-Doppelschicht und Proteine innerhalb der Plasmamembran sowie intrazelluläre Strukturen wie Nukleinsäuren in Bakterienzellen schädigen und so zum Zelltod führen (Dobrynin et al., 2009; Weidinger und Kozlov, 2015).

Das im Plasma produzierte Stickstoffmonoxid (NO)-Radikal stimuliert hingegen die Wundheilung und die Geweberegeneration (Kalghatgi et al., 2010; Shekhter et al., 2005). NO kann das Immunsystem beeinflussen und die Zellproliferation, Angiogenese und Kollagensynthese anregen, was zur Regeneration geschädigter Haut führt (Suschek und Opländer, 2016). Studien zeigen, dass das Ozon für diese Wirkung nicht verantwortlich ist (Kalghatgi et al., 2012). In Niedertemperaturplasmen entstehen zusätzlich Gasphasenspezies wie beispielsweise das Hydroxylradikal (OH⁻), Stickoxide (NO, NO₂, ONOO⁻), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oder Superoxid bzw. Hyperoxid (O₂⁻), die mit Wasser reagieren und Säuren bilden können. Dies kann zu einer signifikanten Absenkung des

pH-Wertes führen (Helmke et al., 2009; Oehmigen et al., 2010). Als Folge davon könnten pH-abhängige biochemische Reaktionen im Wundbereich durch den Einsatz von Plasma beeinflusst werden.

Es wurden zudem keine Hinweise auf ein erhöhtes Risiko bei der Anwendung von NIPP gefunden, einschließlich fehlender gentoxischer Wirkungen. Der Einsatz von NIPP in der Zahnmedizin sowie in der Wundheilung gewinnt zunehmend an Bedeutung und stellt wichtige Forschungsfelder der Plasmamedizin dar (Weltmann und von Woedtke, 2016). Aus bereits publizierten Studien unserer Arbeitsgruppe für Plasmamedizin in Bonn ist bereits bekannt, dass NIPP in parodontalen Zellen wie Gingivafibroblasten und Zementoblasten eine proliferationsfördernde und entzündungshemmende Wirkung hat und die Wundheilung fördert (Eggers et al., 2022a, 2022b). Die Wirkung von Kaltplasma bei einer bakteriellen Infektion des Parodonts hingegen ist bisher noch nicht hinreichend untersucht worden.

1.2 Parodontium

Der Zahnhalteapparat, genannt Parodont, setzt sich aus verschiedenen Gewebetypen zusammen. Die Bestandteile des Parodonts umfassen neben dem Zahn und dem knöchernen Zahnfach (Alveole) auch das den Zahn umgebende Zahnfleisch (Gingiva) und ein spezielles Fasersystem aus Bindegewebe (Desmodont), welches den Zahn mit Hilfe des Zements (Wurzelzement) verankert (Attachment). Eine schematische Darstellung des Parodonts ist in Abbildung 4 dargestellt. Seine Funktion besteht nicht nur darin, den Zahn im Kieferknochen zu verankern, sondern auch einen dichten Verschluss um den Zahn zu bilden, um das Eindringen von oralen Mikroorganismen in den Körper zu verhindern (Schroeder, 2000).

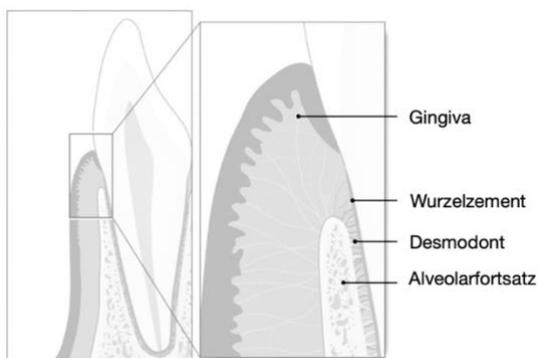


Abb. 4: Schematische Darstellung des Parodonts.
(Modifiziert nach Ramseier 2025)

1.2.1 Parodontale Ligamentzellen

Die Wurzelhaut (Desmodont) umgibt den im Alveolarknochen verankerten Bereich eines Zahnes (Zahnwurzel) und ist ein Bestandteil des Zahnhalteapparates. Das Desmodont ist eine faserreiche Bindegewebsstruktur, die Nerven und Gefäße enthält und das Wurzelzement mit dem Alveolarknochen verbindet. Das Desmodont besitzt vor allem eine Halte- und Stützfunktion und hat zudem Funktionen in der Remodellierung. Die Gesamtpopulation desmodontaler Zellen setzt sich aus Fibroblasten, Osteo- und Zementprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteoklasten, Zementoblasten und Dentoklasten, Epithelzellen und Leukozyten zusammen. Die spezialisierten Bindegewebszellen der Wurzelhaut werden als Parodontalligamentzellen (PDL-Zellen) bezeichnet (Tomokiyo et al., 2019). In Abbildung 5 ist ein Fibroblasten-Layer aus unserem Labor abgebildet. In Abbildung 6 hingegen ist ein Fibroblast in seinem zellulären intrinsischen Faserzement dargestellt. Unter ihnen befinden sich Stammzellen, die zur Regeneration des Desmodonts, des Alveolarknochens und des Wurzelzements beitragen. Die PDL-Zellen können somit alle Gewebe des Attachmentapparats bilden und resorbieren (Marchesan et al., 2011; Wang und Hua, 2020). Die Fibroblasten des Desmodonts stellen die größte, sehr dicht angeordnete Population dar. Ihre Morphologie gleicht den anderen Fibroblasten im Körper mit ihrer spindelförmigen Gestalt, dem länglich ovalen Kern und zahlreichen unterschiedlich langen zytoplasmatischen Fortsätzen. Über diese Fortsätze stehen sie untereinander in Kontakt. Die Fibroblasten des Desmodonts bilden ein dichtes, dreidimensionales Netzwerk, welches als morphologische Grundlage der Fasererneuerung anzusehen ist (Schroeder, 2000).

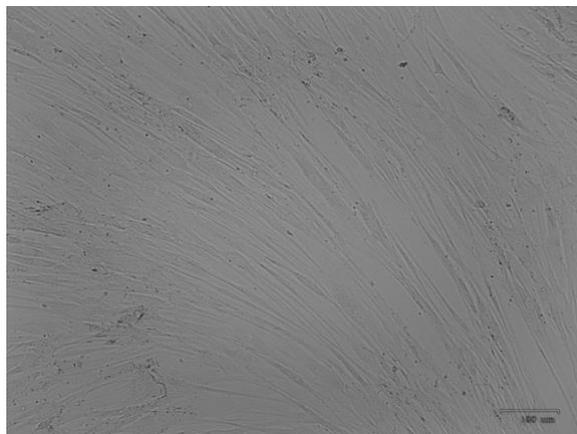


Abb. 5: Fibroblasten-Layer unter dem Lichtmikroskop in einer Petrischale.



Abb. 6: Fibroblast im zellulären intrinsischen Faserzement.
 Originalvergrößerung 5000-fach.
 (Übernommen aus Garlet und Thoma, 2022)
 (Mit freundlicher Genehmigung von eye of science)

1.2.2 Parodontitis

Parodontale Erkrankungen zählen zu den weltweit häufigsten Gesundheitsproblemen (Tonetti et al., 2017). Neben Gingivitis und Parodontitis gibt es weitere Zustände, die das Parodont beeinflussen können, beispielsweise systemische Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder das Papillon-Lefèvre-Syndrom, aber auch Traumata oder Rauchen (Caton et al., 2018; Jepsen et al., 2018). Parodontitis hat gravierende Auswirkungen auf die orale Gesundheit und das Gesundheitswesen. Die Prävalenz der Erkrankung steigt mit dem Alter, wobei die meisten Fälle mild bis moderat verlaufen. Schwere Formen treten hauptsächlich bei älteren Erwachsenen und Senioren auf. Weltweit wird die Prävalenz schwerer Parodontitis auf 7,4 % geschätzt, während in Deutschland etwa zehn Millionen Menschen betroffen sein könnten (Jordan et al., 2014; Kassebaum et al., 2017).

Parodontitis ist eine chronische, entzündliche Erkrankung des gesamten Zahnhalteapparates, die durch die Zerstörung des umgebenden Gewebes eines Zahnes gekennzeichnet ist und zu irreversiblen Schäden führt (Trindade et al., 2023; Zitzmann et al., 2013). Versursacht wird diese Erkrankung durch ein dysbiotisches Mikrobiom auf der Zahnoberfläche (Belibasakis et al., 2023; Sanz et al., 2020). Die zugrunde liegenden Mechanismen dieser Krankheit sind komplex, aber immunologische Entzündungsreaktionen auf verschiedene orale Bakterien, wie zum Beispiel *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* oder insbesondere *Fusobacterium nucleatum (F.n.)* spielen eine entscheidende Rolle und führen zum Abbau von Weich- und Hartgeweben (Papapanou et al., 2018).

Im Gegensatz dazu ist Gingivitis eine reversible Entzündung des Zahnfleisches (Dannewitz et al., 2021). Die Entstehung von Gingivitis und Parodontitis geht mit der Ansammlung von Biofilm am Zahnfleischrand einher. Verschiedene orale, ökologische Bedingungen führen zur Bildung spezifischer mikrobieller Gemeinschaften, die die Entwicklung von oralen Erkrankungen beeinflussen. Zum Beispiel die nicht abschilfernde Oberfläche der Zähne und die im Speichel und in der Sulkusflüssigkeit enthaltenen Nährstoffe (Kilian et al., 2016).

Eine gesunde Mundflora ist durch ein Gleichgewicht zwischen Biofilm und Immunantwort gekennzeichnet. Bei Parodontitis kommt es zu einer Störung dieses Gleichgewichts, was zu einem Abbau von Gewebe und Knochen führt (Dannewitz et al., 2021). Die Unterschiede in den ökologischen Bedingungen auf den supra- und subgingivalen Zahnoberflächen führen zur Bildung spezifisch angepasster mikrobieller Gemeinschaften in den Biofilmen dieser Nischen (Mira et al., 2017). Dieses komplexe Gleichgewicht zwischen verschiedenen Bakterienarten beeinflusst wesentlich die Entstehung von oralen Erkrankungen wie Karies, Gingivitis und Parodontitis.

Selbst wenn das Parodont klinisch gesund erscheint, zeigen histologische Untersuchungen eine geringe Entzündung im Bereich des epithelialen Attachments der Gingiva (Caton et al., 2018). Die bakterielle Besiedlung der Zahnoberflächen löst zunächst eine Entzündungsreaktion in der Gingiva aus, die durch das Immunsystem reguliert und über längere Zeit aufrechterhalten werden kann. Jedoch können verschiedene Einflüsse das Mundökosystem stören und zu einer Dysbiose im subgingivalen Biofilm führen, die durch das Überwachsen spezifischer, meist gramnegativer Pathobionten gekennzeichnet

ist (Hajishengallis, 2014a, 2014b; Hajishengallis und Lamont, 2016). Diese Dysbiose kann bei anfälligen Personen zu Parodontitis führen. Begleitet von einer fehlgesteuerten inflammatorischen Immunantwort, gekennzeichnet durch eine Vielzahl von entzündlichen Mediatoren, matrixabbauenden Enzymen und osteoklastischen Markern, kommt es zu einem Abbau von Bindegewebe und Alveolarknochen (Rickard et al., 2003).

Obwohl einer Parodontitis immer eine Gingivitis vorausgeht, entwickelt sich nicht jede Gingivitis zu einer Parodontitis (Lang et al., 2009). Bisher ist es nicht möglich, solche Fälle zu identifizieren, bevor Schäden am Parodont sichtbar werden (Jin et al., 2011). Die Erkrankung wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Neben der bakteriellen Ätiologie spielen Diabetes, Nikotinkonsum, Stress, genetische und lokale Faktoren wie Zahnfehlstellungen eine wichtige Rolle. Durch sie wird das dynamische Gleichgewicht zwischen den Mikroorganismen und dem Wirt entscheidend beeinflusst (Jin et al., 2011; Page et al., 1997). Parodontitis ist eng mit sozioökonomischen Variablen und Verhaltensweisen, einschließlich Mundhygiene, verbunden (Arweiler et al., 2018).

1.2.2.1 Parodontitistherapie

Die regelmäßige Behandlung von Parodontitis erfolgt durch subgingivale Instrumentierung mit Handinstrumenten und/oder maschinell angetriebenen Geräten (Herrera et al., 2022; Sanz et al., 2020). Diese Therapie kann mit CHX-haltigen Mundspülungen, Gelen oder Chips in den betroffenen Bereichen unterstützt werden (Poppolo Deus und Ouanounou, 2022; Raszewski et al., 2021).

Das Ziel der Therapie ist es, Pathogene zu reduzieren und somit Entzündungen zu vermindern (Herrera et al., 2022). Idealerweise führt die Parodontaltherapie auch zur Wiederherstellung der ursprünglichen Form, Struktur und Funktion der durch Parodontitis verlorenen Gewebe. Dies ist jedoch nur mit regenerativen parodontalen Verfahren möglich (Cortellini et al., 2020; Hägi et al., 2014). In der Regel kommt es nach einer Parodontitistherapie zur Ausbildung eines langen Saumepithels. Die Ausbildung dieses Epithels wird als reparative Heilung bezeichnet (Gräber et al., 1999).

In schweren und schnell fortschreitenden Fällen von Parodontitis, besonders bei jungen Patienten, kann der Einsatz von Antibiotika als Ergänzung zur nicht-chirurgischen Behandlung von Parodontitis in Betracht gezogen werden (Zhao et al., 2021). Um eine weitere Entwicklung von Antibiotikaresistenzen zu vermeiden, sind alternative Methoden

Gegenstand aktueller Forschung (Larsson und Flach, 2022). NIPP könnte hier eine mögliche alternative Therapieform darstellen. Gegenüber einer NIPP-Behandlung bestehen aktuell keine Resistenzen und *In vitro*-Studien konnten bereits eine Wirksamkeit gegen *F.n.* und *P.g.*, aber auch gegen orale Biofilme beweisen (Gorynia et al., 2013; Jungbauer et al., 2022, 2021).

1.2.2.2 *Fusobacterium nucleatum*

Mikrobielle Infektionen sind die zentrale Ursache von parodontalen Erkrankungen und ein Störfaktor bei der intraoralen Wundheilung (Papapanou et al., 2018). *F.n.* ist eine häufig vorkommende Art von oralen anaeroben Bakterien, die in Verbindung mit parodontalen Erkrankungen stehen.

F.n. ist eine gramnegative, obligat anaerobe Bakterienart, die in der Mundhöhle und im Darm vorkommt. Es ist ein wichtiger Bestandteil des oralen Mikrobioms und wird oft in Zusammenhang mit parodontalen Erkrankungen und Karies diskutiert (Brennan und Garrett, 2019). *F.n.* hat die Fähigkeit, sich an Zellen des Wirts anzulagern und kann dadurch die Entstehung von Entzündungen fördern. Es handelt sich dabei um einen wichtigen pathogenen Erreger, der sowohl in der Plaque- als auch in der Taschenflora von Patienten mit Parodontitis vorkommt.

Während des Fortschreitens der Parodontitis kommt es zur Ausbildung einer Zahnfleischtasche um den Zahn herum, die eine geeignete Umgebung für die mikrobielle Plaque bietet (Mombelli, 2018). Unbehandelt nimmt die bakterielle Infektion stark zu, sodass langfristig Knochengewebe resorbiert wird und Zähne verloren gehen können (Nokhbehsaim et al., 2020a, 2020b). Insbesondere *F.n.* spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung und der Entwicklung der Parodontitis. Es dient als unterstützender Brückenorganismus, welches in der Lage ist, obligat anaerobe und aerobe Pathogene zu verknüpfen und zur Entwicklung von Biofilmen beizutragen (Rickard et al., 2003).

Diese Eigenschaft wird in der folgenden Abbildung 7 verdeutlicht, in der die rosa eingefärbten *Fusobacterien* eine Verbindung zwischen den *Actinomyceten*, den *Streptococcen* und den *Veillonella-Spezien* bilden. *F.n.* fördert indirekt die Schaffung von Umgebungen, in denen *Porphyromonas gingivalis* und viele obligat anaerobe Bakterien während der Reifung des Biofilms überleben können (Bradshaw et al., 1998; Diaz et al., 2002).

In jüngster Zeit konnte *F.n.* auch in Zusammenhang mit verschiedenen systemischen Erkrankungen, wie z.B. Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und sogar Krebserkrankungen wie z.B. Darmkrebs, gebracht werden. Es wird vermutet, dass das Bakterium durch seine Fähigkeit, Entzündungen zu verursachen und bei der Bildung von Tumormetastasen mitverantwortlich zu sein, eine Rolle in der Entstehung dieser Erkrankungen spielt (Fan et al., 2023).

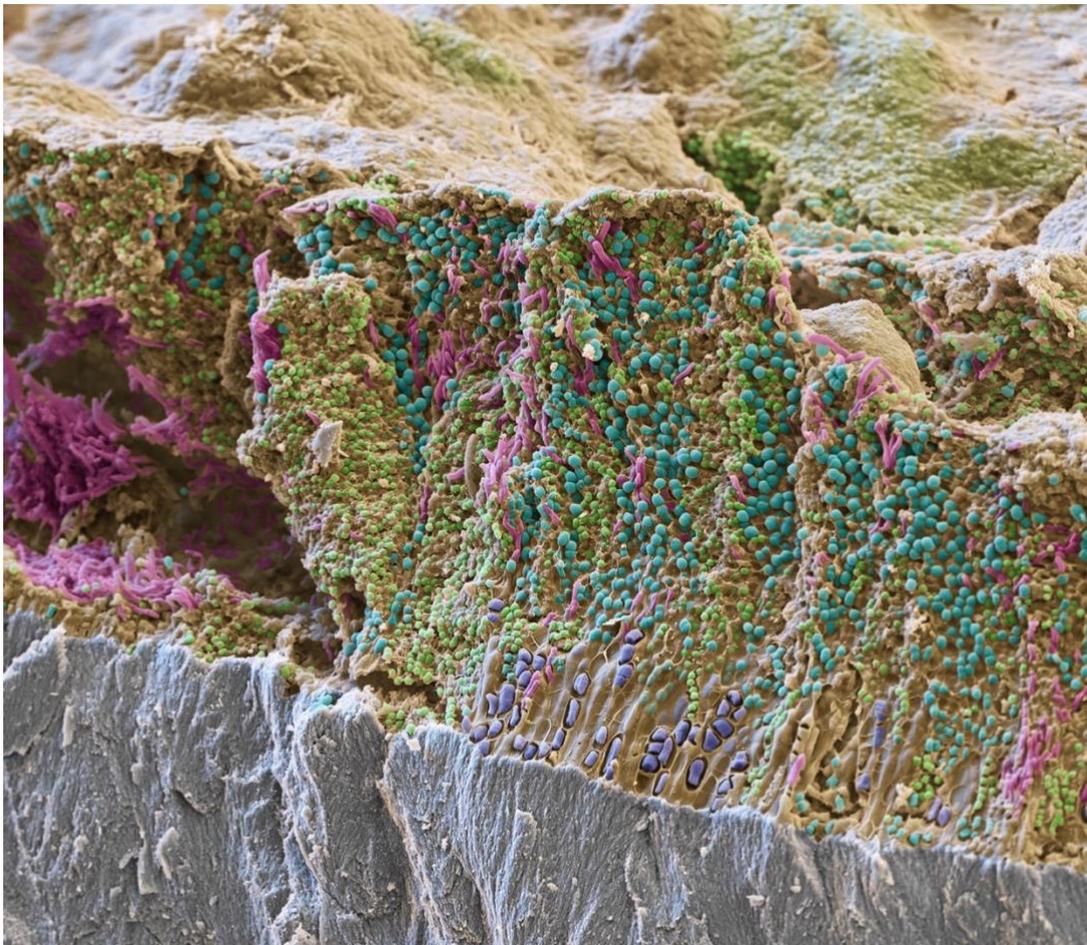


Abb. 7: Gefrierbruchpräparat eines supragingivalen Biofilms.

Schmelzfläche - grau; *Actinomyceten* – lila; *Streptococcen* – grün; *Fusobacterium nucleatum* – rosa; *Veillonella*-Spezies – cyan; Die Identifizierung der gefärbten Mikroorganismen basiert ausschließlich auf morphologischen Erkenntnissen. Eine genauere Überprüfung ist nur mit spezielleren genomischen Methoden möglich. Originalvergrößerung 4000-fach.

(Übernommen aus Belibasakis und Bostanci, 2022)

(Mit freundlicher Genehmigung von eye of science.)

1.3 Die parodontale Wundheilung

Die klinische Heilung von Wunden ist ein komplexer Prozess, der verschiedene aufeinanderfolgende Phasen durchläuft, welche sich gegenseitig beeinflussen (Caton et al., 2018). Die entzündliche Phase beginnt mit der Aktivierung der intrinsischen und extrinsischen Pfade der Gerinnungskaskade nach einer Verletzung. Neutrophile Blutzellen beseitigen nach ihrer Migration in die frische Wunde Fremdmaterialien wie Bakterien, abgestorbene Zellen und beschädigte extrazelluläre Matrix (EZM) (Velnar et al., 2009). Zellen des Parodontalligaments und gingivale Fibroblasten sekretieren mehrere Wachstumsfaktoren und Zytokine, darunter IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α . Diese regulieren die Produktion von Matrix-Metalloproteinase (MMP), wie MMP1, und beeinflussen den Umbau von Weich- und Hartgewebe (Kondo und Ohshima, 1996; Noh et al., 2013; Sorsa et al., 2006). Mastzellen, die ihre Granula freisetzen, tragen zu den typischen Anzeichen von Entzündungen wie Rötung, Schwellung, Schmerz und Wärme bei (Degreef, 1998). Monozyten werden durch Chemotaxis zwei bis drei Tage nach der Verletzung zur Wunde gelockt, um den Phagozytoseprozess zu initiieren (Hunt, 1988). Die Proliferationsphase beginnt üblicherweise am zweiten bis zehnten Tag nach der Verletzung. Die Fibroblasten vermehren sich und produzieren EZM-Komponenten wie Kollagen, um Granulationsgewebe aufzubauen (Velnar et al., 2009). Der epidermale Wachstumsfaktor fördert die Epithelisierung, während die Angiogenese durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor induziert wird (Schultz et al., 1991; Tonnesen et al., 2000).

Die letzte Umbauphase beginnt zwei bis drei Wochen nach der Verletzung und erstreckt sich über einen Zeitraum von bis zu zwei Jahren (Ramasastry, 2005). Sie ist durch eine Neuorganisation der Kollagenmatrix und eine kontinuierliche Kontraktion der Wunde gekennzeichnet (Clark, 1993; Gurtner et al., 2008).

Die parodontale Regeneration spielt eine entscheidende Rolle für den gesamten Prozess der Wundheilung (Dahlin et al., 1988). Die Wundheilung in der Mundhöhle, insbesondere die parodontale Wundheilung, wird durch verschiedene interne und externe Faktoren beeinflusst, vor allem durch systemische Erkrankungen oder Störungen des Immunsystems (z. B. Diabetes, HIV und Steroidtherapie) sowie Umwelttoxine wie Nikotin oder Alkohol (Boniakowski et al., 2017; Eisenbeis et al., 2017; Swift et al., 1999). Die

parodontale Heilung kann durch chirurgische oder nicht-chirurgische Débridement-Maßnahmen zur Reduzierung von Pathogenen in parodontalen Taschen initiiert werden. In der Regel führt die parodontale Heilung zur Reparation von Gewebestrukturen. Nach der Entfernung des Biofilms wird die Wunde wieder von parodontalen Zellen besiedelt. Normalerweise kommt es im Rahmen einer parodontalen Reparatur zur Ausbildung eines langen Saumepithels an der Grenzfläche zwischen dem Zahnfleisch und der Wurzel (Gräber et al., 1999).

1.3.1 Interleukin-6

Interleukin-6, abgekürzt als IL-6, zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen und fungiert als Signalstoff des Immunsystems, welches die Entzündungsreaktion des Körpers reguliert. Weitere Bezeichnung für dieses Interleukin sind Interferon- β 2, B-Zell-stimulierender Faktor und Leberzell-stimulierender Faktor. Die Synthese findet in einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen statt. Beispielsweise zu nennen sind die Makrophagen, Monozyten, T-Zellen, Keratinozyten, Endothelzellen und Fibroblasten (Rose-John, 2020). Eine herausragende Bedeutung hat IL-6 in der angeborenen, unspezifischen Immunantwort. Darüber hinaus spielt es eine wichtige Rolle als Vermittler zwischen der unspezifischen und der spezifischen Immunreaktion im Kontext von Entzündungsprozessen (Jones, 2005). IL-6 steigert die Sekretion von Kortison, Somatotropin, Glucagon und Adrenalin (Fischer, 2006). IL-6 kann als aktivierender Ligand an zwei Rezeptortypen binden: an einen membrangebundenen IL-6-Rezeptor (IL-6R), welcher nur auf Leberzellen und Leukozyten vorkommt und an einen löslichen IL-6-Rezeptor (sIL-6R). Der entstandene IL-6/sIL-6R-Komplex bindet bestimmte Glykoproteine in Zellmembranen und kann verschiedene Vorgänge auslösen (Jones, 2005). Bei einer akuten entzündlichen Episode werden zunächst neutrophile Granulozyten rekrutiert, die den Entzündungsherd infiltrieren und anschließend durch eine länger andauernde Population von spezifischeren Entzündungszellen wie Lymphozyten und mononukleären Zellen ersetzt werden. Dies stellt den Übergang von der angeborenen Immunantwort zu einer erlernten Immunantwort dar (Jones, 2005).

1.3.2 Interleukin-8

Interleukin-8, kurz IL-8 genannt, ist ein körpereigener Botenstoff, der zu den Zytokinen gehört. Insbesondere Endothelzellen, Monozyten, Epithelzellen und Fibroblasten sind für die Synthese von IL-8 verantwortlich. Dieses Interleukin ist ebenfalls unter dem Namen CXC-Motiv-Chemokin-Ligand 8 (CXCL8) bekannt (Asokan und Bandapalli, 2021). Als ein Entzündungsmediator vor Ort mobilisiert IL-8 neutrophile Granulozyten durch chemotaktische Signale und unterstützt ihre Degranulation. Zusätzlich zur Stimulation von neutrophilen Granulozyten rekrutiert IL-8 auch basophile Granulozyten und T-Lymphozyten. CXCL8 fungiert als Angiogenesefaktor und spielt somit eine Rolle bei der Bildung und Neubildung von Blutgefäßen und somit eine entscheidende Rolle bei der Wundheilung (Brat et al., 2005). Proinflammatorische Zytokine wie IL-8 und IL-6 dienen nicht nur als immunologische Komponenten, sondern spielen auch eine wichtige Rolle bei der Wundkontraktion oder Geweberemodellierung im Rahmen der Wundheilung (Takamiya et al., 2008). In der wirtsinternen Kommunikation werden sie durch IL-1 β freigesetzt und steuern maßgeblich den parodontalen Gewebsabbau (Ogawa und Uchida, 1996).

1.4 Zielsetzung und Fragestellung

In der vorliegenden Doktorarbeit sollte die Wirksamkeit von Kaltplasma als mögliche Therapieoption gegen bakteriell-induzierte Infektionen im parodontalen Bereich *in vitro* untersucht werden. Ziel der Studie war es, die Wirkung von NIPP auf humane parodontale Ligamentzellen zu analysieren, die *in vitro* durch *Fusobacterium nucleatum* in einen Zustand der parodontalen Infektion versetzt wurden.

Die Arbeitshypothese dieser Promotion lautet daher: „Die Behandlung mit Kaltplasma führt zu einer Reduktion des Entzündungsgeschehens und die entzündungsbedingte Beeinträchtigung wichtiger Zellfunktionen wird durch eine Plasmabehandlung verringert“.

2. Material und Methode

2.1 Material

2.1.1 Parodontale Ligamentzellen

Die in den *In vitro*-Versuchen verwendeten humanen PDL-Zellen (CC-7049 Clonetics™ Human Periodontal Ligament Fibroblast Cell Systems Document) stammen von der Firma Lonza (Lonza Walkersville, Maryland, USA).

2.1.2 *Fusobacterium nucleatum*

Die Zellysate des *F.n.* ATCC 25586 wurden von der zahnmedizinischen Klinik der Universität Bern zur Verfügung gestellt. Der Grundstock der Bakteriensuspension hatte eine OD von 2. Hergestellt wurde das Bakterienlysat, indem die Bakterien in phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) suspendiert wurden (OD660 = 1, dies entspricht $1,2 \times 10^9$ Bakterienzellen/ml) und zweimal einer Ultraschallbehandlung mit einer Leistung von 160 W für 15 min ausgesetzt wurden (Eggers et al., 2023). Durch die Vorbehandlung wurden die Bakterien inaktiviert. Anschließend wurde die Mischung 10 min lang bei 20 °C und 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde unter Verwendung einer Porengröße von 0,4 µm filtriert. Dies entsprach einer Infektionsmultiplizität (MOI) von ~ 20:1 (Stähli et al., 2022). In den Versuchen wurde eine OD von 0,025, 0,05 und 0,1 verwendet. Dies entspricht einer Bakterienkonzentration von 12,5 µl/ml, 25 µl/ml und 50 µl/ml. Die Zellen wurden mit Bakterienbestandteilen anstatt mit ganzen Bakterienzellen stimuliert, um eine parodontale Entzündung bzw. eine mikrobielle Infektion zu simulieren.

2.1.3 Geräte

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tab. 1: Geräte.

Geräte	Hersteller
Akku-betriebene Pipettierhilfe, pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt
Autoklav, VARIOKLAV® 25t	HP Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Automatisierter Zellzähler EVE™	NanoEntek, Seoul, Korea
Einkanalpipetten - Transferpette® S 10 µl - Transferpette® S 100 µl - Transferpette® S 1000 µl - Research 200µl	Eppendorf SE, Hamburg
Eismaschine, Flockeneisbereiter	Manitowoc®, Manitowoc Ice, Inc. Litho
Extraktionszange, Prämolarenzange	Passau Impex, Sialkot, Pakistan
Fluoreszenz-Plattenlesegerät	Promega, Madison, WI, USA
Gasflaschen, Kohlendioxid	Linde plc, Dublin, Irland
Gefrierschrank -20 °C	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
Gefrierschrank -80 °C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
iCycler® Thermal Cycler	Bio-Rad, München
Inkubator, Heraeus® BB 15 Function Line	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Inkubator, Heracell™ 150i CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank +4 °C, Kirsch Kühlmaschine	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
Laborstativ als Halterung für Plasmagerät	Windaus-Labortechnik, Clausthal-Zellerfeld
Lichtmikroskop Motic AE 21	Motic GmbH, Wetzlar
Magnetrührer ARE Heating Magnetic Stirrer	VELP® Scientifica, Usmate, Italien
Magnetrührstäbchen	neoLab®, Heidelberg
Spektralphotometer Epoch	BioTek Instruments, Winooski, USA
Minizentrifuge Frontier™ 5306	OHAUS Europe GmbH, Nänikon, Schweiz

Tab. 1: Geräte.

Minizentrifuge	NIPPON GENETICS EUROPE GmbH, Düren
Multipipette® plus	Eppendorf SE, Hamburg
MyCycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad, München
MyiQ™ Single-Color Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, München
Spectrophotometer, NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
pH-Meter	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim
Plasmasonde PS 30	plasma MEDICAL SYSTEMS, Nassau
Plasma-Therapiegerät, Plasma ONE	plasma MEDICAL SYSTEMS, Nassau
Plastikrakel, PA1-G 3M™	3M Company, Saint Paul Minnesota, USA
Präzisionswaage, New Classic MF	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Sicherheitsabsaugsystem, EcoVac- System 2	Schuett-Biotec GmbH, Göttingen
Sicherheitswerkbank, MSC 1.2	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Slidebox 100 Place Cork-Lined	Heathrow Scientific®, Vernon Hills Illinois, USA
Vortex Mixer Wizard	VELP® Scientifica, Usmate Italien
Wärmeschrank 37 °C	Memmert GmbH, Schwabach
Wärmeschrank 80 °C	Memmert GmbH, Schwabach
Wasserbad	GFL®, Burgwedel
Zelldichte-Messgerät, Ultrospec® 10	Amersham plc, Biosciences, Amersham, England
Zentrifuge, Centrifuge 5415 R	Eppendorf SE, Hamburg
Zentrifuge, Centrifuge 5804 R	Eppendorf SE, Hamburg
ZOE™ Fluorescent Cell Imaging	Bio-Rad, München

2.1.4 Verbrauchsmaterial, Plastik- und Glasware

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien, Plastikartikel und Glaswaren sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien, Plastikartikel und Glaswaren.

Materialien	Hersteller
Abwurfbehälter Sharpsafe® 7 l	P.J. Dahlhausen & Co. GmbH, Köln
Beschwerungsringe für Gefäße	Heathrow Scientific®, Vernon Hills Illinois, USA
Deckgläser (Glas, 15 mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Deckgläser 13 mm (Thermanox® Plastic)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Desinfektionsmittel, pursept® A Xpress	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Einweg-Filtereinheit (0,2 µm)	Sartorius Stedim Biotech, Aubagne Cedex, Frankreich
Filterspitzen	STARLAB GmbH, Hamburg
Glaspipettenspitzen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Handschuhe, Peha-soft nitrile	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Immuno 96 MicroWell™	Nunc, Langenselbold
MaxiSorp™ + PolySorp™, transparent Microseal® „B“ seals	Bio-Rad, Watford, USA
von Mikroplatten, transparent Kombitips Plus (2,5 / 10 ml)	Eppendorf, Hamburg
Kryo-Röhrchen	Nunc, Langenselbold
Kulturplatten VWR®, 24 wells	VWR International, Radnor Pennsylvania, USA
Membranfilter 0,22 µm, Durapore®	Millipore Corporation, Massachusetts, USA
Mikroplatten, 96-well, F-Boden, transparent	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien, Plastikartikel und Glaswaren.

Parafilm „M“ Laboratory Film	Bemis flexible packaging, Neenah, USA
Multiwell-Platten für Zellkultur (6-Well-Platten)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Objektträger 76x26x1 mm	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
PCR-Platten; iCycler iQ® 96-well	Bio-Rad, Watford, England
Pinzette, Figur DP19	Henry Schein Medical GmbH, Berlin
Pipettenspitzen TipOne®	STARLAB GmbH, Hamburg
Polypropylen-Röhrchen (15 / 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Polystyrol/Polystyrene Küvette	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 / 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten (5 / 10 / 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Skalpelle	Feather Safety Razor, Osaka, Japan
Spritzen (2 / 5 / 10 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes
Spritzenvorsatzfilter, Minisart®	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Wägebapier 10 x 13 cm	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Zellkulturschalen (35 mm / 11,7 cm ²)	VWR International, Radnor USA
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.5 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tab. 3: Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, München
Bovine Serum Albumin Fraction V	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
CellIROX™ tiefrotes Reagenz	Thermo Scientific, Rockford, USA
DAPI	Sigma-Aldrich Chemie, München
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe

Tab. 3: Chemikalien.

DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, München
Ethanol absolut p.a.	Merck, Darmstadt
FBS	Invitrogen, Karlsruhe
Mowiol	Roth-Roth GmbH, Karlsruhe
NaCl 0,9 % Fresenius 500 ml Plastipur®	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Paraformaldehyd 4 %	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
PBS Tabletten	Sigma-Aldrich Chemie, München
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Phalloidin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Quantitect Primer Assay 200	Qiagen, Hilden
SSoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad, München
Tris	MP Biomedicals Europe, Illkirch
Trypsin-EDTA, 0,05 % (w/v)	gibco Life Technologies, Carlsbad Kalifornien, USA
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie, München
Ziegenserum (Goat Serum) 93 /l	Dako Deutschland GmbH, Hamburg

2.1.6 Medium, Puffer und Lösungen

Das verwendeten Medien, Puffer und Lösungen sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tab. 4: Medium, Puffer und Lösungen.

Medium, Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
1% BSA	0,1 g BSA 10 ml 1x TBS
1% Medium	
4% BSA	0,4 g BSA 10 ml 1x TBS

Tab. 4: Medium, Puffer und Lösungen.

10% Medium	
Blockierungslösung	10 % Ziegenserum 1 % BSA
EDTA-Stock / pH 8,0	0,5M Na ₂ EDTA
Einbettmittel für Fluoreszenz	6 g Glycerol 2,4 g Mowiol 4-88 12 ml Tris-HCl (0,2 M, pH 8,5) 25 mg/ml DABCO 12 ml Wasser
PBS (1x) / pH 7,2 - 7,4	137 mM NaCl 10,2 mM Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl
PFA-Lösung 4% / pH 7,4	0,8 g PFA 19,2 ml PBS
Reagenzverdünnungsmittel / pH 7.2-7.4	1% BSA in PBS
Stopplösung	2 N H ₂ SO ₄
TBS Puffer Stammlösung / pH 7,4	90,0 g NaCl 60,5 g Tris 1000 ml Aqua dest 210 M HCl
TBS Puffer	1:10 Verdünnung der Stammlösung
Tris-Lösung (pH 11)	1 M Tris
Triton 0,1 %	50 µl Triton 50 ml PBS
Waschpuffer pH 7.2-7.4	0.05% Tween [®] 20 in PBS

2.1.7 Kits

Die verwendeten Kits sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tab. 5: Kits.

Kits	Hersteller
PIERCE™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
DuoSet® ELISA Development System <ul style="list-style-type: none"> - Fängermolekül (Antikörper) - Biotinylierter Nachweisantikörper - Massenkali brierter Standard - Streptavidin-HRP - Ausführliches Protokoll - 96-Well- oder 384-Well-Platten - Plattenversiegelungen - 1-Step-Farbreagenz - Stopplösung - ELISA-Plattenbeschichtungspuffer - Reagenzverdünner - Waschpuffer 	R&D Systems Europe, Abingdon, England
iScript™ Select cDNA Synthesis KIT <ul style="list-style-type: none"> - 5x iScript reaction mix - iScript reverse Transkriptase - oligo(dT), random primer mix - gene-specific primer enhancer solution - Nuklease freies Wasser 	Bio-Rad, München
RNeasy® Protect Mini Kit (250) <ul style="list-style-type: none"> - Mini Spin Columns - Collectiontubes 1,5 ml & 2 ml - Puffer RLT - Puffer RW1 - Puffer RPE - RNase freies Wasser 	Qiagen, Hilden

2.1.8 Antikörper

2.1.8.1 ELISA

Die verwendeten Antikörper (enthalten in den entsprechenden Kits s.o.) sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tab. 6: Antikörper.

Name	Nummer	Quelle
hs IL-6-Primärantikörper	840113	Maus
hs IL-6-Sekundärantikörper	840114	Ziege
hs IL-6-Standard	840115	Mensch
hs IL-8-Primärantikörper	890804	Maus
hs IL-8-Sekundärantikörper	890805	Ziege
hs IL-8-Standard	890806	Mensch
Streptavidin-HRP	893975	Meerrettich

2.1.8.2 Immunfluoreszenz

Die verwendeten Antikörper für die Immunfluoreszenz sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tab. 7: Antikörper Immunfluoreszenz.

Primär-Antikörper	Quelle	Endkonzentration	Hersteller
Anti-S100A4-rabbit	Hase	1:4000	Cell Signaling Technology, (Danvers, USA)
Sekundär-Antikörper	Quelle	Endkonzentration	Hersteller
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Hase	1:2000	Cell Signaling Technology, (Danvers, USA)

2.1.9 Oligonukleotide

2.1.9.1 QuantiTect Primer Assays

Die verwendeten Oligonukleotide der QuantiTect Primer Assays sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tab. 8: Oligonukleotide der QuantiTect Primer Assays.

Dargestellt sind die offiziellen Bezeichnungen der Qiagen-Produkte, die Größe des zu erwartenden Produktes sowie die Referenzsequenz der mRNA, auf deren Grundlage die Primer gestaltet wurden.

Gen	Bezeichnung	Produkt	Ref.-Sequenz
GAPDH	Hs_GAPDH_2_SG	119 bp	NM_002046
Interleukin-6	Hs_IL6_1_SG	107 bp	NM_00600
Interleukin-8	Hs_CXCL8_1_SG	102 bp	NM_000584

2.2 Methode

2.2.1 Parodontale Ligamentzellen

Alle Arbeiten für die Explantation, Kultivierung und Passagierung der Zellen erfolgten in einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank mit sterilem Material. Vor Inbetriebnahme der Werkbank wurde diese mit 70 % Ethanol oder mit dem Desinfektionsmittel pursept® A gereinigt. Die Basis des verwendeten Kulturmediums war Dulbecco's modified Eagle's medium (+Natrium Pyruvat/+ Pyridoxin/+1000 mg/l Glucose). Durch Zusätze wie 10% fetal bovine serum, 1% Vitamin C und 1% Penicillin-Streptomycin wurde das Medium auf die Bedürfnisse der PDL-Zellen angepasst. Kultiviert wurden die Zellen in mit 7 ml DMEM gefüllten, 75 cm² großen, Zellkulturflaschen im CO₂-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Alle zwei bis drei Tage wurde je nach Bedarf der Zellpopulation das Medium gewechselt und per mikroskopischer Kontrolle das Zellwachstum kontrolliert und eine möglicherweise vorhandene Kontamination ausgeschlossen. Mit einer sterilen Glaspipette wurde das Medium abgesaugt und das neue, auf 37 °C vorgewärmte Medium mittels einer 10 ml Pipette appliziert. Alle für die Versuche verwendeten PDL-Zellen befanden sich in der 3. bis 5. Passage.

2.2.1.1 Passagieren von parodontalen Ligamentzellen

Adhärenente Zellen wachsen als zusammenhängende einschichtige Zellschicht unter Anheftung an eine Oberfläche. Sie zeigen dichteabhängige Proliferationshemmung, eine sogenannte Kontaktinhibition. Eine weitere Zellvermehrung ist dann nur durch eine Passagierung möglich. Passagieren ist in regelmäßigen Abständen notwendig, damit Zellen in einem teilungsfähigen Zustand bleiben und nicht durch Stoffwechselprodukte oder Nährstoffmangel sterben. Definitionsgemäß versteht man unter dem Begriff Passagieren das Ausdünnen der kontinuierlichen Zellkultur, bevor die vollständige Konfluenz erreicht wurde, um die durch die Kontaktinhibition erzeugte Verlangsamung der Zellteilungsrate zu vermeiden (Gstraunthaler und Lindl, 2013). Die Passagierung erfolgte nach ständigem Wechsel des Mediums, sobald die Zellen eine Konfluenz von über 90 % erreichten. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 5 ml PBS-Puffer gewaschen, um Proteine zu lösen und Reste des Zellmediums zu entfernen, welche die Wirkung des Trypsins verringern bzw. inhibieren. Nach dem Absaugen der Waschlösung wurden die konfluenten Zellen für maximal 5 min bei 37 °C mit 1,8 ml Trypsin-EDTA inkubiert. Der Moment, in dem sich alle Zellen vom Boden lösten, wurde durch eine regelmäßige Kontrolle per Mikroskop überwacht. Nachdem die adhärenente Zellen durch das Einziehen ihrer Pseudopodien abgelöst wurden, stoppte man die durch Trypsin induzierte Reaktion mit der doppelten Menge serumhaltigen Medium (ca. 4 ml). Mit einer 10 ml Pipette wurden die Zellen vom Boden der Flaschen gespült, die etwa 6 ml Zellsuspension homogenisiert und in ein 15 ml Falcontube überführt. Die Zelllösung wurde bei 500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand aus dem Trypsin-Medium-Gemisch wurde vorsichtig entfernt, ohne das Zellpellet einzusaugen. Die Zellansammlung wurde erneut mit dem Zellmedium resuspendiert. Die Zellen konnten nun auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt oder für einen Zellversuch vorbereitet werden. Für die mRNA- und Proteinanalyse wurden PDL-Zellen in 35 mm Petrischalen mit einer Ausgangszellzahl von 50×10^3 Zellen/Schale ausgesät. Für die morphologische Analyse wurden die Zellen auf Deckgläsern kultiviert. Für die Versuche wurden Zellkulturen bis zu einer Konfluenz von 70 % kultiviert und einen Tag vor dem Versuch auf Kulturmedium mit reduziertem Serumanteil von 1 % FBS umgestellt.

2.2.1.2 Kryokonservierung

Zur Etablierung eines ständig verfügbaren Zellpools auf niedriger Passage wurden die Zellen regelmäßig eingefroren. Der Ablauf zur Kryokonservierung gleicht dem Ablauf einer Passagierung. Der Unterschied besteht in der Behandlung des Zellpellets im Falcontube. Bei der Kryokonservierung wurden die Pellets in ein für das Einfrieren geeignetes Medium (DMEM, 10 % FBS, 1 % Pen/Strep und 5 % DMSO) resuspendiert und in 1 – 1,5 ml großen Portionen in beschriftete Kryoröhrchen aufgeteilt. Diese wurden bei -80 °C für etwa 1 std in einer Styroporbox oder einer Kryotiefkühlbox behutsam eingefroren, bevor sie ohne Box einsortiert werden konnten.

2.2.1.3 Auftauen von Zellen

Um optimale Voraussetzungen für die Adhäsion am Boden der Zellkulturflasche und für das Überleben der Zellen zu schaffen, wurden 10 ml DMEM in einer beschrifteten Zellkulturflasche im CO₂-Inkubator vorbereitet. Die PDL-Zellen, welche sich in einem Kryoröhrchen im -80 °C Gefrierschrank befanden, konnten schnell in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und in die vorbereitete Zellkulturflasche überführt werden. Da es sich bei DMSO um eine zytotoxische Substanz handelt, musste aufgrund des restlichen DMSO Gehalts bei dieser Technik am nächsten Tag das Medium gewechselt werden. Eine alternative Möglichkeit zum Auftauen der Zellen besteht darin, die Zellen nach dem Auftauen aus dem Kryoröhrchen in ein mit 5 ml Medium gefülltes Falcontube zu überführen. Nach einer Zentrifugation von etwa 5 min bei 500 rpm sammelt sich am Boden des Gefäßes ein Zellpellet. Das mit DMSO angereicherte Medium wird vorsichtig abgesaugt und das Tube wird mit neuem Medium aufgefüllt. Der Vorteil dieser Technik ist, dass kein DMSO mehr im Medium vorhanden ist und das Medium nach der weiteren Überführung in die Zellkulturflasche nicht bereits am nächsten Tag gewechselt werden muss.

2.2.2 *Fusobacterium nucleatum*-Stimulation

Bei den unterschiedlichen Versuchsreihen wurde untersucht, inwiefern sich die Entzündungsparameter bei den unterschiedlichen Lysaten von *F.n.* verändern. Die Zellen wurden mit inaktiviertem *F.n.* vorinkubiert, um eine mikrobielle Infektion zu simulieren. Die

Herausforderung in den Vorversuchsreihen bestand darin, eine Konzentration zu finden, bei der die Entzündungsparameter der PDL-Zellen auf Genebene hochreguliert wurden, ohne dass die Zellkulturen durch die Menge an endotoxischen Lipopolysaccharide absterben. Die Konzentrationen des Bakterienlysats wurde anhand der optischen Dichte bestimmt. Es wurde mit unterschiedlichen optischen Dichten (OD) inkubiert. Die erste Inkubation erfolgte mit einer optischen Dichte von 0,025, dies entspricht bei einer OD des ursprünglichen Lysats von 2 einer Konzentration von 12,5 $\mu\text{l/ml}$. Für den Versuch inkubierten wir die Zellen zusätzlich mit einer höheren OD von 0,05 (25 $\mu\text{l/ml}$) und einer OD von 0,1 (50 $\mu\text{l/ml}$), um eine höhere Bakterienlast bzw. eine stärkere mikrobielle Infektion zu simulieren.

2.2.3 Plasma-Stimulation



Abb. 8: DBE Gerät plasma ONE der Firma plasma MEDICAL SYSTEMS GmbH.
a) Plasma ONE in Transportkoffer mit verschiedenen Elektroden und Box für Sonden.
b) Aufgebautes plasma ONE mit eingesteckter Instrumenten- und Patientensonde, im Hintergrund geöffnete Instrumentenbox und Transportkoffer.

Für die Versuche dieser Doktorarbeit wurde das Plasma-Therapiegerät plasma ONE der Firma plasma MEDICAL SYSTEMS GmbH, Nassau verwendet (Abbildung 8 a, b und 9). Aus dem großen Repertoire der verschiedenen Sondenaufsätze wurde sich für die Plasmasonde 30 (PS 30) entschieden, da diese durch ihre runde Form und den passenden Durchmesser exakt auf die kleinen Petrischalen ausgerichtet und so eine

gleichmäßige Behandlung der Zellen sicherstellen werden konnte. Diese ist in Abbildung 10 dargestellt. Im Rahmen der Vorversuchsreihen wurden unter Zuhilfenahme bereits publizierter Studien unserer Arbeitsgruppe (Eggers et al., 2023; Kleinedam et al., 2019) die Behandlungsparameter für die Plasmatherapie untersucht. Als Variablen der Therapie konnten der Abstand der Plasmaquelle zum zu behandelnden Objekt, die Plamaintensität und die Behandlungsdauer variiert werden. Als optimale Behandlungsparameter kristallisierte sich eine Behandlung mit der maximalen Intensität der Stufe 5 für 30 s bei einem geringstmöglichen Abstand heraus. Nach 1 std wurden die bereits mit *F.n.* präinkubierten Zellen direkt mit NIPP für 30 s mit einer Ausgangsleistung von 18 kV behandelt.



Abb. 9: Plasma ONE mit Patientensonde und Instrumentensonde PS 30 (dental).
- linke Halterung: Patientensonde mit schwarzem Kabel.
- rechte Halterung: Instrumentensonde mit blauem Kabel und eingesteckter PS 30.



Abb. 10: Großaufnahme der Instrumentensonde PS 30.

Die unbehandelten Zellen dienten als negative Kontrolle. Die Instrumentensonde benötigt einen Abstand von mehr als 0 mm und weniger als 1 mm zur behandelten Oberfläche, um korrekt arbeiten zu können. Ist der Arbeitsabstand erreicht, ertönt ein akustisches Signal und die Lichterscheinung in der gläsernen Instrumentensonde verstärkt sich (siehe Abbildung 11). Dementsprechend erfolgte die Behandlung der mit Medium bedeckten PDL-Zellen unter einem Abstand von ca. 0,5mm. Gemessen wurde der Abstand von der konvexen Fläche der Plasmasonde 30 bis zur Oberfläche des Zellmediums in der Zellkulturschale. Um einen stabilen Abstand zu gewähren, wurde ein Versuchsaufbau mit einem fixierten Laborstativ entwickelt. Dieser ist in Abbildung 11 dargestellt. Die Instrumentensonde wurde dabei über einen Widerstand mit der Patientensonde gekoppelt, um den Hautwiderstand eines Patienten zu simulieren (hier nicht zusehen).



Abb. 11: Sonde PS 30 im Bohrständer unter Versuchsbedingungen.

2.2.4 Versuchsansatz

Für die beiden Hauptversuche wurden PDL-Zellen einer Zelllinien (Lonza) verwendet. Als Stimulantien diente das kalte atmosphärische Plasma und das Lysat des *F.n.* Im Versuchsansatz wurden PDL-Zellgruppen auf einzelnen kleinen Petrischalen aufgeteilt und verschieden stimuliert. In beiden Hauptversuchsreihen wurde Gruppe 1 ohne Stimulantien bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % inkubiert und diente als Kontrolle.

Im Rahmen der ersten Hauptversuchsreihe wurden die PDL-Zellen mit einer zunehmende Bakterienkonzentration vorbehandelt, um eine stärkere Infektion zu simulieren. Die Konzentration der Bakterien wurde in drei verschiedenen Bakteriengruppen von 12,5 µl/ml über 25 µl/ml auf 50 µl/ml gesteigert bzw. einer OD von 0,025, 0,05, und 0,1. Alle Gruppen wurden für 24 bzw. 48 std inkubiert. Dieser Versuchsaufbau ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tab. 9: Versuchsaufbau mit aufsteigender Bakterienkonzentration.

Kontrollgruppe: ohne Vorbehandlung; Bakteriengruppe 1 - 3: Bakterieninfektion für 24 und 48 std mit einer OD von 0,025, 0,05 und 0,1 bzw. einer Konzentration von 12,5 µl/ml, 25 µl/ml und 50 µl/ml;

	F.n. 0,025	F.n. 0,05	F.n. 0,1
Kontrollgruppe			
Bakteriengruppe 1	+		
Bakteriengruppe 2		+	
Bakteriengruppe 3			+

Im Rahmen der zweiten Hauptversuchsreihe wurden die PDL-Zellen mit einer *F.n.* – Konzentration von 12,5 µl/ml (OD von 0,025) inkubiert, um eine bakterielle Infektion *in vitro* zu simulieren. Eine weitere Gruppe wurde für 30 s mit Plasma der Stufe 5 bei einem Abstand von ca. 0,5 mm behandelt, um die Auswirkungen der Plasmabehandlung auf gesunde Zellen zu untersuchen. Diese beiden Gruppen wurden für 24 std inkubiert. Um die Anwendung von NIPP auf bakterielle Infektionen zu simulieren, wurden in der Kombinationsgruppe die Zellen 1 std vor der Plasmabehandlung mit oben genannten Parametern mit 12,5 µl/ml *F.n.* inkubiert und ebenfalls für 24 und 48 std inkubiert. Dieser Versuchsaufbau ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tab. 10: Versuchsaufbau mit einer Bakterienkonzentration.

Kontrollgruppe: ohne Vorbehandlung; Bakteriengruppe: Bakterieninfektion für 24 std mit einer OD von 0,025 bzw. einer Konzentration von 12,5 µl/ml; Plasmagruppe: Plasmabehandlung für 30 s bei Plasmastufe 5 und Inkubation von 24 h; Kombinationsgruppe: Präinkubation *F.n.* 12,5 µl/ml für 1 std und Plasmabehandlung für 30 s bei Intensivität 5 und Inkubation von 24 h

	F.n. 0,025	NIPP
Kontrollgruppe		
Bakteriengruppe	+	
Plasmagruppe		+
Kombinationsgruppe	+	+

2.3 Genexpression in parodontalen Ligamentzellen

2.3.1 Analyse der mRNA

Das Prinzip der Analyse der Genexpression mittels real-time PCR beruht darauf, dass RNA aus Zellen extrahiert wird und in cDNA revers transkribiert wird. Während der PCR werden durch ausgewählte Primer spezifische Gene amplifiziert. Als Fluoreszenzfarbstoff dient das SYBR-Green, welches bei jedem Zyklus gemessen wird und dadurch eine quantifizierte Messung ermöglicht.

2.3.2 RNA-Isolation

Die Gewinnung der RNA erfolgte in allen Versuchsreihen mit dem RNeasy[®] Protect Mini Kit. Die Extraktion erfolgte nach dem Herstellerprotokoll für humane Zellkulturen. Alle im Folgenden beschriebenen Schritte zur RNA-Extraktion erfolgten zum Stoppen der weiteren Zellreaktionen auf Eis. Je nach Versuch wurden zunächst die Überstände gesammelt. Die Zellkulturen in den Petrischalen wurden jeweils zweimal mit 500 µl PBS Waschpuffer gewaschen. Alle Proben wurden mit 350 µl Lysis-Puffer bestehend aus 2-Mercaptoethanol und RLT versetzt und homogenisiert. Mit Hilfe eines sterilen Scrapers wurden die Zellen und der Puffer vermenget. Dieses Zell-Puffer-Gemisch wurde in vorbereiteten Eppendorf Tubes aufgefangen und im Verhältnis 1:1 mit 70 % prozentigem Ethanol gemischt. Nach der Vermischung des Zell-Puffer-Gemisches und dem Ethanol konnte auf eine weitere Kühlung verzichtet werden. Die gelösten Proben wurden auf eine RNeasy[®] Säule pipettiert und bei 13.200 rpm für 60 s zentrifugiert. Der Überstand aus dem Auffangtube wurde verworfen. Es folgte nach Zugabe von 700 µl RW1-Waschpuffer ein weiterer Zentrifugationsschritt für 1 min bei 13.200 rpm bei dem das Zentrat erneut verworfen wurde. Dieser Vorgang wurde zweimal mit je 500 µl RPE Puffer und den gleichen Zentrifugationseinstellungen wiederholt. Im weiteren Verlauf wurde die RNeasy[®] Säule mit einem leeren Auffangtube für 15 s bei $13,2 \times 10^3$ rpm zentrifugiert und das Filtrat ebenfalls verworfen. Als letzter Schritt erfolgte die Eluierung der auf den Säulen gebundenen RNA mit 20 µl RNase-freiem Aqua dest. für 1 min bei $13,2 \times 10^3$ rpm in ein 1,5 ml Sammelröhrchen. Das Wasser wurde direkt auf die Silica-Gel-Membran pipettiert. Das Gesamt-Eluat betrug 20 µl. Im Anschluss konnte die gewonnene RNA bei -80°C gelagert werden oder zur Messung der RNA Konzentration mittels Spektrophometer verwendet werden.

2.3.3 Umwandlung der RNA in cDNA

Zunächst wurde der RNA-Gehalt der Proben photometrisch mittels NanoDrop bei 260 und 280 nm bestimmt (ng/µl). Dieser ist in Abbildung 12 dargestellt. Zur Initialisierung der Messung bzw. als Negativkontrolle wurde 1 µl Nuklease freies Wasser auf die Messfläche pipettiert und gemessen. Im Anschluss daran wurde von jeder Probe 1 µl verwendet, um die Konzentration der RNA zu bestimmen. Mit einem Papiertuch wurden nach jeder Messung die Reste rückstandslos von der Messfläche entfernt. Anhand dieser Ergebnisse wurden die Proben normiert, damit die gleiche Menge an RNA (500 ng) pro Probe für die Folgeschritte vorlag. Dafür wurden die Proben mit Wasser verdünnt, auf die gleiche Konzentration und ein Volumen von 13 µl gebracht.



Abb. 12: NanoDrop 2000 der Firma Thermo Fisher Scientific, Dreieich.

Zur Gewinnung der einsträngigen cDNA wurde das iScript cDNA Synthese Kit von Bio-Rad nach Angaben des Herstellers verwendet. Das 13 µl große Template aus RNA und Wasser wurde zusammen mit einem 7 µl Mastermix in einem 0,45 ml Tube gelöst. Die Zusammensetzung des Master-Mix für die cDNA-Synthese ist in Tabelle 11 zu sehen.

Tab. 11: Ansatz Master-Mix für cDNA-Synthese.

Pro Probe setzte sich der Inhalt des Tubes aus den folgenden Komponenten zusammen:

Reagenz	Menge
Template (RNA + Nuklease freies H ₂ O)	13,0 µl
5x Script Mix	4,0 µl
Oligo-dt Primer	2,0 µl
iScript reverse Transkriptase	1,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

Die Inkubation der vorbereiteten Tubes für die Herstellung der cDNA erfolgte im MyCycler (siehe Abbildung 13). Als erster Schritt wurde für die Synthese der cDNA für 90 min eine Temperatur von 42 °C gehalten. Diese Temperatur wurde für weitere 5 min gehalten. Danach folgte eine Inkubation von 5 min bei 85 °C zur Hitzeinaktivierung der reversen Transkriptase. Im vierten und letzten Schritt erfolgte für 10 s die Kühlung auf 25 °C. Dieses Protokoll ist in Tabelle 12 dargestellt. Die entstandene cDNA konnte anschließend bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert oder für eine Analyse der Proben auf Genebene mittels real-time PCR verwendet werden.

Tab. 12: MyCycler-Protokoll für cDNA-Synthese.

Temperatur in °C	Zeit in min	Schritt
42	90	cDNA Synthese
42	5	letzte Schritte beenden
85	5	Enzym-Inaktivierung
25	abschließend	kühlen



Abb. 13: MyCycler™ Thermal Cycler der Firma Bio-Rad, München.

2.3.4 Quantitative realtime-PCR

Zur Analyse der cDNA Proben auf Genebene mittels PCR musste zuerst der Mastermix angesetzt werden. Die genaue Zusammensetzung ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tab. 13: Ansatz Master-Mix für PCR-Analyse.

Reagenz	Menge
SSoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	12,5 µl
deionisiertes Wasser	9,0 µl
Primer	2,5 µl
cDNA	1,0 µl
Gesamtvolumen	25,0 µl

In eine 96-Well-Platte wurden 24 µl Mastermix pro Well vorbereitet und 1 µl cDNA hinzupipettiert. Die Platte wurde mit einer transparenten Klebefolie versiegelt und im iCycler iQ5 Detektionssystem inkubiert. Es wurde das folgende Amplifikationsprotokoll verwendet: 95 °C für 5 min zur Erwärmung und enzymatischen Aktivierung, gefolgt von 50 Zyklen Denaturierung bei 95 °C für 10 s und kombiniertes Annealing/Extension bei 60 °C für 30 s. Im Anschluss erfolgte die Schmelzkurve durch Abkühlen von 95 °C für 1 min auf 55 °C für 1 min. Für eine Dauer von 80 Zyklen für jeweils 10 s wurde die Temperatur bei 55 °C gehalten. Die Analyse der Daten erfolgte gemäß der $\Delta\Delta CT$ -Methode (comparative threshold cycle). Die realtime PCR ermöglicht die absolute oder relative Quantifizierung. Bei der absoluten Quantifizierung wird zunächst eine Standardkurve erstellt, um im eigentlichen Versuch die exakte Menge des Zielgens in der Probe zu bestimmen. In diesem Fall wurde die relative Quantifizierung verwendet, um den Unterschied in der Genexpression zwischen der Probe und der Kontrolle zu ermitteln. Die Berechnung der Expressionsunterschiede basiert auf den CT (cycle threshold)- oder CP (crossing point)-Werten des behandelten Probenmaterials, der unbehandelten Kontrolle und des Housekeeping-Gens (Referenzgen). In diesem Fall diente Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenz (Pfaffl, 2004). Der CT-Wert wird während der exponentiellen Phase der PCR gemessen und gibt an, wie viele Zyklen benötigt werden, um ein messbares spezifisches Fluoreszenzsignal zu erhalten und das

unspezifische Hintergrundfluoreszenzsignal zu übersteigen. Ein niedriger CT-Wert deutet auf eine höhere DNA-Ausgangsmenge in der Probe hin. Durch die Normalisierung mittels Delta-CP-Werten werden Störfaktoren ausgeglichen, die sowohl die Probe als auch das Referenzgen beeinflussen könnten. Der Delta-Delta-CP-Wert wird errechnet, um den relativen Expressionsunterschied zwischen der behandelten Probe und der unbehandelten Kontrolle zu bestimmen (Pfaffl, 2004).

2.4 ELISA

2.4.1 Proteinanalyse ELISA

Die Überstände der mit NIPP und *F.n.* stimulierten sowie der unstimulierten Kontrollen wurden nach Beendigung der Inkubationszeit entnommen, in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C eingefroren. Die Proteingehalte von IL-6 und IL-8 wurden in Zellkulturüberständen mit spezifischen Enzymimmunoassay (ELISA)-Kits gemäß den Anweisungen des Herstellers analysiert. Für den IL-6- und den IL-8-ELISA wurde das DuoSet ELISA Development System (R&D, Abingdon, England) verwendet.

Immuno 96 MicroWell™ Solid Plates mit MaxiSorp-Oberfläche (hohe Affinität zu Proteinen mit sowohl hydrophilen als auch hydrophoben Domänen) und flachem Boden wurden mit einer Fänger-Antikörper-Lösung (4 µg/ml in PBS; 100 µl pro Well) befüllt, mit Klebefolie versiegelt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung entfernt und dreimal mit 400 µl Waschpuffer (0,05 % Tween 20 in PBS, pH 7,4) gespült. Nach dem letzten Waschvorgang erfolgte die Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen durch 5 % Tween® 20 in PBS für mindestens 1 std bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgten drei weitere Waschzyklen (je 400 µl pro Well). Danach wurden Proben und Standards (0 bis 2000 ng/ml, verdünnt in der Blockierungslösung) in die Wells pipettiert (100 µl pro Well), die Platte versiegelt und 2 std bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte erneut dreimal gewaschen und eine zweistündige Inkubation mit biotinyliertem Detektions-Antikörper (150 ng/ml in Blockierungslösung, lichtgeschützt) durchgeführt. Nach weiteren drei Waschvorgängen wurde Streptavidin-HRP (100 µl pro Well) zugegeben und für 20 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei abschließenden Waschschr

wurde zur Enzymreaktion 100 µl pro Well ABTS-Substratlösung (Sigma-Aldrich, München) hinzugefügt und für 60 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Die Analyse wurde mit einem Spektralphotometer (BioTek Instruments, Winooski, USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm durchgeführt. Dieses Spektralphotometer ist in Abbildung 14 zu sehen. Die Proteinkonzentrationen von IL-6 und IL-8 wurden mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit und einem Spektralphotometer bei 570 nm auf die Gesamtproteinkonzentration normiert.



Abb. 14: Spektralphotometer Epoch der Firma BioTek, Winooski, USA.

2.5 Immunfluoreszenzfärbung

2.5.1 Färbung zur Zellmorphologie und Lebensfähigkeit

Nach erfolgreicher Kultivierung und Adhärenz der PDL-Zellen auf den 13 mm Deckgläsern wurden die Zellen in der Kontrollgruppe unbehandelt inkubiert und in der Versuchsreihe entsprechend des Versuchsaufbaus für 30 s mit NIPP behandelt und 24 std inkubiert. Die PDL-Zellen wurden 10 min lang mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und 5 min lang in 0,1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) permeabilisiert. Für die Markierung der Aktinfilamente wurden die Zellen 60 min lang mit Phalloidin inkubiert. Die DNA wurde durch 5-minütige Inkubation mit DAPI gefärbt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde mit PBS gespült. Nach dem Einbetten mit Mowiol wurden die Zellen mit dem ZOE Fluorescent Cell Imager (siehe Abbildung 15) analysiert. Unter dem fluoreszierenden Licht wurden die Aktinfilamente in einem leuchtenden grünen Ton und die DNA in einem blauen Ton sichtbar.



Abb. 15: ZOE™ Fluorescent Cell Imaging der Firma Bio-Rad, München.

2.5.2 Bestimmung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies

Die von den PDL-Zellen erzeugten ROS wurden mit dem CellROX™ tiefroten Reagenz gemäß den Anweisungen des Herstellers nachgewiesen. CellROX-Reagenzien für oxidativen Stress sind fluorogene Sonden, die für die zuverlässige Messung der ROS in lebenden Zellen entwickelt wurden. Die zellpermeablen Reagenzien sind im reduzierten Zustand nicht oder nur sehr schwach fluoreszierend und zeigen bei Oxidation ein starkes fluorogenes Signal. Die Signale der Reagenzien des Farbstoffs CellROX® Deep Red sind im Zytoplasma lokalisiert.

Zu Beginn erfolgte ein Waschschriff mit 500 µl PBS pro Well. Anschließend wurde 250 µl Medium hinzugegeben. Es folgte vor der Stimulation der Zellen die Inkubation mittels CellROX™ tiefrotes Reagenz in einer Konzentration von 2 mM für 30 min bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden nach der Inkubation für 30 s, 120 s und 180 s bei Plasmastufe 5 und geringstmöglichem Abstand mit Plasma behandelt. Vor der Auswertung erfolgten zwei weitere Waschschriffe mittels PBS. Die zelluläre ROS-Produktion wurde nach 10 min und 60 min mit dem ZOE Fluorescent Cell Imager wie unter der bereits beschriebenen Färbung zur Zellmorphologie mittels DAPI und Phalloidin visualisiert. Zusätzlich wurde die ROS-Produktion mit einem Fluoreszenz-Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 665 nm quantifiziert. Das Vorgehen entsprach den Vorgaben des Herstellers. Die Zellen wurden nach der Anfertigung der Fotos mit 200 µl pro Well trypsiniert. Neutralisiert wurde die Reaktion mit 600 µl 10% FBS. Die Überstände wurden in Eppendorfgefäße überführt und für 3 min zentrifugiert.

Anschließend wurden sie verworfen und die Zellpellets resuspendiert. Abschließend erfolgte wie bereits beschrieben die Auswertung.

2.6 Statistische Auswertung

Alle Versuche wurden mindestens drei Mal wiederholt. Für die statistische Auswertung wurden die nicht-parametrischen Tests Kruskal-Wallis-Test mit post hoc Dunn's Test mit Mehrfachvergleich verwendet sowie die einfaktorielle ANOVA mit post hoc Tukey's multipler Vergleichstest herangezogen. Die statistische Analyse wurde mit der Software GraphPad Prism Version 10 durchgeführt. Unterschiede mit $p > 0,05$ werden als nicht signifikant und mit $p < 0,05$ als signifikant (*) angesehen.

2.6.1 Software und Online-Tools

Die verwendete Software und Online-Tools sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Tab. 14: Software und Online-Tools.

Software / Online-Tool	Firma / Referenz
GraphPad Prism™ 10.0	GraphPad Software, San Diego, USA
iQ5 optical system software, version 2.0	Bio-Rad, Feldkirchen
NanoDrop 2000 software, Version 1.6	Thermo Scientific, Dreieich
Excel Microsoft 365, Version 16.69.1	2021 Microsoft Corporation, Redmond, USA

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von nicht-invasivem physikalischem Plasma auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in parodontalen Ligamentzellen

Zunächst haben wir die Wirkung des NIPP auf die PDL-Zellen untersucht. Es wurde getestet, ob die Inkubation von PDL-Zellen mit NIPP intrazelluläre ROS erzeugt. Die PDL-Zellen wurden in drei verschiedenen Gruppen mit ansteigender Dosis für 30 s, 120 s und 180 s mit NIPP behandelt. Die Kontrollgruppe wurde nicht mit NIPP behandelt.

Die NIPP-Behandlung führte nach 10 min zu einer dosisabhängigen, intrazellulären ROS-Produktion (Abbildung 16 a-d). Eine statistische Signifikanz besteht zwischen der Kontrollgruppe und den für 120 s behandelten PDL-Zellen sowie zwischen der Kontrollgruppe und den für 180 s behandelten PDL-Zellen. Die ROS-Produktion wurde 60 min nach der NIPP-Behandlung nicht mehr nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

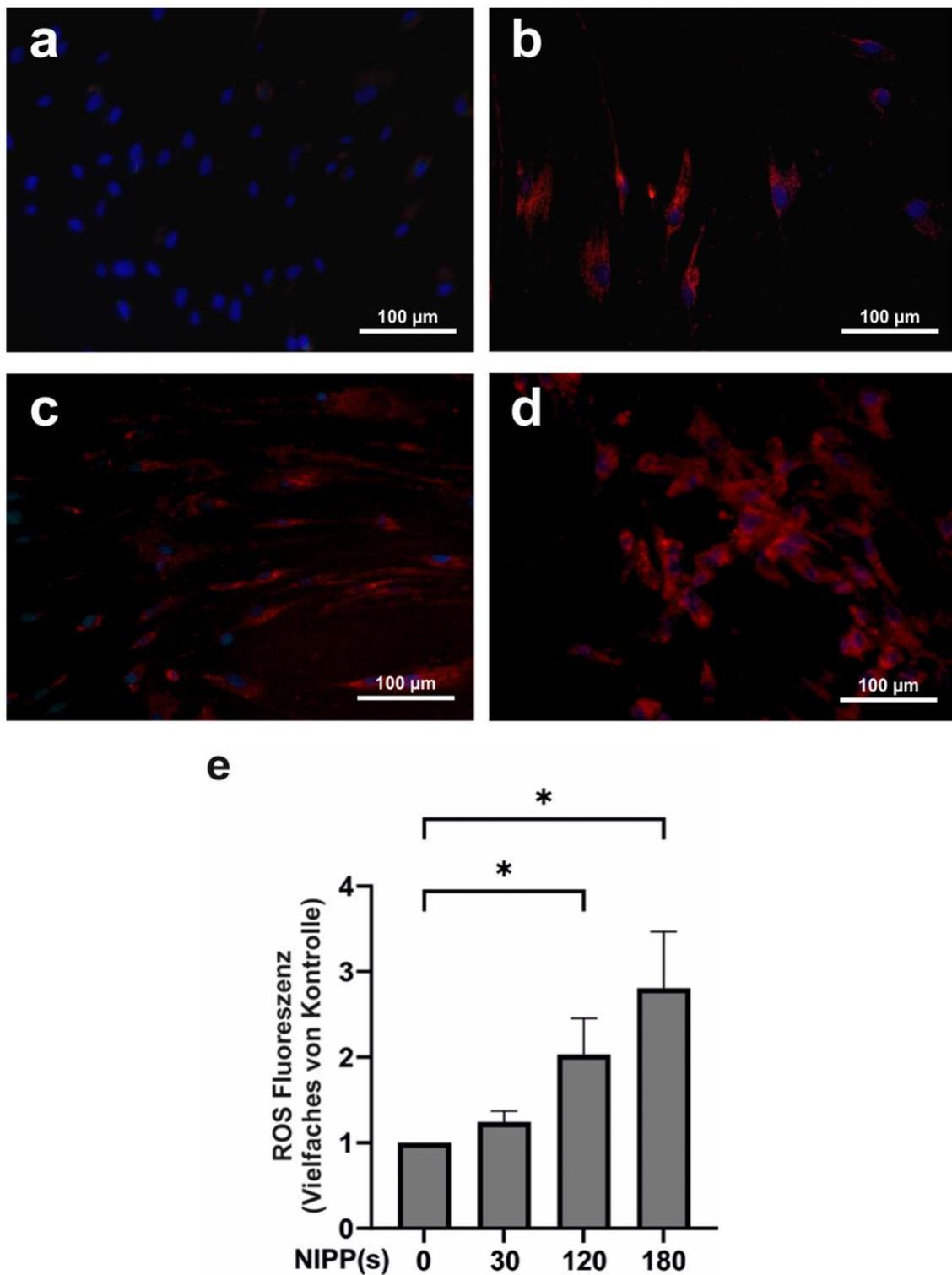


Abb. 16: Immunfluoreszenzfärbung der ROS-Produktion in PDL-Zellen. Immunfluoreszenzfärbung der ROS-Produktion in PDL-Zellen, 10 min nach NIPP-Behandlung; Die Zellen wurden für 0 s (a), 30 s (b), 120 s (c) und 180 s (d) behandelt. Der Maßstab ist 100 µm. Die ROS-Fluoreszenz wurde mit einem Fluoreszenz-Reader gemessen (e). n = 4. * statistische Signifikanz ($p < 0,05$). (Modifiziert nach Eggers et al., 2024)

3.2 Einfluss von nicht-invasivem physikalischem Plasma auf die Morphologie und die Lebensfähigkeit von parodontalen Ligamentzellen

Nach dem Nachweis einer durch NIPP induzierten ROS Produktion in PDL-Zellen konzentrierten wir uns auf die Dauer der Anwendungszeit. Im Rahmen der Vorversuche (Daten nicht gezeigt) und in einer früheren Studie von Eggers et al. (2023) stellte sich eine Anwendungszeit von 30 s als effektivste Behandlungsdauer heraus. Unser erstes Ziel war es, zu beobachten, ob die gewählte NIPP-Behandlungszeit einen negativen Einfluss auf die Lebensfähigkeit und die Zellmorphologie der PDL-Zellen hat. Die Phalloidin-DAPI-Doppelfärbung zeigte 24 std nach der NIPP-Behandlung ein intaktes Zytoskelett und unbeschädigte Zellkerne (Abbildung 17a, b). Dies deutet darauf hin, dass NIPP in diesem Zeitraum keinen schädlichen Einfluss hat.

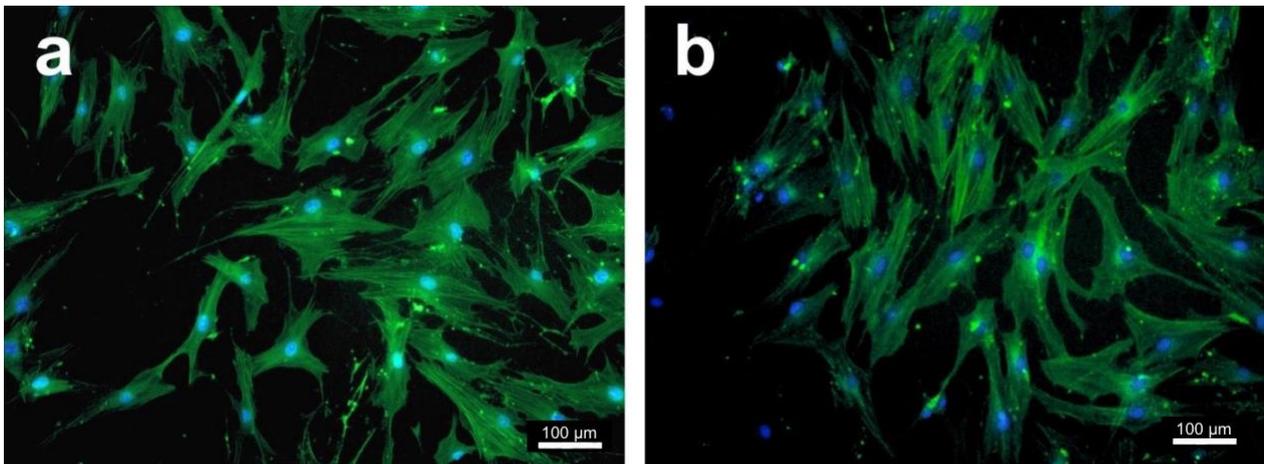


Abb. 17: Immunfluoreszenzfärbung von PDL-Zellen.

Immunfluoreszenzfärbung von Zellen des parodontalen Ligaments mit DAPI (blaue Färbung des Zellkerns) und Phalloidin (grüne Färbung des Zytoskeletts), die unbehandelt (a) oder 30 s lang mit NIPP behandelt wurden nach 24 std (b). Die NIPP-Behandlung zeigte keine zytotoxischen Wirkungen. Der Maßstab ist 100 µm.

(Modifiziert nach Eggers et al., 2024)

3.3 Einfluss des *Fusobacterium nucleatum* auf die Regulierung von Interleukin-6 und Interleukin-8 in parodontalen Ligamentzellen

Nachdem wir die Auswirkungen von NIPP auf PDL-Zellen untersucht hatten, etablierten wir ein *In vitro*-Modell für die mikrobielle Stimulation. Zu diesem Zweck wurden PDL-Zellen mit Lysaten des Parodontopathogens *F.n.* inkubiert. Da das Ziel unserer Studie darin bestand, die Auswirkungen der mikrobiellen Infektion zu untersuchen, wurde in diesem Schritt die optimale Konzentration der Bakterien für die Vorstimulation der Zellen in den folgenden Experimenten bestimmt. Nach 24 std Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen wurde eine zunehmende dosisabhängige IL-6-Expression auf mRNA-Ebene festgestellt, was sich nach 48 std auch auf Proteinebene zeigte (Abbildung 18 a, b). Ähnliche Ergebnisse wurden für die IL-8-Expression beobachtet, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nach 24 bzw. 48 std (Abbildung 18 c, d). Alle verwendeten Bakterienkonzentrationen (OD: 0,025-0,1) bewirkten einen signifikanten Anstieg der IL-6- und IL-8-Proteinspiegel (Abbildung 18 b, d). Aufgrund der dosisabhängigen Hochregulierung auf Proteinebene bei allen *F.n.*-Konzentrationen entschieden wir uns, für folgende Experimente die niedrigste *F.n.*-OD von 0,025 zu verwenden, um in den nachfolgenden Experimenten eine mikrobielle Umgebung zu simulieren.

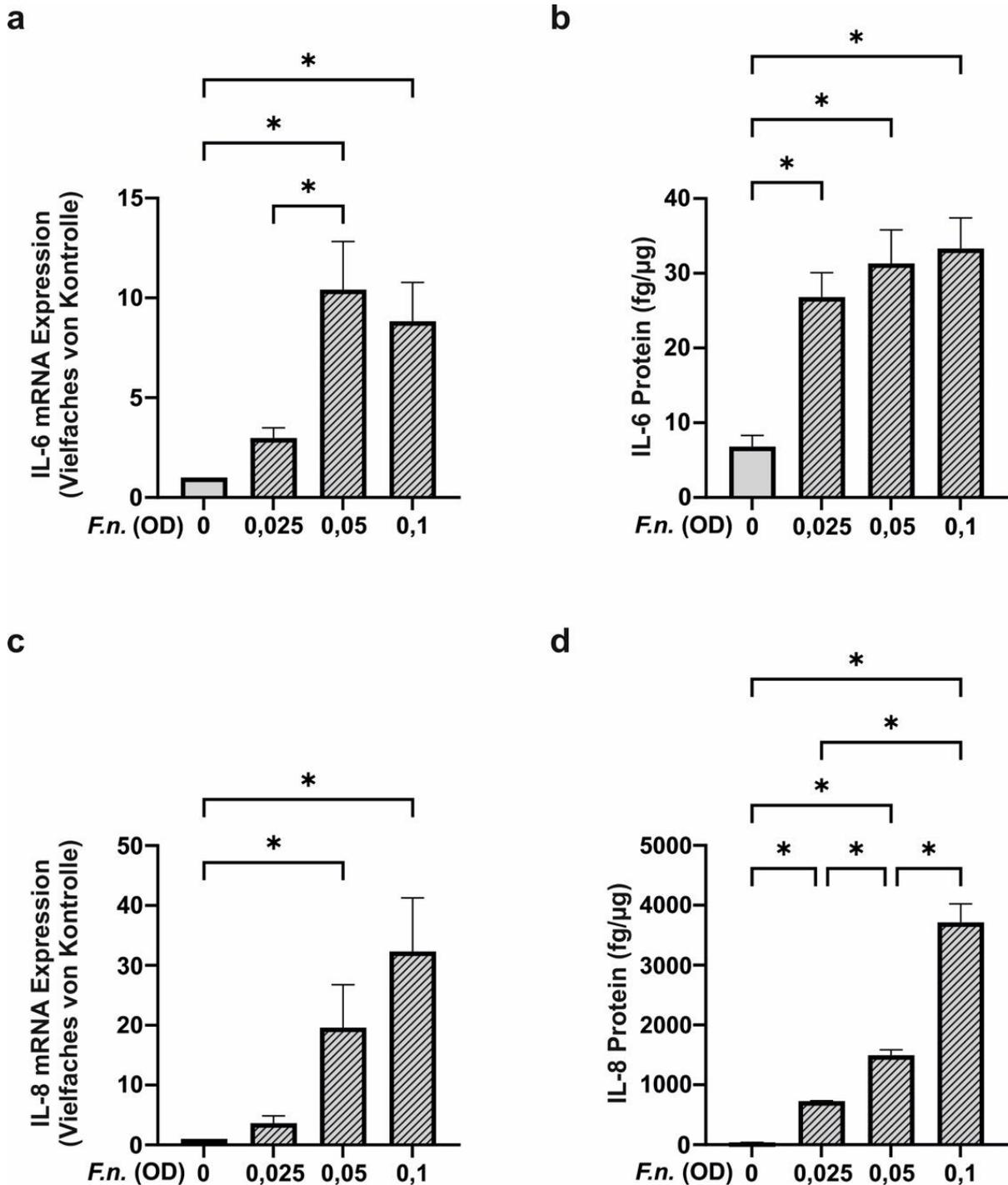


Abb. 18: IL-6- und IL-8-Spiegel nach Inkubation mit *F.n.* in PDL-Zellen.

IL-6- und IL-8-Spiegel in PDL-Zellen nach Vorinkubation mit inaktiviertem *F.n.* in verschiedenen Konzentrationen (OD=0,025, 0,05, 0,01). (a) IL-6-mRNA-Expression nach 24 std, n = 9 (b) IL-6-Proteinspiegel nach 48 std, n = 12 (c) IL-8-mRNA-Expression nach 24 std, n = 9 (d) IL-8-Proteinspiegel nach 48 std, n = 12. * statistische Signifikanz (p < 0,05).

(Modifiziert nach Eggers et al., 2024)

3.4 Einfluss von nicht-invasivem physikalischem Plasma und *Fusobacterium nucleatum* auf die Regulierung von Interleukin-6 in parodontalen Ligamentzellen

In einem folgenden Schritt wurde die Wirkung von NIPP auf *F.n.* vorinkubierte PDL-Zellen untersucht. Es wurde festgestellt, dass NIPP keine direkte Auswirkung auf die Regulierung von IL-6 auf der mRNA-Ebene hatte (siehe Abbildung 19 a) und nur zu einem leichten Anstieg der Proteinmenge führte (siehe Abbildung 19 b). Die Vorinkubation mit *F.n.* induzierte einen Anstieg der IL-6-Expression auf mRNA-Ebene und induzierte einen signifikanten Anstieg der IL-6-Proteinmenge im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Behandlung von *F.n.* vorinkubierten PDL-Zellen mit NIPP führte jedoch zu einer signifikanten Zunahme der IL-6-Expression im Vergleich zur Kontrolle, obwohl die IL-6-Expression im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit *F.n.* nicht signifikant verändert war. Interessanterweise konnte der signifikante Anstieg der IL-6-Proteinmenge durch die *F.n.* Vorinkubation durch NIPP ausgeglichen werden. NIPP führte dementsprechend zu einer signifikanten Reduzierung der IL-6-Proteinmenge im Vergleich zur *F.n.* Vorinkubation (siehe Abbildung 19 b).

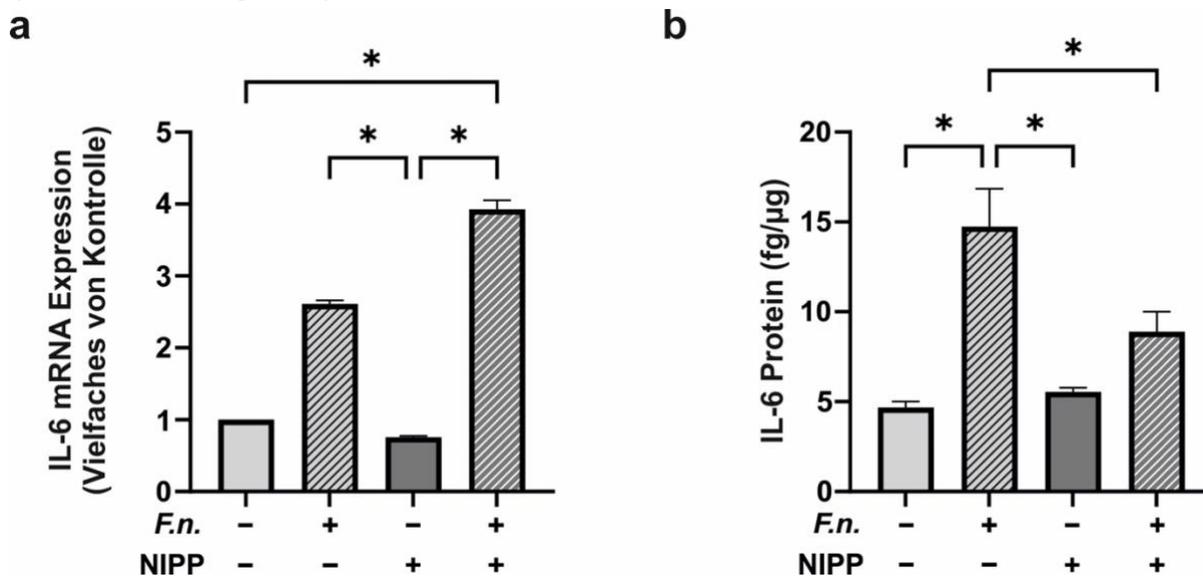


Abb. 19: IL-6-Spiegel nach *F.n.*-Inkubation und NIPP-Behandlung in PDL-Zellen. IL-6-Regulation in PDL-Zellen nach 24-stündiger Vorinkubation mit inaktiviertem *F.n.* bei OD 0,025 (+) und nach 30 s NIPP-Behandlung (+). (a) IL-6-mRNA-Expression nach 24 std, n = 6 (b) IL-6-Proteinspiegel nach 48 std, n = 12. * statistische Signifikanz (p < 0,05). (Modifiziert nach Eggers et al., 2024)

3.5 Einfluss von nicht-invasivem physikalischem Plasma und *Fusobacterium nucleatum* auf die Regulierung von Interleukin-8 in parodontalen Ligamentzellen

In ähnlicher Weise untersuchten wir die Auswirkung von NIPP auf PDL-Zellen, die zuvor mit *F.n.* inkubiert wurden, in Bezug auf IL-8. Wie bei der Regulierung von IL-6, konnten wir feststellen, dass NIPP keine direkte Auswirkung auf die Regulierung von IL-8 auf der mRNA-Ebene hatte (siehe Abbildung 20 a) und nur zu einem leichten Anstieg des Proteinspiegels führte (siehe Abbildung 20 b). Die Vorinkubation mit *F.n.* induzierte einen Anstieg der IL-8-Expression auf mRNA-Ebene und induzierte einen signifikanten Anstieg der IL-8-Proteinmenge im Vergleich zur Kontrollgruppe. Wir stellten fest, dass die Genexpression von IL-8 in den Zellen, die die kombinierte Behandlung erhielten, signifikant anstieg (Abbildung 20 a). Auf Proteinebene war dieser Anstieg jedoch nicht nachweisbar. Ähnlich wie bei IL-6 wurde die durch *F.n.* induzierte Hochregulierung durch NIPP reduziert. In der Gruppe mit kombinierter Behandlung zeigte sich eine signifikante Verringerung des IL-8-Proteinspiegels im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit *F.n.* (Abbildung 20 b).

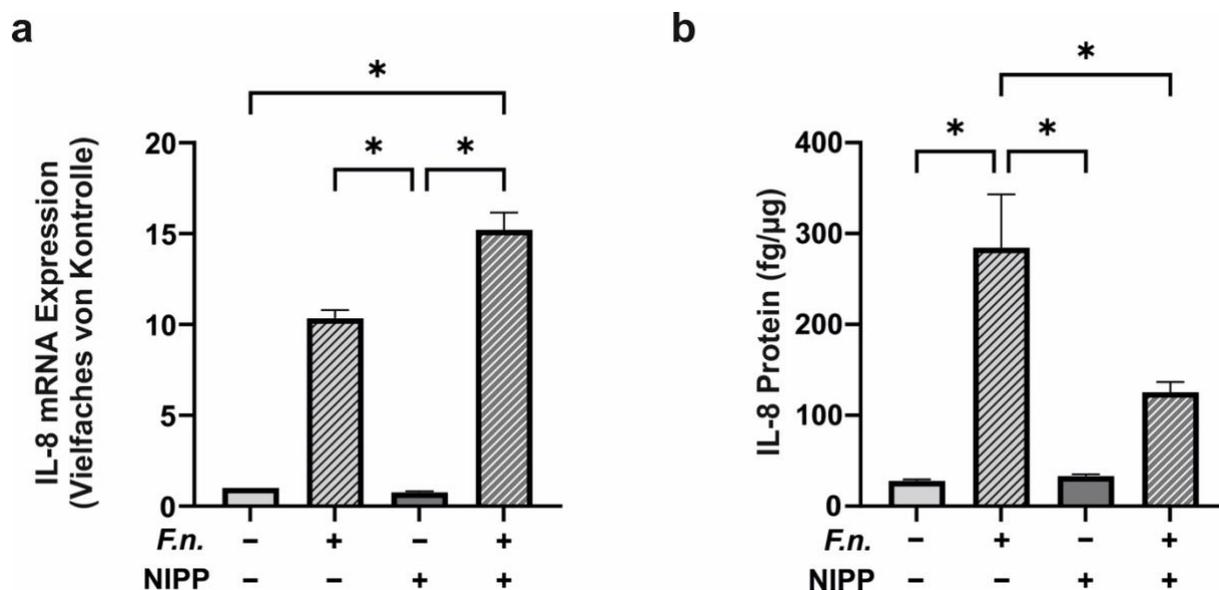


Abb. 20: IL-8-Spiegel nach *F.n.*-Inkubation und NIPP-Behandlung in PDL-Zellen. IL-8-Regulation in PDL-Zellen nach 24-stündiger Vorinkubation mit inaktiviertem *F.n.* bei OD 0,025 (+) und nach 30 s NIPP-Behandlung (+). (a) IL-8-mRNA-Expression nach 24 std, n = 6 (b) IL-8-Proteinspiegel nach 48 std, n = 12. * statistische Signifikanz (p < 0,05). (Modifiziert nach Eggers et al., 2024)

4. Diskussion

4.1 Plasma ONE-Gerät

Zur Behandlung der PDL-Zellen mit NIPP verwendeten wir eine dielektrische Barriereentladung. Bei diesen Gerätetypen wird das NIPP zwischen den zwei Elektroden erzeugt. In diesem NIPP-Gerät besteht der Entladungsspalt aus einer Elektrode mit einer isolierenden Schicht (Weltmann et al., 2010). Das zu behandelnde Objekt fungiert als zweite Elektrode, wie z.B. die PDL-Zellen in dieser Studie. Um NIPP zu erzeugen, muss das Gerät eng mit den parodontalen Zellen in Kontakt stehen. Dies kann in einigen klinischen Situationen eine Herausforderung darstellen.

In der Zahnmedizin wurden eine klinische Anwendung von DBE-Geräten bereits für die palatinale Wundheilung oder die antimykotische Therapie eingesetzt (Pekbağrıyanık et al., 2021; Preissner et al., 2016). Es gibt auch andere NIPP-Technologien, die keinen direkten Kontakt mit der zu behandelnden Oberfläche erfordern. Zum Beispiel können unebene Oberflächen mit einem Plasmastrahl behandelt werden. Ein Nachteil des Plasmastrahls besteht darin, dass der Behandlungsbereich begrenzt ist. Dennoch wird in der Literatur über den klinischen Einsatz in der Zahnmedizin berichtet, wie z. B. die Verbesserung der Wundheilung nach einer Gingivektomie durch die Anwendung eines Plasmastrahls (Kusakci-Seker und Demirayak-Akdemir, 2020).

Ein wichtiger Aspekt von NIPP-Studien ist, dass die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Behandlungen mit verschiedenen NIPP-Geräten begrenzt ist. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften des erzeugten NIPP sind in hohem Maße von der verwendeten Technologie abhängig und werden zusätzlich durch andere technische Variablen moduliert, z. B. Trägergas und Durchflussrate sowie Geräteparameter wie Leistung und Frequenz. All diese Faktoren haben einen Einfluss auf die Zusammensetzung des ROS-Gemisches, die Konzentrationen der einzelnen ROS und damit auf die biomedizinische Wirkung (Lee et al., 2017; Yoon et al., 2016).

4.2 Interleukin-6 und -8

Die Zytokine IL-6 und IL-8 gelten als Schlüsselfaktoren für die entzündlichen Prozesse bei einer Parodontitis (Noh et al., 2013). Deswegen haben wir uns auf diese proinflammatorischen Zytokine konzentriert. Das immunregulatorische Zytokin IL-6 wird von verschiedenen Immun- und Gewebezellen ausgeschüttet, wirkt auf Lymphozyten und spielt eine Rolle bei der Differenzierung von B- und T-Zellen (Boulanger et al., 2003; Kang et al., 2020; Kishimoto, 2006).

IL-6 ist an entzündlichen Erkrankungen wie systemischem Lupus erythematoses, Morbus Crohn und Parodontitis beteiligt (Linker-Israeli et al., 1999; Naruishi und Nagata, 2018; Sawczenko et al., 2005). Darüber hinaus ist es ein bekannter diagnostischer Marker für Parodontitis und wird bei Patienten mit erhöhtem Alveolarknochenverlust und einer Überrepräsentation von parodontalen Pathogenen beobachtet (Isola et al., 2021; Ptasiewicz et al., 2022).

IL-8 ist ein proinflammatorisches Chemokin, welches für die Aktivierung und Migration von neutrophilen Granulozyten ins Gewebe verantwortlich ist (Hull et al., 2001). Es wird bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen im betroffenen Gewebe produziert, wie etwa Atherosklerose, Darmentzündungen und Parodontitis (Baggiolini und Clark-Lewis, 1992; Boisvert et al., 2000; Finoti et al., 2017; Keshavarzian et al., 1999). Daher dient es als Biomarker für die Diagnose von Parodontitis (Arroyo et al., 2023).

IL-6 und IL-8 sind wichtige Regulatoren der Parodontitis (Dongari-Bagtzoglou und Ebersole, 1998). Angesichts möglicher NIPP-Therapien für orale Defekte und Erkrankungen wäre es interessant zu untersuchen, inwieweit NIPP die Expression und Aktivität anderer Marker wie IL-1 β oder TNF- α in PDL-Zellen beeinflusst. Dies wird Gegenstand zukünftiger Studien sein.

4.3 *Fusobacterium nucleatum* und *In vitro*-Modell der Infektion

Um *in vitro* ein experimentelles Modell einer azellulären Entzündungsreaktion auszulösen, verwendeten wir ein Lysat des *F.n.* Als ein wichtiges Bakterium fungiert *F.n.* bei der Verbindung zwischen frühen und späten Besiedlern des oralen Biofilms (Signat et al., 2011). Andere Studien haben gezeigt, dass die Stimulation mit *F.n.* *in vitro* zur Freisetzung von entzündungsfördernden Zytokinen führt (Rath-Deschner et al., 2022; Stähli et al.,

2022; Tateishi et al., 2012). Es gibt jedoch auch andere Bakterien, die verwendet werden können, um experimentell eine mikrobielle Infektion *in vitro* zu induzieren. Unter anderem haben Yumoto et al. gezeigt, dass *Eikenella corrodens* die Freisetzung von TNF- α , IL-6 und IL-8 fördert (Yumoto et al., 1999). Ähnliche Effekte wurden auch durch die Stimulation von Gingivafibroblasten mit *P.g.* beschrieben (Imatani et al., 2001). Wir haben uns jedoch auf die Vorstimulation mit *F.n.* konzentriert, um experimentell eine mikrobielle Infektion zu induzieren, da diese Studie unsere frühere Studie über Gingivafibroblasten ergänzen soll (Eggers et al., 2023).

Die Studie hat eine weitere Einschränkung. Es sollte beachtet werden, dass in unseren Experimenten ein inaktivierter *F.n.* Stamm verwendet wurde. Da nicht nur *F.n.*, sondern viele verschiedene Mikroorganismen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und dem Fortschreiten einer Parodontitis spielen, sollten diese auch in zukünftigen Studien berücksichtigt werden. Es ist auch zu beachten, dass in den Experimenten keine lebensfähigen Bakterien verwendet wurden. Es ist möglich, dass lebende Bakterien und sogar ganze Biofilme eine andere Wirkung auf Zellen haben.

Wir haben uns jedoch bewusst für *F.n.* als Mikroorganismus zur Induktion einer experimentellen mikrobiellen Infektion entschieden, da es ein wichtiges Brückenbakterium ist und dieses Entzündungsmodell bereits in früheren Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe etabliert wurde (Brennan und Garrett, 2019; Eggers et al., 2023; Rath-Deschner et al., 2022).

Darüber hinaus wurden in dieser Studie nur PDL-Zellen untersucht. Da die Parodontitis den gesamten Zahnhalteapparat betrifft und zum Abbau von Hartgewebe führt, sollten in zukünftigen Studien auch menschliche Osteoblasten einbezogen werden.

Außerdem wurde in dieser Studie nur eine einzige NIPP-Applikationszeit von 30 s verwendet. Es ist möglich, dass längere Zeiten eine stärkere antimikrobielle Wirkung haben. Obwohl frühere Erkenntnisse darauf hindeuten, dass eine NIPP-Therapie von 30 s einen positiven Effekt auf wachstumsregulierende Prozesse in PDL-Zellen hatte, sollten längere Anwendungszeiten in zukünftigen Studien weiter untersucht werden (Kleineidam et al., 2019).

4.4 Wirkung des nicht-invasiven physikalischen Plasmas

Die Ergebnisse und Daten dieser Studie legen nahe, dass eine Behandlung mit NIPP, in dem untersuchten Zeitraum, keine schädlichen Auswirkungen auf PDL-Zellen hat. Nach der NIPP-Exposition zeigen die Zellen keine morphologischen Veränderungen, die auf zytotoxische Effekte hinweisen könnten. Im Gegenteil, die NIPP-Behandlung scheint eine entzündungshemmende Reaktion der Zellen zu fördern.

Bei einer durch *F. n.* Lysat simulierten mikrobiellen Infektion der PDL-Zellen führt die NIPP-Behandlung zu einer signifikanten Reduktion der proinflammatorischen IL-6- und IL-8-Signale auf Proteinebene. Diese Beobachtungen bestätigen und erweitern die Ergebnisse früherer ähnlicher Studien an menschlichen Gingivazellen (Eggers et al., 2023). Die vorliegende Studie zeigt, dass NIPP auch den Auswirkungen der experimentell durch *F.n.* induzierten mikrobiellen Infektion in PDL-Zellen entgegenwirken kann, was durch eine Reduktion der beiden untersuchten Zytokine auf mRNA- und Proteinebene nach der Behandlung belegt wird. Dies stimmt mit den Ergebnissen unserer vorherigen Studie an Gingivafibroblasten überein (Eggers et al., 2023). Andere Forscher haben ähnliche Wirkungen in fibroblastenähnlichen Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis festgestellt, wobei NIPP eine Reduktion von Entzündungsfaktoren wie NF- κ B und IL-6 bewirkte (Famarzi et al., 2022). Auch bei diabetischen Wunden zeigte sich, dass NIPP die Entzündung reduziert und die Wundheilung verbessert (He et al., 2020).

Im Gegensatz zu dieser Aussage stehen die Ergebnisse einer anderen Studie. Diese Studie hat gezeigt, dass NIPP die Induktion von IL-6 und IL-8 in Hautkrebszellen fördert (Clemen et al., 2020). Es ist jedoch erwiesen, dass NIPP unterschiedliche Effekte auf gesunde und bösartige Zellen aufweist, welche die Zellvitalität betreffen. Während NIPP die Stoffwechselaktivität, Migration und Proliferation in gutartigen Zellen steigert, induziert es Apoptose in bösartigen Zellen und führt demnach zu gegenteiligen Effekten (Almeida-Ferreira et al., 2022; Hasse et al., 2016; Karki et al., 2017; Liu et al., 2017). Es scheint, dass Hautkrebszellen und gutartige Gingivazellen auch bezüglich der Sekretion von IL-6 und IL-8 unterschiedlich auf die NIPP-Therapie reagieren. Weitere Experimente sind jedoch erforderlich, um dies genauer zu eruieren.

Schließlich sollte eine klinische Studie durchgeführt werden, um zu ermitteln, ob die Ergebnisse dieser Studie für die Behandlung von Parodontitis relevant sind. Da jedoch einzelne klinische Studien in der Dermatologie darauf hindeuten, dass NIPP sowohl die Wundheilung fördert als auch eine antibakterielle Wirkung hat, erscheint es sinnvoll, es in der Parodontologie einzusetzen (Isbary et al., 2010; Stratmann et al., 2020). In diesem Zusammenhang hat eine frühere *In vitro*-Studie gezeigt, dass NIPP eine proliferative und antimikrobielle Wirkung auf PDL-Zellen auf mRNA-Ebene hat (Kleineidam et al., 2019). Eine einzelne klinische Studie hat auch gezeigt, dass eine NIPP-Behandlung während einer Parodontaltherapie die Rekolonisierung mit Parodontopathogenen reduziert.

Es sind jedoch weitere Studien erforderlich, um eine Wirkung in der klinischen Anwendung nachzuweisen. Auch sind andere Anwendungen von NIPP in der Parodontologie denkbar. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass NIPP in der Lage ist, bestimmte Flüssigkeiten zu aktivieren (Azzariti et al., 2019; Li et al., 2017). Diese Flüssigkeiten weisen dann ähnliche bioaktive Eigenschaften auf, wie das direkt wirkende NIPP. In diesem Zusammenhang könnten antibakterielle Mundspülungen hergestellt werden, die im Rahmen der Parodontaltherapie eingesetzt werden könnten.

Weitere klinische Studien sind erforderlich, um nachzuweisen, ob NIPP eine zukünftige therapeutische Option in der Parodontaltherapie darstellt.

5. Zusammenfassung

Mikrobielle Infektionen sind die zentrale Ursache parodontaler Erkrankungen. Parodontitis ist hauptsächlich eine Reaktion auf eine bakterielle Besiedlung, bei der das *Fusobacterium nucleatum* eine Schlüsselrolle einnimmt. Nicht-invasives physikalisches Plasma, ein hochreaktives Gas, kann proliferative, antiinflammatorische, sowie antimikrobielle Effekte auf Zellen und Gewebe ausüben. Aus bereits publizierten Studien unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass nicht-invasives physikalisches Plasma in oralen Zellen wie Gingivafibroblasten und Zementoblasten eine proliferationsfördernde und entzündungshemmende Wirkung hat und die Wundheilung fördert.

Ziel der Untersuchung war es daher, den antiinflammatorischen Effekt von nicht-invasivem physikalischem Plasma auf parodontale Ligament-Zellen im Rahmen einer mikrobiellen Infektion *in vitro* zu untersuchen.

Um eine mikrobielle Infektion zu simulieren, wurden parodontale Ligament-Zellen mit Zelllysat von *Fusobacterium nucleatum* präinkubiert und anschließend mit nicht-invasivem physikalischem Plasma für 30 Sekunden behandelt. Die regulatorischen Effekte der Kaltplasmabehandlung auf die Zellen wurden über die wichtigen Entzündungsmarker Interleukin-6 und Interleukin-8 auf Boten Ribonukleinsäure- und Proteinebene untersucht. Dabei kamen real-time polymerase chain reactions, immunzytochemische Färbungen und enzyme-linked immunosorbent assays zum Einsatz. Mittels Immunfluoreszenzfärbungen wurde die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch die Plasmabehandlung visualisiert.

Die alleinige Applikation von nicht-invasivem physikalischem Plasma führte zu keiner signifikanten Veränderung der Expressionsrate von Interleukin-6 und Interleukin-8 auf Gen- und Proteinebene. Im Vergleich zwischen einer mit *Fusobacterium nucleatum* stimulierten Gruppe und einer zusätzlich mit nicht-invasivem physikalischem Plasma behandelten Kombinationsgruppe, lässt sich besonders auf Proteinebene eine deutliche Hemmung der Interleukin-6 und Interleukin-8 Expression erkennen. Die Expression von Interleukin-6 auf Proteinebene konnte durch die zusätzliche Behandlung mit nicht-invasivem physikalischem Plasma im Vergleich zu der mit *Fusobacterium nucleatum* stimulierten Gruppe um ein Drittel gesenkt werden. Im Vergleich dazu konnte die

Expression von Interleukin-8 auf Proteinebene durch die zusätzliche Behandlung mit nicht-invasivem physikalischem Plasma im Vergleich zu der mit *Fusobacterium nucleatum* stimulierten Gruppe auf über die Hälfte des ursprünglichen Werts gesenkt werden.

Die Stimulation der Zellen mit einer aufsteigenden Konzentration an *Fusobacterium nucleatum* führte zu einer dosisabhängigen Expression von Interleukin-8, sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene. Die Expression von Interleukin-6 zeigte nur auf Proteinebene eine Dosisabhängigkeit. Durch die 4',6-Diamidin-2phenylindol Phalloidin Färbung wurden keine visuellen Unterschiede im Untersuchungszeitraum sichtbar, jedoch konnte durch die CellROX Färbung der Nachweis erbracht werden, dass eine Plasmabehandlung vermehrt reaktive Sauerstoffspezies hervorruft.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass nicht-invasives physikalisches Plasma einen antimikrobiellen Effekt auf humane parodontale Ligamentzellen im Zuge einer parodontalen Infektion haben könnte. Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, dass die Behandlung mit nicht-invasivem physikalischem Plasma zu einer Herunterregulierung der experimentell induzierten Entzündung in parodontalen Ligament-Zellen führen kann. Die Behandlung mit nicht-invasivem physikalischem Plasma scheint eine entzündungshemmende Reaktion der Zellen zu fördern. Darüber hinaus zeigen die parodontalen Ligament-Zellen nach der Exposition mit nicht-invasivem physikalischem Plasma keine morphologischen Veränderungen, die auf zytotoxische Effekte hinweisen. Besonders hervorzuheben ist, dass die Proteinmenge von Interleukin-6 und Interleukin-8 in der Kombinationsgruppe signifikant reduziert wurde. Zudem wird durch eine Behandlung mit nicht-invasivem physikalischem Plasma die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in parodontalen Ligament-Zellen gefördert, was Hinweise auf den antimikrobiellen Mechanismen geben könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegende Studie lediglich einen kleinen Einblick in die hochkomplexe Wirkungsweise einer Therapie mit nicht-invasivem physikalischem Plasma mit den bereits unter „Diskussion“ beschriebenen Limitationen und Einschränkungen liefert.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Aggregatzustände.	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung der DBE (plasma ONE).	13
Abbildung 3: Eingeschaltete Plasmasonde mit fadenförmigen Mikroentladungen.	14
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Parodonts.	17
Abbildung 5: Fibroblasten-Layer unter dem Lichtmikroskop in einer Petrischale.	18
Abbildung 6: Fibroblast im zellulären intrinsischen Faserzement.	19
Abbildung 7: Gefrierbruchpräparat eines supragingivalen Biofilms.	23
Abbildung 8: DBE Gerät plasma ONE der Firma plasma MEDICAL SYSTEMS GmbH.	39
Abbildung 9: Plasma ONE mit Patientensonde und Instrumentensonde PS 30 (dental)	40
Abbildung 10: Großaufnahme der Instrumentensonde PS 30.	41
Abbildung 11: Sonde PS 30 im Bohrständler unter Versuchsbedingungen.	42
Abbildung 12: NanoDrop 2000 der Firma Thermo Fisher Scientific, Dreieich.	45
Abbildung 13: MyCycler™ Thermal Cycler der Firma Bio-Rad, München.	46
Abbildung 14: Spektralphotometer Epoch der Firma BioTek, Winooski, USA.	49
Abbildung 15: ZOE™ Fluorescent Cell Imaging der Firma Bio-Rad, München.	50
Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung der ROS-Produktion in PDL-Zellen.	53
Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung von PDL-Zellen.	54
Abbildung 18: IL-6- und IL-8-Spiegel nach Inkubation mit <i>F.n.</i> in PDL-Zellen.	56
Abbildung 19: IL-6-Spiegel nach <i>F.n.</i> -Inkubation und NIPP-Behandlung in PDL-Zellen.	57
Abbildung 20: IL-8-Spiegel nach <i>F.n.</i> -Inkubation und NIPP-Behandlung in PDL-Zellen.	58

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.	28
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien, Plastikartikel und Glaswaren.	30
Tabelle 3: Chemikalien.	31
Tabelle 4: Medium, Puffer und Lösungen.	32
Tabelle 5: Kits.	34
Tabelle 6: Antikörper.	35
Tabelle 7: Antikörper Immunfluoreszenz.	35
Tabelle 8: Oligonukleotide der QuantiTect Primer Assays.	36
Tabelle 9: Versuchsaufbau mit aufsteigender Bakterienkonzentration.	43
Tabelle 10: Versuchsaufbau mit einer Bakterienkonzentration.	43
Tabelle 11: Ansatz Master-Mix für cDNA-Synthese.	45
Tabelle 12: MyCycler-Protokoll für cDNA-Synthese.	46
Tabelle 13: Ansatz Master-Mix für PCR-Analyse.	47
Tabelle 14: Software und Online-Tools.	51

8. Literaturverzeichnis

d'Agostino R, Favia P, Oehr C, Wertheimer MR. Low-Temperature Plasma Processing of Materials: Past, Present, and Future. *Plasma Processes and Polymers* 2005; 2: 7–15

Aleinik A, Baikov A, Dambaev G, Semichev E, Bushlanov P. Liver Hemostasis by Using Cold Plasma. *Surg Innov* 2017; 24: 253–258

Almeida-Ferreira C, Silva-Teixeira R, Gonçalves AC, Marto CM, Sarmento-Ribeiro AB, Caramelo F, Botelho MF, Laranjo M. Cold Atmospheric Plasma Apoptotic and Oxidative Effects on MCF7 and HCC1806 Human Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 1698

Arroyo E, Oliveira-Alves MG, Chamorro-Petronacci CM, Marichalar-Mendia X, Bravo-López SB, Blanco-Carrión J, Pérez-Sayáns M. Protein-based salivary biomarkers for the diagnosis of periodontal diseases: Systematic review and meta-analysis. *J Taibah Univ Med Sci* 2023; 18: 737–747

Arweiler NB, Ausschill TM, Sculean A. Patient self-care of periodontal pocket infections. *Periodontol 2000* 2018; 76: 164–179

Asokan S, Bandapalli OR. CXCL8 Signaling in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 2021; 1302: 25–39

Azzariti A, Iacobazzi RM, Di Fonte R, Porcelli L, Gristina R, Favia P, Fracassi F, Trizio F, Silvestris N, Guida G, Tommasi S, Sardella E. Plasma-activated medium triggers cell death and the presentation of immune activating danger signals in melanoma and pancreatic cancer cells. *Sci Rep* 2019; 9: 4099

Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 1992; 307: 97–101

Bagheri M, von Kohout M, Zoric A, Fuchs PC, Schiefer JL, Opländer C. Can Cold Atmospheric Plasma Be Used for Infection Control in Burns? A Preclinical Evaluation. *Biomedicines* 2023; 11: 1239

Belibasakis GN, Belstrøm D, Eick S, Gursøy UK, Johansson A, Könönen E. Periodontal

microbiology and microbial etiology of periodontal diseases: Historical concepts and contemporary perspectives. *Periodontol* 2000 2023

Belibasakis GN und Bostanci N, Orales Mikrobiom, Biofilm und orales Milieu. In: Gruber R, Stadlinger B, Terheyden H, Hrsg. *Kommunikation der Zellen*. Berlin: Quintessenz Verlag, 2022: 219-228

Boisvert WA, Curnss LK, Terkeltaub RA. Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in atherosclerosis. *Immunol Res* 2000; 21: 129–137

Boniakowski AE, Kimball AS, Jacobs BN, Kunkel SL, Gallagher KA. Macrophage-Mediated Inflammation in Normal and Diabetic Wound Healing. *J Immunol* 2017; 199: 17–24

Boulanger MJ, Chow D, Brevnova EE, Garcia KC. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* 2003; 300: 2101–2104

Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C. Role of *Fusobacterium nucleatum* and Coaggregation in Anaerobe Survival in Planktonic and Biofilm Oral Microbial Communities during Aeration. *Infect Immun* 1998; 66: 4729–4732

Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol* 2005; 7: 122–133

Brennan CA, Garrett WS. *Fusobacterium nucleatum* — symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nat Rev Microbiol* 2019; 17: 156–166

Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti MS. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol* 2018; 45: 1–8

Christoph A. Ramseier CA, 2019: Parodontitis. <https://www.parodont.ch/parodontitis/> (Zugriffsdatum: 24.06.2025)

Clark RA. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci* 1993; 306: 42–48

Clemen R, Heirman P, Lin A, Bogaerts A, Bekeschus S. Physical Plasma-Treated Skin Cancer Cells Amplify Tumor Cytotoxicity of Human Natural Killer (NK) Cells. *Cancers - Basel* 2020; 12: 3575

Cooper M, Fridman G, Staack D, Gutsol AF, Vasilets VN, Anandan S, Cho YI, Fridman A, Tsapin A. Decontamination of Surfaces From Extremophile Organisms Using Nonthermal Atmospheric-Pressure Plasmas. *Plasma Science, IEEE Transactions on* 2009; 37: 866–871

Cortellini P, Stalpers G, Mollo A, Tonetti MS. Periodontal regeneration versus extraction and dental implant or prosthetic replacement of teeth severely compromised by attachment loss to the apex: A randomized controlled clinical trial reporting 10-year outcomes, survival analysis and mean cumulative cost of recurrence. *J Clin Periodontol* 2020; 47: 768–776

Daeschlein G, Scholz S, Ahmed R, Majumdar A, von Woedtke T, Haase H, M. Niggemeier M, Kindel E, Brandenburg R, Weltmann KD, Jünger M. Cold plasma is well-tolerated and does not disturb skin barrier or reduce skin moisture. *J Dtsch Dermatol Ges* 2012; 10: 509–515

Daeschlein G, von Woedtke T, Kindel E, Brandenburg R, Weltmann KD, Jünger M. Antibacterial Activity of an Atmospheric Pressure Plasma Jet Against Relevant Wound Pathogens in vitro on a Simulated Wound Environment. *Plasma Processes and Polymers* 2010; 7: 224–230

Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1988; 81: 672–676

Dannewitz B, Holtfreter B, Eickholz P. Parodontitis – Therapie einer Volkskrankheit. *Bundesgesundheitsbl* 2021; 64: 931–940

Degreef HJ. How to heal a wound fast. *Dermatol Clin* 1998; 16: 365–375

Diaz PI, Zilm PS, Rogers AH. *Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments.

Microbiology - Reading 2002; 148: 467–472

Dobrynin D, Fridman G, Friedman G, Fridman A. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New J Phys* 2009; 11: 115020

Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL. Increased presence of interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secreting fibroblast subpopulations in adult periodontitis. *J Periodontol* 1998; 69: 899–910

Eggers B, Stope MB, Marciniak J, Mustea A, Deschner J, Nokhbehshaim M, Kramer FJ. Modulation of Inflammatory Responses by a Non-Invasive Physical Plasma Jet during Gingival Wound Healing. *Cells* 2022a; 11: 2740

Eggers B, Stope MB, Marciniak J, Mustea A, Eick S, Deschner J, Nokhbehshaim M, Kramer FJ. Non-Invasive Physical Plasma Reduces the Inflammatory Response in Microbially Prestimulated Human Gingival Fibroblasts. *Int J Mol Sci* 2023; 24: 16156

Eggers B, Wagenheim A-M, Jung S, Kleinheinz J, Nokhbehshaim M, Kramer F-J, Sielker S. Effect of Cold Atmospheric Plasma (CAP) on Osteogenic Differentiation Potential of Human Osteoblasts. *Int J Mol Sci* 2022b; 23: 2503

Eggers B, Seher L, Marciniak J, Pauck T, Deschner J, Eick S, Stope MB, Kramer FJ, K uchler EC, Kirschneck C, Nokhbehshaim M, Beisel-Memmert S. Beneficial effects of non-invasive physical plasma on human periodontal ligament cells in vitro. *Front Med (Lausanne)* 2024; 11: 1443368

Ehlbeck J, Schnabel U, Polak M, Winter J, von Woedtke T, Brandenburg R, von dem Hagen T, Weltmann KD. Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *J Phys D: Appl Phys* 2010; 44: 013002

Eisenbeis J, Peisker H, Backes CS, Bur S, H olters S, Thewes N, Greiner M, Junker C, Schwarz EC, Hoth M, Junker K, Preissner KT, Jacobs K, Herrmann M, Bischoff M. The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* acts as a proliferation and migration repressing factor that alters the cell morphology of keratinocytes. *Int J Med Microbiol* 2017; 307: 116–125

Eliasson B, Kogelschatz U. Nonequilibrium volume plasma chemical processing. *IEEE*

Transactions on Plasma Science 1991; 19: 1063–1077

Fan Z, Tang P, Li C, Yang Q, Xu Y, Su C, Li L. *Fusobacterium nucleatum* and its associated systemic diseases: epidemiologic studies and possible mechanisms. *J Oral Microbiol* 2023; 15: 2145729

Famarzi F, Zafari P, Alimohammadi M, Golpour M, Ghaffari S, Rafiei A. Inhibitory Effects of Cold Atmospheric Plasma on Inflammation and Tumor-Like Feature of Fibroblast-Like Synoviocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis. *Inflammation* 2022; 45: 2433–2448

Finoti LS, Nepomuceno R, Pigossi SC, Corbi SC, Secolin R, Scarel-Caminaga RM. Association between interleukin-8 levels and chronic periodontal disease. *Medicine - Baltimore* 2017; 96: e6932

Fischer CP. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev* 2006; 12: 6–33

Garlet GP, Thoma DS, Fibroblasten. In: Gruber R, Stadlinger B, Terheyden H, Hrsg. *Kommunikation der Zellen*. Berlin: Quintessenz Verlag, 2022: 55-63

Gerling T, Weltmann KD. Einführung in Atmosphärendruck-Plasmaquellen für plasmamedizinische Anwendungen. In: Metelmann HR, von Woedtke T, Weltmann KD, Hrsg. *Plasmamedizin: Kaltplasma in der medizinischen Anwendung*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2016: 3–15

Gorynia S, Koban I, Matthes R, Welk A, Gorynia S, Hübner NO, Kocher T, Kramer A. In vitro efficacy of cold atmospheric pressure plasma on *S. sanguinis* biofilms in comparison of two test models. *GMS Hyg Infect Control* 2013; 8: Doc01

Gräber HG, Conrads G, Wilharm J, Lampert F. Role of interactions between integrins and extracellular matrix components in healthy epithelial tissue and establishment of a long junctional epithelium during periodontal wound healing: a review. *J Periodontol* 1999; 70: 1511–1522

Gstraunthaler G, Lindl T. Subkultivierung/ Passagieren. In: Gstraunthaler G, Lindl T, Hrsg. *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. Berlin,

Heidelberg: Springer, 2013, 113–119

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453: 314–321

Hägi TT, Laugisch O, Ivanovic A, Sculean A. Regenerative periodontal therapy. *Quintessence Int* 2014; 45: 185–192

Hajishengallis G. Immuno-microbial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and the host response. *Trends Immunol* 2014a; 35: 3–11

Hajishengallis G. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Mol Oral Microbiol* 2014b; 29: 248–257

Hajishengallis G, Lamont RJ. Dancing with the Stars: How Choreographed Bacterial Interactions Dictate Nososymbiocity and Give Rise to Keystone Pathogens, Accessory Pathogens, and Pathobionts. *Trends Microbiol* 2016; 24: 477–489

Hasse S, Duong Tran T, Hahn O, Kindler S, Metelmann HR, von Woedtke T, Masur K. Induction of proliferation of basal epidermal keratinocytes by cold atmospheric-pressure plasma. *Clin Exp Dermatol* 2016; 41: 202–209

He R, Li Q, Shen W, Wang T, Lu H, Lu J, Lu F, Luo M, Zhang J, Gao H, Wang D, Xing W, Jia W, Liu F. The efficacy and safety of cold atmospheric plasma as a novel therapy for diabetic wound in vitro and in vivo. *Int Wound J* 2020; 17: 851–863

Helmke A, Franck M, Wandke D, Viöl W. Tempo-spatially Resolved Ozone Characteristics During Single-electrode Dielectric Barrier Discharge (SE-DBD) Operation against Metal and Porcine Skin Surfaces. *PMED* 2014; 4

Helmke A, Grünig P, Fritz U-M, Wandke D, Emmert S, Petersen K, Viöl W. Low-temperature plasma--a prospective microbicidal tool. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2012; 7: 223–230

Helmke A, Hoffmeister D, Mertens N, Emmert S, Schuette J, Viöl W. The acidification of lipid film surfaces by non-thermal DBD at atmospheric pressure in air. *New Journal of*

Physics 2009; 11: 115025

Herrera D, Sanz M, Kepschull M, Jepsen S, Sculean A, Berglundh T, Papapanou P, Chapple I, Tonetti M. Treatment of stage IV periodontitis: The EFP S3 level clinical practice guideline. *J Clin Periodontol* 2022; 49 Suppl 24: 4–71

Hoffmann C, Berganza C, Zhang J. Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. *Med Gas Res* 2013; 3: 21

Hull J, Ackerman H, Isles K, Usen S, Pinder M, Thomson A, Kwiatkowski D. Unusual haplotypic structure of IL8, a susceptibility locus for a common respiratory virus. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 413–419

Hunt TK. The physiology of wound healing. *Ann Emerg Med* 1988; 17: 1265–1273

Imatani T, Kato T, Okuda K. Production of inflammatory cytokines by human gingival fibroblasts stimulated by cell-surface preparations of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 65–72

Isbary G, Morfill G, Schmidt HU, Georgi M, Ramrath K, Heinlin J, Karrer S, Landthaler M, Shimizu T, Steffes B, Bunk W, Monetti R, Zimmermann L, Pompl R, Stolz W. A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. *British Journal of Dermatology* 2010; 163: 78–82

Isbary G, Shimizu T, Li YF, Stolz W, Thomas HM, Morfill GE, Zimmermann JL. Cold atmospheric plasma devices for medical issues. *Expert Review of Medical Devices* 2013; 10: 367–377

Isola G, Lo Giudice A, Polizzi A, Alibrandi A, Murabito P, Indelicato F. Identification of the different salivary Interleukin-6 profiles in patients with periodontitis: A cross-sectional study. *Arch Oral Biol* 2021; 122: 104997

Jantschek DU, 2022: Zelluläre und molekulare Effekte nicht-invasiven physikalischen Plasmas auf hormonell regulierte Karzinomzellen. <https://bonndoc.ulb.uni-bonn.de/xmlui/handle/20.500.11811/10340> (Zugriffsdatum: 24.06.2025)

Jepsen S, Caton JG, Albandar JM, Bissada NF, Bouchard P, Cortellini P, Demirel K, de Sanctis M, Ercoli C, Fan J, Geurrs NC, Hughes FJ, Jin L, Kantarci A, Lalla E, Madianos PN, Matthews D, McGuire MK, Mills MP, Preshaw PM, Reynolds MA, Sculean A, Susin C, West NX, Yamazaki K. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol* 2018; 89 Suppl 1: 237–248

Jin LJ, Armitage GC, Klinge B, Lang NP, Tonetti M, Williams RC. Global oral health inequalities: task group--periodontal disease. *Adv Dent Res* 2011; 23: 221–226

Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 2005; 175: 3463–3468

Jordan RA, Bodechtel C, Hertrampf K, Hoffmann T, Kocher T, Nitschke I, Schiffner U, Stark H, Zimmer S, Micheelis W. The Fifth German Oral Health Study (Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie, DMS V) - rationale, design, and methods. *BMC Oral Health* 2014; 14: 161.

Joshi SG, Paff M, Friedman G, Fridman G, Fridman A, Brooks AD. Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic form and biofilms: a biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma. *Am J Infect Control* 2010; 38: 293–301

Jungbauer G, Favaro L, Müller S, Sculean A, Eick S. The In-Vitro Activity of a Cold Atmospheric Plasma Device Utilizing Ambient Air against Bacteria and Biofilms Associated with Periodontal or Peri-Implant Diseases. *Antibiotics - Basel* 2022; 11: 752

Jungbauer G, Moser D, Müller S, Pfister W, Sculean A, Eick S. The Antimicrobial Effect of Cold Atmospheric Plasma against Dental Pathogens—A Systematic Review of In-Vitro Studies. *Antibiotics - Basel* 2021; 10: 211

Kalghatgi S, Fridman A, Azizkhan-Clifford J, Friedman G. DNA Damage in Mammalian Cells by Non-thermal Atmospheric Pressure Microsecond Pulsed Dielectric Barrier Discharge Plasma is not Mediated by Ozone. *Plasma Processes and Polymers* 2012; 9: 726–732

Kalghatgi S, Friedman G, Fridman A, Clyne AM. Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release. *Ann Biomed Eng* 2010; 38: 748–757

Kang S, Narazaki M, Metwally H, Kishimoto T. Historical overview of the interleukin-6 family cytokine. *J Exp Med* 2020; 217: e20190347

Karki SB, Yildirim-Ayan E, Eisenmann KM, Ayan H. Miniature Dielectric Barrier Discharge Nonthermal Plasma Induces Apoptosis in Lung Cancer Cells and Inhibits Cell Migration. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 8058307

Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, Murray CJL, Marcenes W. Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J Dent Res* 2017; 96: 380–387

Keshavarzian A, Fusunyan RD, Jacyno M, Winship D, MacDermott RP, Sanderson IR. Increased interleukin-8 (IL-8) in rectal dialysate from patients with ulcerative colitis: evidence for a biological role for IL-8 in inflammation of the colon. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 704–712

Kilian M, Chapple ILC, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AML, Tonetti MS, Wade WG, Zaura E. The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J* 2016; 221: 657–666

Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther* 2006; 8 Suppl 2: S2

Kleineidam B, Nokhbehshaim M, Deschner J, Wahl G. Effect of cold plasma on periodontal wound healing-an in vitro study. *Clin Oral Investig* 2019; 23: 1941–1950

Kogelschatz U. Filamentary, Patterned, and Diffuse Barrier Discharges. *Plasma Science, IEEE Transactions on* 2002; 30: 1400–1408

Kondo T, Ohshima T. The dynamics of inflammatory cytokines in the healing process of

mouse skin wound: a preliminary study for possible wound age determination. *Int J Legal Med* 1996; 108: 231–236

Krishnan B, Prasad GA, Madhan B, Saravanan R, Mote NP, Akilesh R. Post-extraction bleeding complications in patients on uninterrupted dual antiplatelet therapy-a prospective study. *Clin Oral Investig* 2021; 25: 507–514

Kumbargere Nagraj S, Prashanti E, Aggarwal H, Lingappa A, Muthu MS, Kiran Kumar Krishanappa S, Hassan H. Interventions for treating post-extraction bleeding. *Cochrane Database Syst Rev* 2018; 3: CD011930

Kusakci-Seker B, Demirayak-Akdemir M. The effect of non-thermal atmospheric pressure plasma application on wound healing after gingivectomy. *Int Wound J* 2020; 17: 1376–1383

Lang NP, Schätzle MA, Loe H. Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2009; 36 Suppl 10: 3–8

Langer A, Connors JM. Assessing and Reversing the Effect of Direct Oral Anticoagulants on Coagulation. *Anesthesiology* 2020; 133: 223–232

Langmuir I. Oscillations in Ionized Gases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1928; 14: 627–637

Larsson DGJ, Flach C-F. Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol* 2022; 20: 257–269

Lee JH, Jeong WS, Seo SJ, Kim HW, Kim KN, Choi EH, Kim KW. Non-thermal atmospheric pressure plasma functionalized dental implant for enhancement of bacterial resistance and osseointegration. *Dent Mater* 2017; 33: 257–270

Lendeckel D, Eymann C, Emicke P, Daeschlein G, Darm K, O’Neil S, Beule A, von Woedtke T, Völker U, Weltmann KD, Jünger M, Hosemann W, Scharf C. Proteomic Changes of Tissue-Tolerable Plasma Treated Airway Epithelial Cells and Their Relation to Wound Healing. *BioMed Research International* 2015; 2015: 1–17

Li Y, Pan J, Ye G, Zhang Q, Wang J, Zhang J, Fang J. In vitro studies of the antimicrobial

effect of non-thermal plasma-activated water as a novel mouthwash. *Eur J Oral Sci* 2017; 125: 463–470

Linker-Israeli M, Wallace DJ, Prehn J, Michael D, Honda M, Taylor KD, Paul-Labrador M, Fischel-Ghodsian N, Fraser PA, Klinenberg JR. Association of IL-6 gene alleles with systemic lupus erythematosus (SLE) and with elevated IL-6 expression. *Genes Immun* 1999; 1: 45–52

Liu J-R, Xu G-M, Shi X-M, Zhang G-J. Low temperature plasma promoting fibroblast proliferation by activating the NF- κ B pathway and increasing cyclinD1 expression. *Sci Rep* 2017; 7: 11698

Marchesan JT, Scanlon CS, Soehren S, Matsuo M, Kapila YL. Implications of cultured periodontal ligament cells for the clinical and experimental setting: a review. *Arch Oral Biol* 2011; 56: 933–943

Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, Leroux MA. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med* 2012; 1: 142–149

Metelmann HR, von Woedtke T, Weltmann KD. *Plasmamedizin: Kaltplasma in der medizinischen Anwendung*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2016

Mira A, Simon-Soro A, Curtis MA. Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. *J Clin Periodontol* 2017; 44 Suppl 18: S23–38

Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M, Yahia LH. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Int J Pharm* 2001; 226: 1–21

Mombelli A. Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. *Periodontol 2000* 2018; 76: 85–96

Moreau M, Orange N, Feuilloley MGJ. Non-thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination. *Biotechnology Advances* 2008; 26: 610–617

Mott-Smith HM. History of „plasmas“. *Nature* 1971; 233: 219

Napp M, von Podewils S, Klare I, Haase H, Kasch R, Gümbel D, Ekkernkamp A, Jünger M, Daeschlein G. Does antibiotic resistance impair plasma susceptibility of multi-drug resistant clinical isolates of enterococci in vitro? *Gut Pathog* 2016; 8: 41

Naruishi K, Nagata T. Biological effects of interleukin-6 on Gingival Fibroblasts: Cytokine regulation in periodontitis. *J Cell Physiol* 2018; 233: 6393–6400

Nieuwenhuyzen-de Boer GM, Hoffhuis W, Reesink-Peters N, Willemsen S, Boere IA, Schoots IG, Piek JM, Hofman LN, Beltman JJ, van Driel WJ, Werner HMJ, Baalbergen A, van Haaften-de Jong AMLD, Dorman M, Haans L, Nedelcu I, Ewing-Graham PC, van Beekhuizen HJ. Adjuvant Use of PlasmaJet Device During Cytoreductive Surgery for Advanced-Stage Ovarian Cancer: Results of the PlaComOv-study, a Randomized Controlled Trial in The Netherlands. *Ann Surg Oncol* 2022; 29: 4833–4843

Noh MK, Jung M, Kim SH, Lee SR, Park KH, Kim DH, Kim HH, Park YG. Assessment of IL-6, IL-8 and TNF- α levels in the gingival tissue of patients with periodontitis. *Exp Ther Med* 2013; 6: 847–851

Nokhbehshaim M, Nogueira AVB, Damanaki A, Dalagiorgou G, Eick S, Adamopoulos C, Piperi C, Basdra EK, Papavassiliou AG, Deschner J. Regulation of matrix metalloproteinase-1 by Filifactor alocis in human gingival and monocytic cells. *Clin Oral Investig* 2020a; 24: 1987–1995

Nokhbehshaim M, Nogueira AVB, Nietzsche S, Eick S, Deschner J. Regulation of Cyclooxygenase 2 by Filifactor alocis in Fibroblastic and Monocytic Cells. *Mediators Inflamm* 2020b; 2020: 4185273

Nomura Y, Takamatsu T, Kawano H, Miyahara H, Okino A, Yoshida M, Azuma T. Investigation of blood coagulation effect of nonthermal multigas plasma jet in vitro and in vivo. *J Surg Res* 2017; 219: 302–309

Oehmigen K, Hähnel M, Brandenburg R, Wilke Ch, von Woedtke T, Weltmann KD. The Role of Acidification for Antimicrobial Activity of Atmospheric Pressure Plasma in Liquids. *Plasma Processes and Polymers* 2010; 7: 250–257

Ogawa T, Uchida H. Differential induction of IL-1 beta and IL-6 production by the nontoxic lipid A from *Porphyromonas gingivalis* in comparison with synthetic *Escherichia coli* lipid A in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996; 14: 1–13

Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000* 1997; 14: 216–248

Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, Flemming TF, Garcia R, Giannobile WV, Graziani F, Greenweel H, Herrera D, Kao RT, Kerschull M, Kinane DF, Kirkwood KL, Kocher T, Kornman KS, Kumar PS, Loos BG, Machtei E, Meng H, Mombelli A, Needleman I, Offenbacher S, Seymour GJ, Teles R, Tonetti MS. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology* 2018; 89: S173–182

Pekbağrıyanık T, Dadas FK, Enhoş Ş. Effects of non-thermal atmospheric pressure plasma on palatal wound healing of free gingival grafts: a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Investig* 2021; 25: 6269–6278

Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BioSpektrum* 2004; 10: 92–95

Pietsch G j. Peculiarities of Dielectric Barrier Discharges. *Contributions to Plasma Physics* 2001; 41: 620–628

Poppo Deus F, Ouanounou A. Chlorhexidine in Dentistry: Pharmacology, Uses, and Adverse Effects. *Int Dent J* 2022; 72: 269–277

Preissner S, Kastner I, Schütte E, Hartwig S, Schmidt-Westhausen AM, Paris S, Preissner R, Hertel M. Adjuvant antifungal therapy using tissue tolerable plasma on oral mucosa and removable dentures in oral candidiasis patients: a randomised double-blinded split-mouth pilot study. *Mycoses* 2016; 59: 467–475

Ptasiewicz M, Bębnowska D, Małkowska P, Sierawska O, Poniewierska-Baran A, Hryniewicz R, Niedzwiedka-Rystwej P, Grywalska E, Chalas R. Immunoglobulin Disorders and the Oral Cavity: A Narrative Review. *J Clin Med* 2022; 11: 4873

Ramasastri SS. Acute wounds. *Clin Plast Surg* 2005; 32: 195–208

Raszewski Z, Nowakowska D, Więckiewicz W, Nowakowska-Toporowska A. The Effect of Chlorhexidine Disinfectant Gels with Anti-Discoloration Systems on Color and Mechanical Properties of PMMA Resin for Dental Applications. *Polymers - Basel* 2021; 13: 1800

Rath-Deschner B, Nogueira AVB, Beisel-Memmert S, Nokhbehaim M, Eick S, Cirelli JA, Deschner J, Jäger A, Damanaki A. Interaction of periodontitis and orthodontic tooth movement-an in vitro and in vivo study. *Clin Oral Investig* 2022; 26: 171–181

Rehman MU, Jawaid P, Uchiyama H, Kondo T. Comparison of free radicals formation induced by cold atmospheric plasma, ultrasound, and ionizing radiation. *Arch Biochem Biophys* 2016; 605: 19–25

Reuter S, von Woedtke T, Weltmann KD. The kINPen—a review on physics and chemistry of the atmospheric pressure plasma jet and its applications. *J Phys D: Appl Phys* 2018; 51: 233001

Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol* 2003; 11: 94–100

Rose-John S. Interleukin-6 signalling in health and disease. *F1000Res* 2020; 9: F1000 Faculty Rev-1013

Sanz M, Herrera D, Kerschull M, Chapple I, Jepsen S, Beglundh T, Sculean A, Tonetti MS. Treatment of stage I-III periodontitis-The EFP S3 level clinical practice guideline. *J Clin Periodontol* 2020; 47 Suppl 22: 4–60

Sawczenko A, Azooz O, Paraszczuk J, Idestrom M, Croft NM, Savage MO, Ballinger AB, Sanderson IR. Intestinal inflammation-induced growth retardation acts through IL-6 in rats

and depends on the -174 IL-6 G/C polymorphism in children. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 13260–13265

Scholtz V, Pazlarova J, Souskova H, Khun J, Julak J. Nonthermal plasma — A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnology Advances* 2015; 33: 1108–1119

Schroeder HE. *Orale Strukturbiologie*. Stuttgart-New York: Thieme; 2000.

Schultz G, Rotatori DS, Clark W. EGF and TGF- α in wound healing and repair. *J Cell Biochem* 1991; 45: 346–352

Shekhter AB, Serezhenkov VA, Rudenko TG, Pekshev AV, Vanin AF. Beneficial effect of gaseous nitric oxide on the healing of skin wounds. *Nitric Oxide* 2005; 12: 210–219

Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Curr Issues Mol Biol* 2011; 13: 25–36

Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee H-M, Golub LM, Brown DL, Mäntylä P. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med* 2006; 38: 306–321

Stähli A, Scherler C, Zappalà G, Sculean A, Eick S. In vitro activity of anti-rheumatic drugs on release of pro-inflammatory cytokines from oral cells in interaction with microorganisms. *Front Oral Health* 2022; 3: 960732

Stratmann B, Costea T-C, Nolte C, Hiller J, Schmidt J, Reindel J, Masur K, Motz W, Timm J, Kerner W, Tschöepe D. Effect of Cold Atmospheric Plasma Therapy vs Standard Therapy Placebo on Wound Healing in Patients With Diabetic Foot Ulcers: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Network Open* 2020; 3.

Suchentrunk R, Staudigl G, Jonke D, Fuessler HJ. Industrial applications for plasma processes—examples and trends. *Surface and Coatings Technology* 1997; 97: 1–9

Suschkewitsch CV, Opländer C. The application of cold atmospheric plasma in medicine: The potential role of nitric oxide in plasma-induced effects. *Clinical Plasma Medicine* 2016; 4: 1–8

Swift ME, Kleinman HK, DiPietro LA. Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab Invest* 1999; 79: 1479–1487

Takamiya M, Fujita S, Saigusa K, Aoki Y. Simultaneous detection of eight cytokines in human dermal wounds with a multiplex bead-based immunoassay for wound age estimation. *Int J Legal Med* 2008; 122: 143–148

Tateishi F, Hasegawa-Nakamura K, Nakamura T, Oogai Y, Komatsuzawa H, Kawamata K, Douchi T, Hatae M, Noguchi K. Detection of *Fusobacterium nucleatum* in chorionic tissues of high-risk pregnant women. *J Clin Periodontol* 2012; 39: 417–424

Tomokiyo A, Wada N, Maeda H. Periodontal Ligament Stem Cells: Regenerative Potency in Periodontium. *Stem Cells Dev* 2019; 28: 974–985

Tonetti MS, Jepsen S, Jin L, Otomo-Corgel J. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *J Clin Periodontol* 2017; 44: 456–462

Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000; 5: 40–46

Trindade D, Carvalho R, Machado V, Chambrone L, Mendes JJ, Botelho J. Prevalence of periodontitis in dentate people between 2011 and 2020: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *J Clin Periodontol* 2023; 50: 604–626

Vajenine GV. Use of plasma-activated gases in synthesis of solid-state nitrides. *Dalton Trans* 2010; 39: 6013–6017

Vatansever F, de Melo WCMA, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, Chandran R, Karimi M, Parizotto NA, Yin R, Tegos GP, Hamblin MR. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol Rev* 2013; 37: 955–989

Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* 2009; 37: 1528–1542

Wang Y, Hua Y. Generation of periodontal ligament stem cells from human iPSCs with a chemically defined condition. *Biol Futur* 2020; 71: 241–248

Weidinger A, Kozlov AV. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules* 2015; 5: 472–484

Weiss M, Gumbel D, Hanschmann E-M, Mandelkow R, Gelbrich N, Zimmermann U, Walther R, Ekkernkamp A, Sckell A, Kramer A, Burchardt M, Lillig CH, Stope MB. Cold Atmospheric Plasma Treatment Induces Anti-Proliferative Effects in Prostate Cancer Cells by Redox and Apoptotic Signaling Pathways. *PLoS One* 2015; 10: e0130350

Weltmann KD, Kindel E, von Woedtke T, Hähnel M, Stieber M, Brandenburg R. Atmospheric-pressure plasma sources: Prospective tools for plasma medicine. *Pure and Applied Chemistry* 2010; 82: 1223–1237

Weltmann KD, von Woedtke T. Plasma medicine—current state of research and medical application. *Plasma Phys Control Fusion* 2016; 59: 014031

von Woedtke T, Reuter S, Masur K, Weltmann KD. Plasmas for medicine. *Physics Reports* 2013; 530: 291–320

Yoon SY, Kim KH, Seol YJ, Kim SJ, Bae B, Huh SR, Kim GH. Effects of metastable species in helium and argon atmospheric pressure plasma jets (APPJs) on inactivation of periodontopathogenic bacteria. *Journal of Korean Physical Society* 2016; 68: 1176–1191

Yumoto H, Nakae H, Fujinaka K, Ebisu S, Matsuo T. Interleukin-6 (IL-6) and IL-8 Are Induced in Human Oral Epithelial Cells in Response to Exposure to Periodontopathic *Eikenella corrodens*. *Infect Immun* 1999; 67: 384–394

Zhao Y, Pu R, Qian Y, Shi J, Si M. Antimicrobial photodynamic therapy versus antibiotics as an adjunct in the treatment of periodontitis and peri-implantitis: A systematic review and meta-analysis. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2021; 34: 102231

Zimmermann JL, Shimizu T, Schmidt H-U, Li Y-F, Morfill GE, Isbary G. Test for bacterial resistance build-up against plasma treatment. *New J Phys* 2012; 14: 073037

Zitzmann NU, Ramseier CA, Weiger R, Walter C. Parodontitis. Swiss Medical Forum – Schweizerisches Medizin-Forum 2013; 13: 183-186

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik für Kieferorthopädie des Zentrums für Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde der Universität Bonn unter Betreuung von PD Dr. med. dent. Beisel-Memmert.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. rer. nat. Nokhbehaim und PD Dr. med. dent. Eggers.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch PD Dr. rer. nat. Nokhbehaim und PD Dr. med. dent. Eggers von mir eigenständig unter Aufsicht durchgeführt.

Das zur Auswertung verwendete Datenmaterial wurde eigenständig zusammengestellt. Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch PD Dr. med. dent. Beisel-Memmert durch mich.

Bei der konzeptionellen und gestalterischen Umsetzung der Abbildungen wurde ich maßgeblich von Frau Johanna Terres unterstützt.

Zur Verbesserung der Lesbarkeit sowie der sprachlichen Qualität des Manuskripts wurde die Arbeit von Frau Katharina Kremer hinsichtlich Rechtschreibung, Grammatik und Zeichensetzung sorgfältig überprüft.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

10. Veröffentlichungen

Teile der Inhalte der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Eggers B, Seher L, Marciniak J, Pauck T, Deschner J, Eick S, Stope MB, Kramer FJ, Küchler EC, Kirschneck C, Nokhbeh-saim M, Beisel-Memmert S. Beneficial effects of non-invasive physical plasma on human periodontal ligament cells in vitro. *Front Med (Lausanne)* 2024; 11: 1443368

<https://doi.org/10.3389/fmed.2024.1443368>

11. Danksagung

An vorrangiger Stelle gebührt mein Dank Frau PD Dr. med. dent. Beisel-Memmert. Neben der Betreuung der Arbeit war Sie stets für mich erreichbar und ich konnte mich zu jeder Zeit auf Sie verlassen. Danke Svenja!

Natürlich möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. med. dent. Eggers bedanken. Neben der Bereitstellung des Themas und der Betreuung der Arbeit war er die Person, welche mir mit großer Leidenschaft das interessante und zukunftssträchtige Forschungsgebiet der Plasmamedizin eröffnet hat. Danke Bene!

Die meisten Bilder und Abbildungen dieser Dissertation wären ohne das Talent und die Hilfe meiner Freundin Johanna Terres nicht denkbar gewesen, dafür vielen Dank Joey!

Wahrscheinliche hätte ich bereits aufgegeben diese Dissertation zu verfassen, wenn meine Eltern Kathrin und Jürgen Seher nicht immer an mich geglaubt hätten und mich stets motiviert hätten. Danke euch!

Auch meinen Chefs Dr. med dent Matscheck, Dr. med dent. Wernze und ZÄ Boldt möchte ich dafür danken, dass Sie mir es ermöglicht haben, mich jeden Mittwoch mit meiner Doktorarbeit zu befassen und mich von der Arbeit freigestellt haben. Danke euch drei!

Zu guter Letzt möchte ich mich selbstverständlich bei Frau PD Dr. rer. nat. Nokhbehaim bedanken, die mich bei der Arbeit fortwährend im Labor unterstützte und bevor ein mögliches Problem entstand, bereits eine Lösung parat hatte. Danke Marjan!

Danke euch allen für die fortwährende Unterstützung während des gesamten Erstellungsprozesses!