

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde,  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. M. Hannig

## **Über die Wirkung von theranovis® oral gegen Zahnstein**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde*  
**der Medizinischen Fakultät**  
**der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2017

vorgelegt von:  
Fanol Gashaj  
geb. am 28.04.1989 in Istog (Kosova)

Tag der Promotion:

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Hannig

2. Berichterstatter:

**Meinen Eltern  
in Liebe und Dankbarkeit  
gewidmet**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Deutsche Zusammenfassung.....	1
1.2 Abstract.....	2
<b>2 EINLEITUNG.....</b>	<b>4</b>
2.1 Zahnstein.....	4
2.2 theranovis® oral.....	4
2.3 Literaturübersicht.....	5
2.4 Ziel der Arbeit.....	7
<b>3 MATERIAL UND METHODE.....</b>	<b>8</b>
3.1 1. Versuchsreihe.....	8
3.1.1 Material.....	8
3.1.2 Durchführung.....	9
3.1.3 Auswertungsmethode.....	11
3.2 2. Versuchsreihe.....	14
3.2.1 Material.....	14
3.2.2 Durchführung.....	15
3.2.3 Auswertungsmethode.....	16
3.3 3. Versuchsreihe.....	17
3.3.1 Material.....	17
3.3.2 Durchführung.....	17
3.3.3 Auswertungsmethode.....	21
<b>4 ERGEBNISSE.....</b>	<b>22</b>
4.1 Ergebnisse des Scoring.....	22
4.1.1 Graphische Darstellung.....	22
4.1.2 Statistische Auswertung.....	25
4.2 Ergebnisse der Gewichtsmessung.....	26
4.3 REM-Bilder.....	27
4.4 TEM-Bilder.....	31
<b>5 DISKUSSION.....</b>	<b>36</b>
5.1 Diskussion der Zusammensetzung der Lösungen in der 1. Versuchsreihe.....	36
5.2 Diskussion der Durchführung der 1. Versuchsreihe.....	36
5.3 Diskussion der Dokumentation in der 1. Versuchsreihe.....	37
5.4 Diskussion des Scoring.....	37

## Inhaltsverzeichnis

5.5 Diskussion der statistische Auswertung.....	38
5.6 Diskussion der Gewichtsmessung.....	38
5.7 Diskussion der Ergebnisse.....	39
5.8 Zusammenfassende Bewertung.....	41
5.9 Schlussfolgerungen.....	42
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>43</b>
<b>7 DANKSAGUNG.....</b>	<b>47</b>
<b>8 ANHANG.....</b>	<b>48</b>
8.1 Inhaltsangabe von theranovis® oral.....	48
8.2 Herstellerbeschreibung von Proteinase K .....	49
8.3 Gebrauchsanweisung für den Protease Inhibitor (PI).....	51
8.4 Zusammensetzung der einzelnen Spray – Lösungen: Spray#1 bis Spray#5.....	53
8.5 Kopie des Protokolls der statistischen Auswertung.....	54
8.6 Graphische Darstellung der Gewichtsmessungen der 2. Versuchsreihe.....	56
8.7 REM-Bilder der 2. Versuchsreihe.....	59

## 1 Zusammenfassung

### 1.1 Deutsche Zusammenfassung

Zahnstein kommt sehr häufig vor und begünstigt parodontale Erkrankungen. Schon seit den 1950er Jahren gibt es zahlreiche Untersuchungen zu verschiedenen Stoffen, die auf unterschiedliche Weise gegen Zahnstein wirken sollen.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit befassen sich mit der Wirkung von theranovis® oral gegen Zahnstein. theranovis® oral ist ein Mundhygieneprodukt, dessen Wirkstoffe Kernöle und Extrakte aus Kräuterölen sind. Dieses Produkt wirbt unter anderem mit seiner Wirkung gegen Zahnstein. Das Ziel dieser Studie war es, die Wirkung von theranovis® oral gegen Zahnstein zu untersuchen, und, wenn vorhanden, die Wirkmechanismen darzustellen.

Zur Überprüfung der Wirkung von theranovis® oral und eventuell vorhandener biochemischer Mechanismen wurden die Wirkungen unterschiedlicher Lösungen mit zusätzlich jeweils theranovis® oral Gel auf 138 extrahierte, menschliche, mit Zahnstein behaftete Zähne über 12 Wochen untersucht. Die 138 Zähne wurden dabei in 6 Gruppen mit jeweils 6 unterschiedlichen Lösungen aufgeteilt, sodass es 23 Zähne pro Gruppe gab. Die Lösungen enthielten Leitungswasser oder steril filtrierten Speichel und eine ProteinaseLösung oder eine Proteaseinhibitorlösung. Alle Lösungen enthielten zusätzlich theranovis® oral Gel, bis auf eine, die Hauptreferenzgruppe. Diese enthielt nur Leitungswasser. Vor Beginn des Versuchs wurde die Ausgangssituation der einzelnen Zähne durch Fotodokumentation und Abformungen festgehalten. Die Einwirkung der Lösungen erfolgte im Inkubator bei 37°C. Die Lösungen wurden täglich ausgetauscht und dabei wurden die Zähne mechanisch mit einer Zahnbürste behandelt. Im Versuchsverlauf erfolgte wöchentlich eine Fotodokumentation, und alle 4 Wochen eine Volumendokumentation mit der Abformung. Nach Versuchsende erfolgte eine visuelle Auswertung der Dokumentationen. Hierzu wurde für jeden einzelnen Zahn das Zahnsteinvorkommen, das nach 12 Wochen Einwirkzeit noch vorhanden war, mit dem Zahnsteinvorkommen vor Versuchsbeginn verglichen. Der vorhandene Unterschied wurde dann mittels Scores 1 bis 5 bewertet. Die Scoreverteilung innerhalb der Gruppen wurde statistisch ausgewertet und miteinander verglichen.

Mit den weiteren zwei Versuchsreihen wurden vorhandene strukturelle Veränderungen des Zahnsteines durch die Wirkung von theranovis® oral mit Hilfe rasterelektronenmikroskopischen und transmissionselektronenmikroskopischen Analysen dargestellt. Zudem wurde mit der 2. Versuchsreihe die Wirkung von theranovis® oral gegen Zahnstein in Abhängigkeit von der Konzentrationen einzelner Inhaltsstoffe untersucht. Es gab 5 Lösungen, die sich in den

## Zusammenfassung

Konzentrationen der einzelnen Inhaltsstoffe von theranovis® oral unterschieden. Zudem gab es eine Vergleichsgruppe mit Leitungswasser. Diese Wirkung wurde neben der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung durch Gewichtsmessungen festgehalten.

Durch diese Studie konnten erstmals Erkenntnisse über die Wirkung von theranovis® oral gegen Zahnstein gewonnen werden. Es zeigte sich bei der hier gewählten Methode und dem hier verwendeten Scoring kein Unterschied innerhalb der Gruppen, sodass die Ergebnisse weder eine allgemeine Wirkung noch eine auf biochemischen Interaktionen basierende Wirkung gegen Zahnstein zeigen konnten. Die Gewichtsmessung der weiteren Versuchsreihe konnte ebenfalls keine derartige Wirkung darstellen. Die elektronenmikroskopische Analyse jedoch zeigte deutliche strukturelle Veränderungen des organischen Anteils des Zahnsteins. Durch die REM-Bilder konnte hierbei eine direkte Abhängigkeit dieser Wirkung von den Konzentrationen einzelner Inhaltsstoffe sichtbar gemacht werden. Diese erkennbaren strukturellen Veränderungen können in der Lage sein, den Zahnstein in seiner Stabilität zu schwächen, sowohl bestehenden Zahnstein, als auch sich bildenden Zahnstein. Zur Bestätigung dieser Befunde sind weitere methodisch auf die vorliegende Untersuchung aufbauende In – vitro – und In – vivo – Studien notwendig.

### **1.2 Abstract**

Dental calculus is very common. It favors periodontal disease. Already since the 1950s, there have been numerous investigations on various substances which might act in various ways against dental calculus.

The present investigations focus on the effect of theranovis® oral against dental calculus. theranovis® oral is an oral hygiene product which active ingredients are seed oils and extracts from herbs. This product advertises on its effect against dental calculus. The aim of this study was to investigate the effect of theranovis® oral against dental calculus, and, if available, to clarify the mechanisms of action.

For the effect of theranovis® oral on dental calculus and possibly existing biochemical mechanisms, the effects of different solutions with additional theranovis® oral gel on 138 extracted, human teeth with dental calculus were examined over 12 weeks. The 138 teeth were divided into 6 groups with 6 corresponding solutions, so that there were 23 teeth per group. The solutions contained tap water or sterile filtered saliva and proteinase or proteinase inhibitors. All solutions also contained theranovis® oral gel, except for one, the main reference group. These contained only tap water. Before starting the experiments, the initial situation of the

## Zusammenfassung

individual teeth was recorded by photodocumentation and impression taking. The effect of the six solutions was investigated in an incubator at 37° C. The solutions were exchanged daily and the teeth were mechanically treated with a toothbrush. In the course of the experiment, a photodocumentation was carried out every week, and a volume documentation with the impressions taken every 4 weeks. After 12 weeks, a visual evaluation was carried out. For this purpose, the tooth calculus, which was still present after 12 weeks of exposure time, was compared with the dental calculus before the beginning of the experiment. The existing difference was then assessed according to scores 1 to 5. The score distribution within the groups was statistically evaluated and compared with each other.

With the two other series of experiments, existing structural changes of the dental calculus were demonstrated by the effect of theranovis® oral by means of scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. In addition, the second series of tests examined the effect of theranovis® oral on the dental calculus as a function of the concentrations of individual ingredients. There were 5 solutions which differed in the concentrations of the individual ingredients. In addition, there was a comparison group with tap water. In addition to electron microscopy, this effect was determined by weight measurements.

This study was the first to provide insights into the effect of theranovis® oral against dental calculus. There was no difference within the groups in the method selected here and the scoring used here so that the results could neither show a general effect nor a biochemical interaction based effect on dental calculus. In addition such an effect could not be demonstrated by the weight measurement of the further test series. However, the electron microscopic analysis revealed significant structural changes in the organic content of the dental calculus. By SEM a direct dependence on this effect on the concentrations of the individual components of the solutions could be detected. These discernible structural changes might weaken the dental calculus in its stability, both existing dental calculus and developing dental calculus. In order to confirm this effect further in – vitro and in – vivo studies using additional methods are necessary.



## 2 Einleitung

### 2.1 Zahnstein

Zahnstein beeinflusst die Mundgesundheit in hohem Maße, da er maßgeblich an Parodontalerkrankungen beteiligt ist (Ainamo, 1970). Zahnstein beinhaltet organische und anorganische Bestandteile (Jin and Yip, 2002). Die anorganische Komponente besteht hauptsächlich aus Kalzium und Phosphat und, die organische Komponente beinhaltet Bakterien eingebettet in die interbakterielle Matrix (Theilade and Schroeder, 1966). Der anorganische Anteil macht 37% des Volumens aus (Friskopp and Isacsson, 1984).

Ob sich ein Salz auflöst oder umgekehrt, ob sich in einer Salzlösung Kristalle bilden, ist abhängig von den physikalischen und chemischen Rahmenbedingungen.

Der Speichel ist mit Kalzium und Phosphat übersättigt und bildet somit ein Mineraldepot (Larsen and Pearce, 2003). Speichelproteine und bakterielle Proteine beeinflussen die Kalzifikation der Bakterienansammlung an der Zahnoberfläche (ten Cate, 1996). Hierauf basiert auch der Grund, warum das Gleichgewicht zwischen Re- und Demineralisation in der Mundhöhle nicht überall gleich ist. Je nachdem, ob Proteine Einfluss nehmen können oder nicht, überwiegt die eine oder die andere Seite (Hannig et al., 2007). Die Tatsache, dass solche Rahmenbedingungen relevant sind, spiegelt sich unter anderem in der Lokalisation solcher Kalzifikationen wider. So kommt Zahnstein vermehrt im Bereich der oberen Molaren vestibulär und im Bereich der unteren Frontzähne lingual vor, als Korrelat der Ausführungsgänge der großen Speicheldrüsen (Parfitt, 1960). Isolierte Kristallbildungen im Speichel kommen hingegen nicht vor, bakterielle Plaque jedoch mineralisiert und es entsteht Zahnstein. Das Phänomen der Remineralisation von Initialläsionen gibt es ebenfalls. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren ergeben sich für Stoffe, die gegen Zahnstein wirken sollen, unterschiedliche Wirkungsstellen. Sie können die Zahnsteinkomponenten selbst verändern, entweder die anorganische oder die organische. Sie können den Zahnstein bzw. die Zahnsteinbildung auch indirekt über Beeinflussung von Proteinen angreifen. Oder sie können die Kristallbildung bzw. das Kristallwachstum selbst hemmen.

### 2.2 theranovis® oral

theranovis® oral ist ein auf dem Markt erhältliches Mundhygieneprodukt, das unter anderem für die Wirkung gegen Zahnstein angeboten wird. Es enthält hauptsächlich Naturprodukte in Form von Kernölen und Kräuterextrakten, die auch als ätherische Öle bezeichnet werden. Wissenschaftliche Erkenntnisse über die Wirkung von theranovis® oral gegen Zahnstein und

die zugrundeliegenden Mechanismen lagen bis jetzt noch nicht vor. Zudem sind Untersuchungen zu Stoffen, die zu der Stoffgruppe der Kernöle oder Kräuterextrakte zählen, bezüglich deren Wirkung gegen Zahnstein in der Literatur im Vergleich zu zum Beispiel Pyrophosphaten oder Zinksalzen nur verschwindend gering vertreten.

### **2.3 Literaturübersicht**

In der Literatur gibt es eine hohe Anzahl an wissenschaftlichen Studien, die sich mit Produkten beschäftigen, welche gegen Zahnstein wirken sollen. Richtet man bei diesen Studien das Augenmerk auf den Wirkmechanismus, dann sind in diesen Arbeiten hauptsächlich solche Produkte vertreten, welche die Kristallbildung hemmen. In den 1980er und 1990er Jahren wurden in zahlreichen Studien solche kristallbildungshemmenden Produkte untersucht. In diesen Studien wurden pyrophosphathaltige Produkte und Zinksalze bezüglich der hemmenden Wirkung auf Zahnstein untersucht. So zeigten Chikte et al. 1992, dass eine Zahnpasta mit löslichem Pyrophosphat zu einer um 20% größeren Reduktion der Zahnsteinbildung führt im Vergleich zur Kontrollgruppe (Chikte et al., 1992). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Stookey et al. (Stookey et al., 1995). White et al. zeigten ebenfalls in einer Studie die hemmende Wirkung auf Zahnstein für eine Zahnpasta, welche Hexametaphosphat enthielt (White et al., 2002).

Bezüglich Zinkzitat konnten Stephen et al. anhand einer Studie an der 3.000 Schüler teilnahmen, nachweisen, dass bei Verwendung einer 0,5 % Zinkzitat enthaltenden Zahnpasta das Zahnsteinvorkommen immer niedriger war als bei der Gruppe mit der Placebozahnpasta (Stephen et al., 1987). Ähnliche Ergebnisse wurden in weiteren Studien gezeigt, so von Segreto et al. (Segreto et al., 1991), Charles et al. (Charles et al., 2001) und Kazmierczak et al. (Kazmierczak et al., 1990).

Diese Stoffe, Pyrophosphate und Zinksalze, interagieren bei der Zahnsteinbildung auf der Ebene der Kristalle und deren Wachstum. Dies konnten für Zinkpräparate Davey et al. 1997 in einer Studie darstellen (Davey et al., 1997). White und Gerlach schilderten im Jahre 2000 hierzu die chemischen Grundlagen und den Mechanismus zu den Pyrophosphaten und deren zahnsteinhemmender Wirkung (White and Gerlach, 2000). Bei den meisten Untersuchungen von Pyrophosphaten und Zinksalzen wurde die Wirkung der Stoffe auf sich bildenden Zahnstein untersucht. Die Wirkung auf bereits vorhanden Zahnstein wurde in geringerem Umfang untersucht. Eine Studie hierzu von Barbakow und Imfeld zeigte, dass Antizahnsteinpasten mit Pyrophosphaten und Zinkzitraten bereits vorhandenen Zahnstein nicht beeinflussen

## Einleitung

(Barbakow and Imfeld, 1989). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung auf bestehenden Zahnstein untersucht.

Untersuchungen zum Zusammenhang von Kernölen und Kräuterextrakten, wie sie in theranovis® oral enthalten sind, und deren Wirkungen gegen Zahnstein sind nur vereinzelt vertreten. Im Jahre 1969 untersuchte Mukherjee Enzyme wie Papain und Ficin, die in Kernen von Papaya und Feigen vorkommen, auf die Wirkung gegen Zahnstein. Jedoch erfolgte die Untersuchung dieser Enzyme meist in Kombination mit anderen Stoffen wie Acetatpuffer und nicht in Zusammenspiel mit Speichel. Zudem wurden Effekte auf den organischen Anteil nicht untersucht. In dieser Studie von Mukherjee konnte gezeigt werden, dass Papain alleine mehr Phosphor aus Dentin als aus Zahnstein und Zahnschmelz löst. Ficin hingegen löst Zahnstein selektiver als Dentin und Zahnschmelz (Mukherjee, 1969). Hidaka et al. führte im Jahre 1993 Studien durch, in denen die hemmende Wirkung von Pflanzenextrakten aus der traditionellen chinesischen Medizin, auch Kampo genannt, auf die Zahnsteinbildung untersucht wurden. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass einige Kampostoffe die Bildung von Hydroxylapatit, und damit auch die Zahnsteinbildung hemmen (Hidaka et al., 1993a) In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass Kampostoffe scheinbar das Kristallwachstum hemmen und Kalzium aus der Lösung ziehen (Hidaka et al., 1993b). Hidaka et al. untersuchten zudem 2008 die Inhibition der Bildung von oralen Kalziumphosphatpräzipitaten durch Bienenharz mit dem pH drop Verfahren. Hierbei wurde gezeigt, dass 3 der 4 untersuchten Bienenharze, welche ätherische Öle beinhalten, einen gleich starken oder größeren hemmenden Effekt haben als 1-Hydroxyethyliden-1,1-bisphosphonat (Hidaka et al., 2008).

Zudem gibt es vereinzelt weitere Untersuchungen mit ätherischen Ölen, jedoch nur in Kombination mit den Pyrophosphaten oder Zinksalzen. Kohut et al. zeigten 1997 in einer Studie, dass eine Zahnpasta mit ätherischen Ölen und einer nur geringen Konzentration von 1,3 % Pyrophosphat eine Wirkung gegen Zahnstein zeigt (Kohut et al., 1997). LeGeros et al. stellten 2003 dar, dass eine Mundspüllösung mit ätherischen Ölen und Zinkchlorid einen antimikrobiellen Effekt hat und die Bildung von Dikalziumphosphatdihydrat, das löslichste Kalziumphosphat, begünstigt (LeGeros et al., 2003). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Santos et al. bei einer Untersuchung über eine Zahnpasta mit ätherischen Ölen und Zinkzitat (Santos et al., 2000). In diesen Studien von Kohut et al., LeGeros et al. und Santos et al. wurde die hemmende Wirkung der ätherischen Öle stets in Kombination mit Pyrophosphaten oder Zinksalzen untersucht und zudem die Wirkung auf die Bildung des Zahnsteins jedoch nicht die Wirkung auf bestehenden Zahnstein analysiert, wie es in der vorliegenden Studie der Fall ist.

## **2.4 Ziel der Arbeit**

Das Ziel dieser experimentellen Studie war es, primär zu untersuchen ob theranovis® oral eine Wirkung gegen Zahnstein zeigt. Sekundär sollte der hierfür relevante Wirkmechanismus dargestellt werden. Im Hinblick des Wirkmechanismus zielte diese Studie darauf ab, darzustellen an welcher Stelle theranovis® oral bei seiner Wirkung gegen Zahnstein Einfluss nimmt. Mögliche biochemische Interaktionen und strukturelle Veränderungen des Zahnsteins sollten, wenn vorhanden, dargestellt werden.

## **3 Material und Methode**

### **3.1 1. Versuchsreihe**

#### **3.1.1 Material**

##### **Zähne**

Es wurden 138 extrahierte, mit Zahnstein bedeckte, menschliche Zähne gesammelt. Diese Zähne waren in einer Thymollösung (0,1%) zwischengelagert. Vor Beginn des Versuches wurden die Zähne noch, wenn vorhanden, von parodontalem Gewebe und Knochengewebe mit einem Skalpell gesäubert und mit einem Diamantbohrer durch Eingravieren einer laufenden Nummer markiert.

##### **Speichel**

Filtersteriler menschlicher Speichel wurde aus gesammeltem Speichel hergestellt. Der Speichel stammte von unterschiedlichen Personen, sodass ein Speichelpool entstand. Aus diesem Speichelpool wurde filtersteriler Speichel hergestellt. Hierbei wurde der Speichel bei 4100 rpm für 10 Minuten und bei 4°C zentrifugiert (CR3i multifunction Centrifuge, Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, USA). Der klare Überstand wurde hiernach mit einer Spritze entnommen und zunächst durch einen 5,00 µm Filter und anschließend durch einen 0,45 µm Filter (Miller Filter, Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) filtriert. Der so steril filtrierte Speichel wurde in Tagesportionen von 45ml bei -18°C tiefgefroren gelagert.

##### **Proteinase (PrK)**

15 mg Proteinase K (Appli Chem A 3830, 500, AppliChem GmbH, 64291 Darmstadt, Deutschland. Herstellerbeschreibung siehe im Anhang Abbildung 27 und 28) wurden in 2 ml destilliertem Wasser gelöst. Dies wurde dann aliquotiert in 200 µl Portionen für 15 ml Speichel, sodass nach Zugabe der Aliquote in 15 ml Speichel eine Endkonzentration von 100µg/ml entstand.

##### **Protease Inhibitor Lösung (PI)**

Drei Tabletten eines Proteinaseinhibitors (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets in glass vials, REF:11697498001, Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, 82372 Penzberg, Deutschland) wurden in 2 ml destilliertem Wasser gelöst. Hieraus dann 200 µl Por-

tionen gewonnen. Dies entspricht der Gebrauchsanweisung laut Hersteller (siehe im Anhang Abbildung 29 und 30)

### **Weitere Materialien**

Leitungswasser (Homburg Saar)

theranovis® oral (Gel) (Inhaltsstoffe: siehe Anhang 9.1)

### **3.1.2 Durchführung**

Zu Beginn dieser Versuchsreihe wurde der Anfangszustand aller 138 Zähne dokumentiert. Hierfür wurden die Zähne zunächst an den mit Zahnstein behafteten Flächen fotografiert (Canon EOS 400, Objektiv EFS 60, Abstand 33cm, ISO 200, F11) und anschließend für eine Volumendokumentation abgeformt (3M ESPE Impregum™ Penta™, 82229 Seefeld, Deutschland). Das Abformmaterial wurde maschinell angemischt (Pentamix™ 2, 3M ESPE, 82229 Seefeld, Deutschland). Die Volumendokumentation erfolgte pro Zahn jeweils an den Flächen mit dem größten Zahnsteinvorkommen, und zwar mit Hilfe von Flaschenverschlüssen als Abformhilfe. Die Abformungen wurden nach Ablauf der Retraktionszeit des Abformmaterials (45 Minuten) mit Klasse IV Gips (Norm für Dentalgipse EN ISO 6873) ausgegossen (Die-Stone Peach, Heraeus Kulzer, South Bend, Indiana 46614, USA, Vertrieb durch Sigma Dental Systems - Emasdi GmbH, Heideland 22, 24976 Handewitt, Deutschland). Die 138 Zähne wurden randomisiert in sechs Gruppen aufgeteilt mit jeweils 23 Zähnen pro Gruppe. Auf die Zähne wirkten über den gesamten Versuchszeitraum von 12 Wochen je nach Gruppe unterschiedliche Lösungen ein. Die Einwirkung der einzelnen Lösungen auf die Zähne erfolgte im Inkubator (WTC binder, 78532 Tuttlingen, Deutschland) bei einer Temperatur von 37°C. Dabei betrug das Volumen der einzelnen Lösungen jeweils 15 ml, so viel, dass alle Zähne einer Versuchsgruppe von der Lösung bedeckt waren. Die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen und deren Zuordnung zu den Gruppen gibt Tabelle 1 wieder.

**Tabelle 1.** Zusammensetzung der Lösungen und deren Zuordnung zur Gruppe.

<b>Gruppe</b>	<b>Zusammensetzung der Lösung</b>
1	15ml Leitungswasser + theranovis® oral (Gel; 10cm Streifen)
2	15ml steril filtrierter Speichel + theranovis® oral (Gel; 10cm Streifen)
3	15ml Leitungswasser + theranovis® oral (Gel; 10cm Streifen) + PrK
4	15ml steril filtrierter Speichel + theranovis® oral (Gel; 10cm Streifen) + PrK
5	15ml steril filtrierter Speichel + theranovis® oral (Gel; 10cm Streifen) + PI
6	Leitungswasser

PrK= Proteinase K

PI= Protease Inhibitor Lösung

Die 23 Zähne pro Gruppe wurden nun in den zugehörigen Lösungen im Inkubator bei einer Temperatur von 37°C gelagert. Nach einer Einwirkzeit von 24 Stunden wurden die Lösungen ausgetauscht und neu angesetzt. Dabei wurden die Zähne der jeweiligen Gruppen aus den entsprechenden Lösungen entnommen, kurz mit Leitungswasser abgespült, dann je Gruppe mit je einer eigenen Zahnbürste (Diadent Classic, Mittel) über alle Flächen mechanisch behandelt, wieder mit Leitungswasser abgespült, anschließend in die jeweiligen neu angesetzten Lösungen eingebracht und wieder im Inkubator bei 37°C für 24 Stunden gelagert. Die mechanische Behandlung erfolgte unter den Bedingungen, die auch beim üblichen Zähneputzen vorhanden sind. Pro Zahn erfolgte die mechanische Behandlung für 5 – 10 Sekunden mit kreisend rüttelnden Bewegungen über alle mit Zahnstein bedeckten Flächen. Dieser Zyklus lief im Versuch insgesamt 60 mal ab, Montags bis Freitags einmal täglich, über 12 Wochen. Samstags und Sonntags wurde der Zyklus ausgelassen. Nach jedem fünften Zyklus (Freitags) wurde die Wirkung der einzelnen Lösungen auf die Zähne mittels einer Fotokamera dokumentiert. Nach jeder vierten Fotodokumentation erfolgte mit Hilfe kleiner Flaschenverschlusskappen eine Abformung. Dies diente zum einen bei Bedarf als Volumendokumentation und zum anderen als mechanische Krafteinwirkung, wie sie bei Mastikationen vorkommen kann. Die Abformungen wurden mit Klasse IV Gips ausgegossen. Am Ende liefen somit insgesamt pro Zahn 60 Zyklen, 13 Fotodokumentationen und 4 Volumendokumentationen ab.

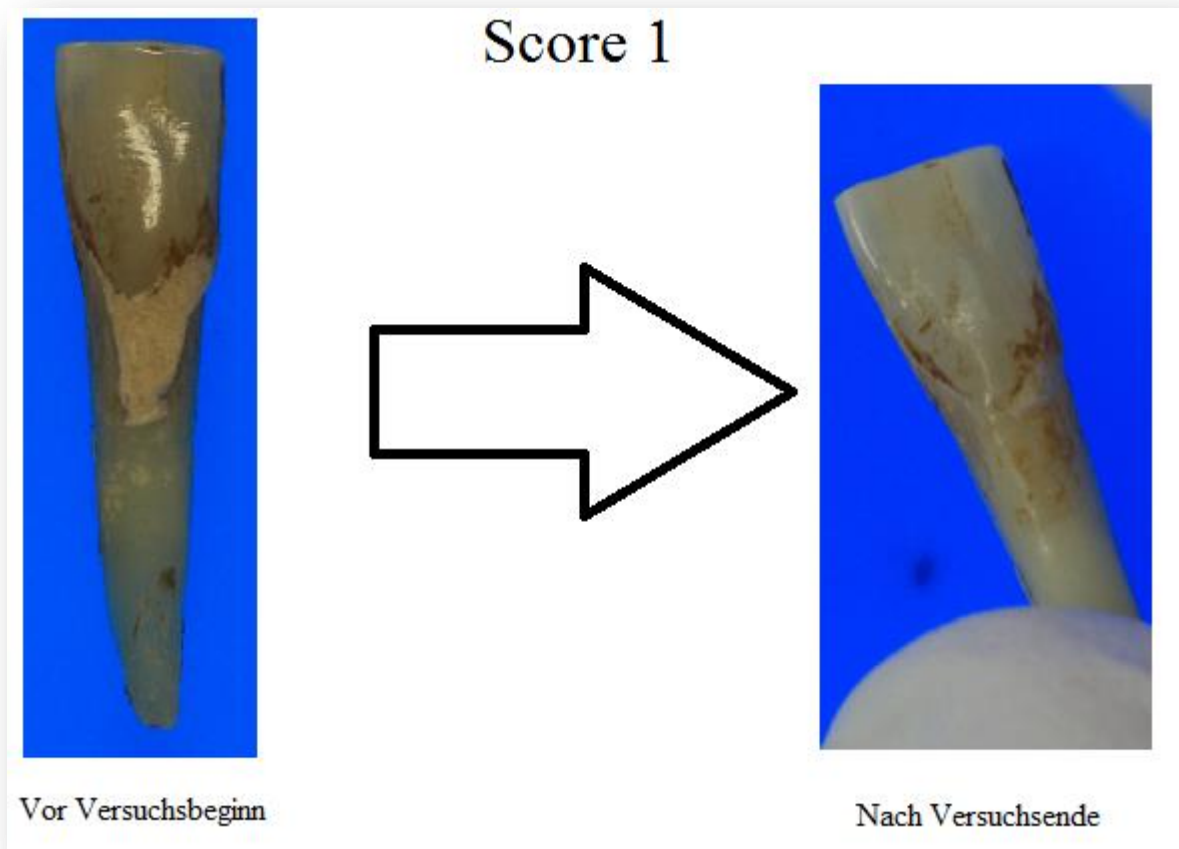
### 3.1.3 Auswertungsmethode

Zum Vergleich vom Zahnsteinvorkommen an den Zähnen zu Beginn und am Ende des Versuchs anhand der Fotodokumentation und der Volumendokumentation wurden Scores festgelegt, wie in Tabelle 2 beschrieben. Die Abbildungen 1-5 zeigen Beispiele für die einzelnen Scores.

**Tabelle 2.** Definition der Scores für die Bewertung des verbleibenden Zahnsteins.

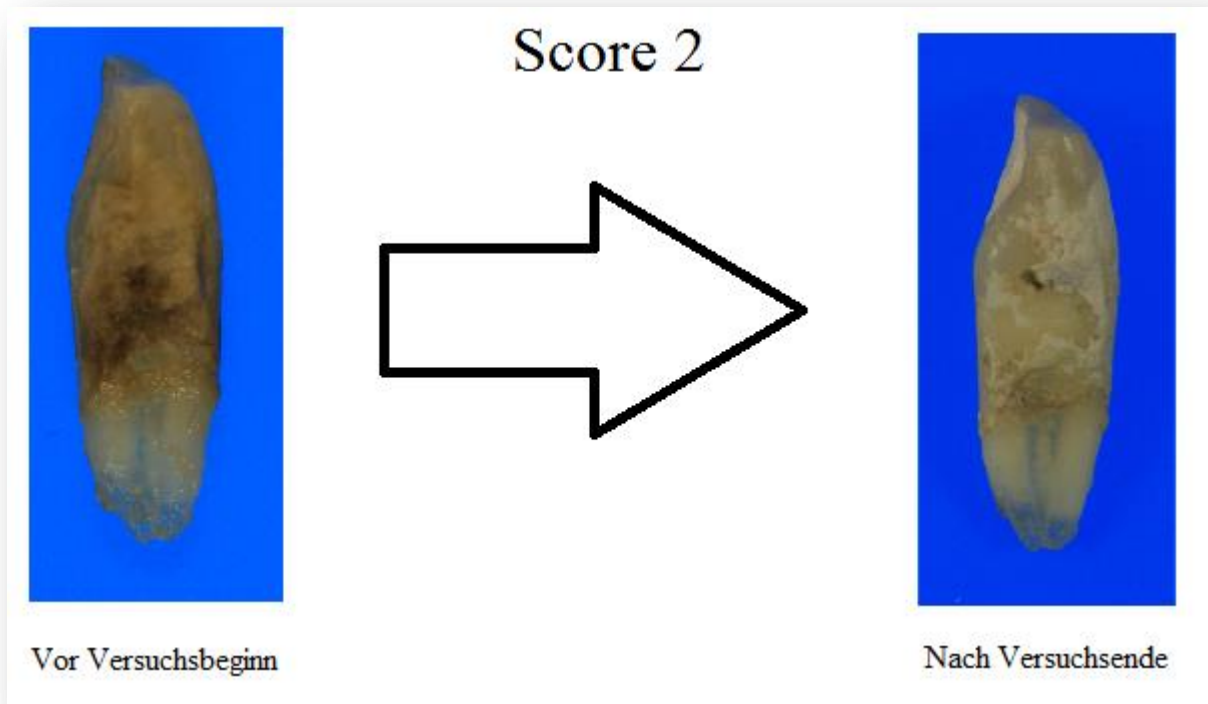
Score	Vergleich des Zahnsteinvorkommens vor und nach dem Versuch
1	ZS nur noch fleckhaft oder max. 10% vorhanden
2	10% < noch vorhandener ZS ≤ 40%
3	40% < noch vorhandener ZS ≤ 80%
4	80% < noch vorhandener ZS ≤ 90%
5	90% < noch vorhandener ZS ≤ 100%

ZS = Zahnstein

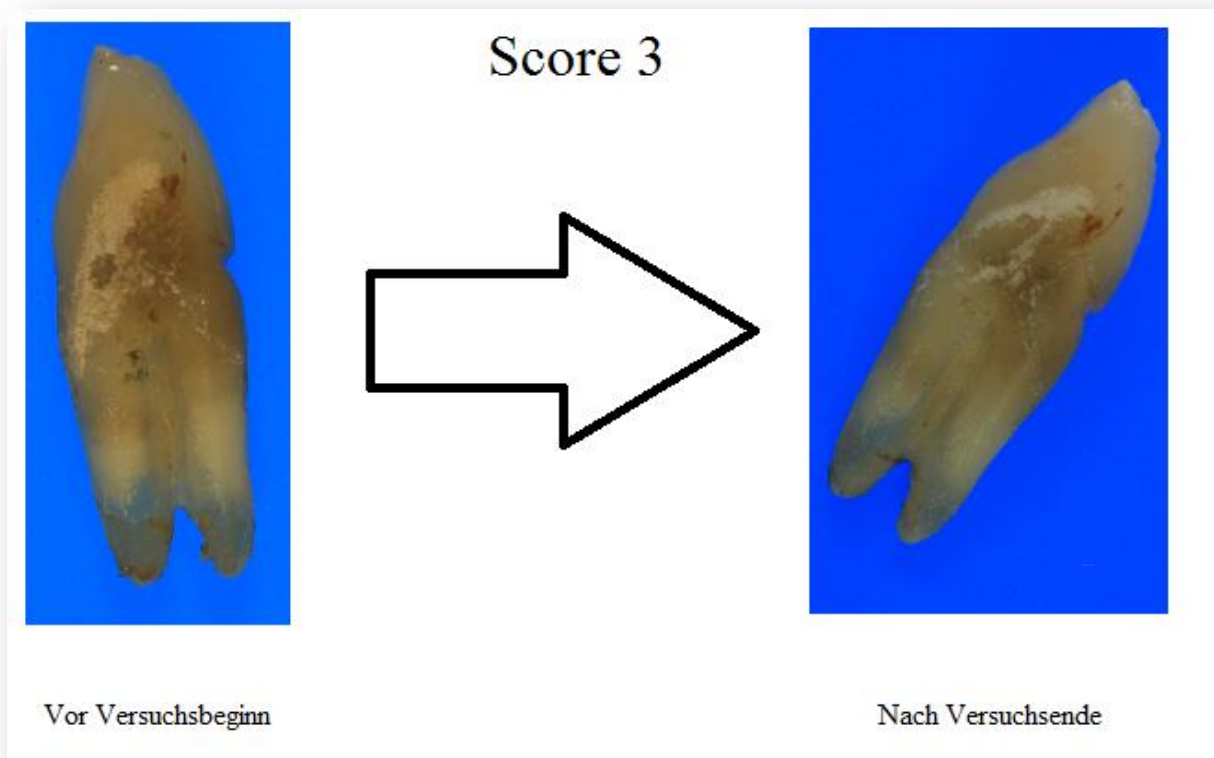


**Abbildung 1** Beispiel für Score 1.

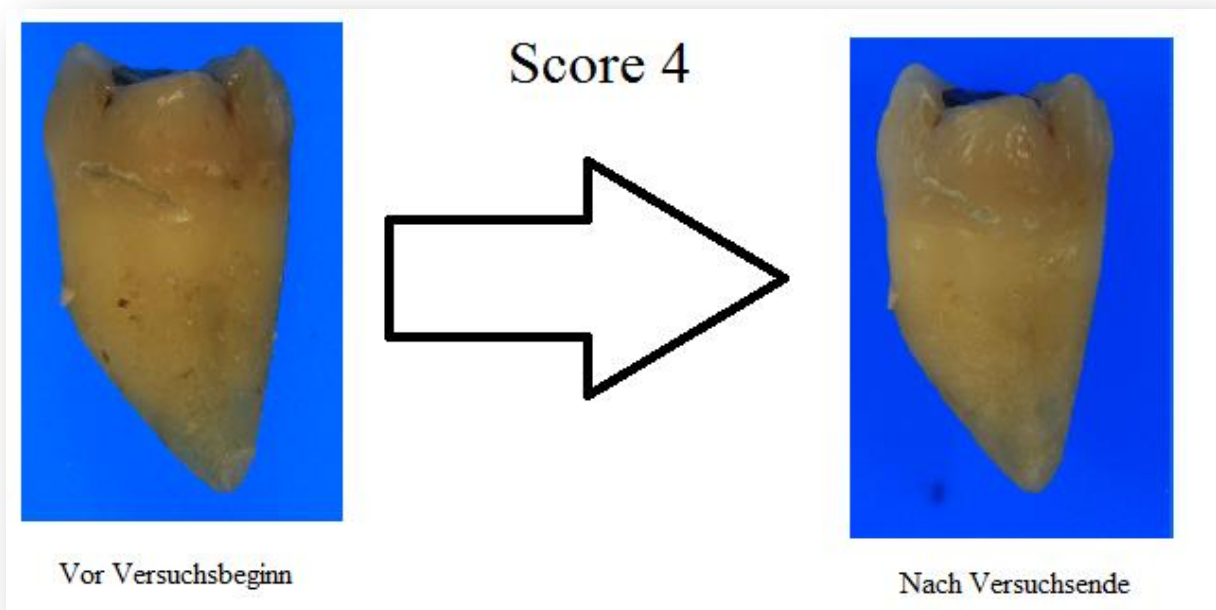




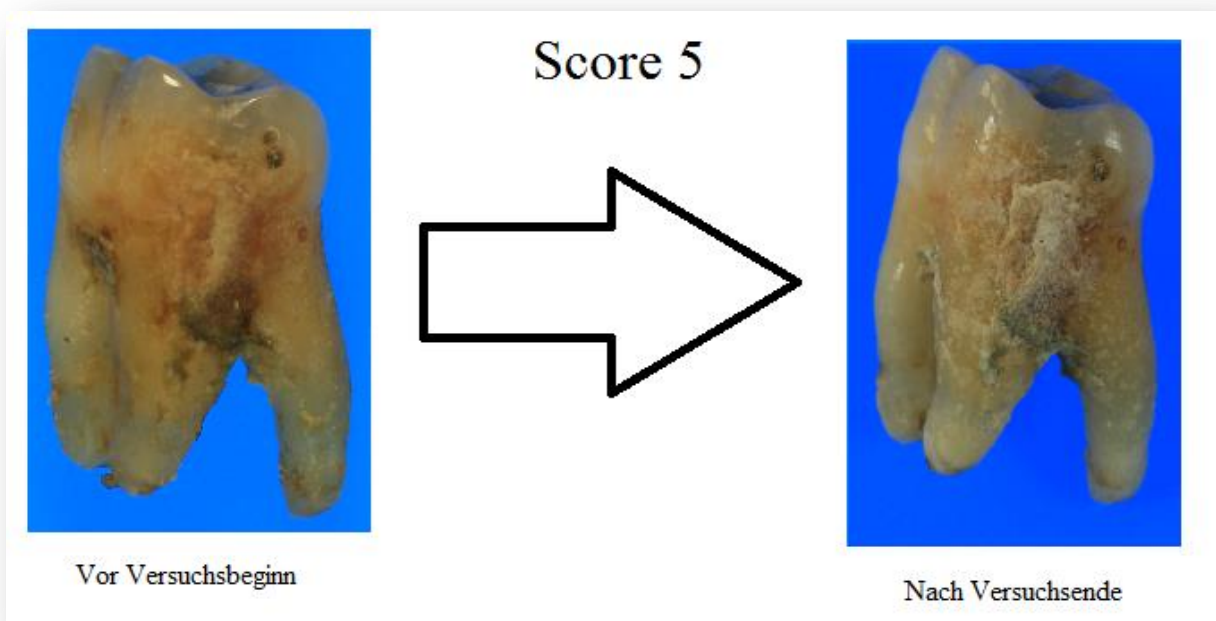
**Abbildung 2** Beispiel für Score 2



**Abbildung 3** Beispiel für Score 3.



**Abbildung 4** Beispiel für Score 4.



**Abbildung 5** Beispiel für Score 5.

In die Auswertung konnten nicht alle 23 Zähne der jeweiligen Gruppen einbezogen werden, da pro Gruppe auch Zähne dabei waren, die subgingivale Konkreme aufwiesen. Die Wirkung auf diese Konkreme sollte ebenfalls mit beobachtet werden. Es zeigte sich jedoch schon während des Versuchsablaufes keine sichtbare Wirkung.

## 3.2 2. Versuchsreihe

### 3.2.1 Material

#### Zahnstein

Von verschiedenen Personen wurde im Rahmen der üblichen Zahnsteinentfernung an Patienten in der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde der Universitätsklinik des Saarlandes in Homburg/Saar mittels Handinstrumenten Zahnstein kÜRrettiert und insgesamt 30 grÖßere Zahnsteinstücke gewonnen. Diese Zahnsteinstücke wurden in Leitungswasser im KÜhlschrank zwischengelagert. Vor Versuchsbeginn wurden die Zahnsteinstücke für 10 Minuten in 70% Ethanol desinfiziert.

#### Lösungen

Es wurden insgesamt sechs unterschiedliche Lösungen vorbereitet ( Tabelle 3 ). Lösung 1 bis Lösung 5 enthielten vom Hersteller von theranovis® oral vorbereitete Lösungen: Spray #1 bis Spray #5. Diese enthielten Inhaltsstoffe von theranovis® oral und unterschieden sich in den Konzentrationen der einzelnen Stoffe. Die genaue Zusammensetzung der in diesem Versuch vorbereiteten Spray – Lösungen Spray#1 bis Spray#5 sind im Anhang in der Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 3.** Zusammensetzung der einzelnen Lösungen in der zweiten Versuchsreihe.

Lösung	Zusammensetzung
1	0,5ml Spray #1(Lot#2B01) + 0,5ml Leitungswasser
2	0,5ml Spray #2(Lot#2B12) + 0,5ml Leitungswasser
3	0,5ml Spray #3(Lot#2B13) + 0,5ml Leitungswasser
4	0,5ml Spray #4(Lot#2B14) + 0,5ml Leitungswasser
5	0,5ml Spray #5(Lot#2B15) + 0,5ml Leitungswasser
6	Leitungswasser

### **3.2.2 Durchführung**

Die 30 Zahnsteinstücke wurden in 6 Eppendorfgläser mit jeweils 5 Zahnsteinbrocken je Eppendorfglas verteilt. Die Eppendorfgläser wurden von Gruppe 1 bis Gruppe 6 durchnummeriert. Das Gesamtgewicht der einzelnen Zahnsteinbrocken pro Gruppe wurde vor Beginn der Versuchsreihe mit einer Analysenwaage (KERN ALS 120-4, KERN & Sohn GmbH, 72336 Balingen, Deutschland) bestimmt. Zu jeder Gruppe wurde dann 1,5 ml der Lösung mit der gleichen Nummer, Lösung 1 bis Lösung 6, und 1,5 ml Leitungswasser hinzugegeben, so dass alle Zahnsteinstücke von der Lösung bedeckt waren. Die Gruppen wurden dann im Inkubator WTC binder (Typ 3002807000000, No. #951195, Binder GmbH, 78532 Tuttlingen, Deutschland) bei einer Temperatur von 37°C gelagert. Nach einer Einwirkzeit von 24 Stunden wurden die Zahnsteinbrocken aus den jeweiligen Eppendorfgläsern entnommen, und nach 5 Minuten Lufttrocknen wurde das Gesamtgewicht der Zahnsteinbrocken der jeweiligen Gruppen bestimmt. Anschließend wurden die Zahnsteinbrocken in neue Eppendorfgläser mit zu den entsprechenden Gruppen zugehöriger, neu angesetzter Lösung hinzugegeben und für weitere 24 Stunden im Inkubator gelagert. Dieser Zyklus wiederholte sich wieder nach 24 Stunden Einwirkzeit und lief insgesamt über sieben Tage. Nach dem siebten Tag erfolgte die letzte Messung, einmal nach 5 Minuten Lufttrocknung und einmal als Vergleich nach 4,5 Stunden Lufttrocknung. Anschließend wurden die Zahnsteinbrocken der einzelnen Gruppen jetzt über weitere 13 Tage in den dazugehörigen Lösungen überführt, diesmal aber in die entsprechenden reinen Lösungen ohne Zusatz von Leitungswasser. Die Zahnsteinbrocken von Gruppe 6 wurden jetzt in pure theranovis® oral Spray Lösung statt Leitungswasser eingelegt. Ab jetzt wurden die Lösungen nicht mehr neu angesetzt und die tägliche Gewichtsmessung wurde ausgelassen. Nur nach 13 Tagen Einwirkzeit im Inkubator erfolgte noch einmal die Gewichtsmessung nach 3 Stunden Lufttrocknung und anschließend die Vorbereitung von zwei Zahnsteinbrocken je Gruppe für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung. Zusätzlich wurden zum Vergleich zwei weitere Zahnsteinbrocken, die bis dahin nur in Leitungswasser gelagert waren, für die Rasterelektronenmikroskopie vorbereitet.

Vorbereitung der Proben für das REM

Die einzelnen Proben wurden wie in Tabelle 4 beschrieben entwässert.

**Tabelle 4.** Entwässerung der Zahnsteinbrocken für das REM.

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Vorgang</b>	<b>Bedingungen</b>
1	2 x 10 Minuten in 50% Ethanol	bei Raumtemperatur
2	1 x 5 Minuten in 70% Ethanol	bei Raumtemperatur
3	1 x 5 Minuten in 90% Ethanol	bei Raumtemperatur
4	2 x 10 Minuten in 100% Ethanol	bei Raumtemperatur
5	Hexamethyldisilazan (HMDS)	Über Nacht, unter Abzug

Sputtern

Nach der Entwässerung und vor dem Mikroskopieren am Rasterelektronenmikroskop erfolgte zur Herstellung der Leitfähigkeit das Sputtern mit Kohle im Sputtercoater (SCD 030, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, 35578 Wetzlar, Deutschland). Zuvor wurden die Zahnsteinbrocken auf kleinen Trägern fixiert.

Rasterelektronenmikroskopie

Das Mikroskopieren erfolgte am Rasterelektronenmikroskop (FEI/Philips XL30 FEG ESEM, Hillsboro, Oregon 97124, USA) in unterschiedlichen Vergrößerungen. Dabei stellte sich heraus, dass bei 10.000 facher Vergrößerung die einzelnen Strukturen am besten zu vergleichen sind. Die Bilder wurden mit Hilfe der Mikro – Software Microscop Control erzeugt.

**3.2.3 Auswertungsmethode**

Zur Auswertung dieser 2. Versuchsreihe wurden zum einen die Gewichtsmessungen innerhalb der einzelnen Gruppen graphisch dargestellt und miteinander verglichen. Zum anderen wurden die REM-Bilder der Präparate der einzelnen Gruppen dahingehend untersucht, ob auffällige Unterschiede in Form, Oberfläche und Struktur vorliegen.

### **3.3 3. Versuchsreihe**

#### **3.3.1 Material**

##### **Zahnstein**

Von verschiedenen Personen wurde im Rahmen der üblichen Zahnsteinentfernung an Patienten in der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde der Universitätsklinik des Saarlandes in Homburg/Saar mittels Handinstrumenten Zahnstein kürretiert und insgesamt 6 größere Zahnsteinstücke gewonnen. Diese Zahnsteinstücke wurden in Leitungswasser im Kühlschrank zwischengelagert. Vor Versuchsbeginn wurden die Zahnsteinstücke für 10 Minuten in 70% Ethanol desinfiziert.

##### **Lösungen**

theranovis® oral Spray und Leitungswasser.

#### **3.3.2 Durchführung**

Die Durchführung entspricht dem Vorgehen der 2. Versuchsreihe. Jedoch lief die Durchführung hier nur bis nach dem 14. Tag und nur mit zwei Gruppen. Die Lösungen wurden täglich ausgetauscht. Es erfolgte keine Gewichtsmessung. Es gab drei Zahnsteinbrocken pro Gruppe. Nach Abschluss des Versuchs erfolgte die Vorbereitung der Zahnsteinbrocken für die Transmissionselektronenmikroskopie ( TEM ).

**Tabelle 5.** Gruppen und dazugehörige Lösungen der dritten Versuchsreihe.

Gruppe	Lösung
1	theranovis® oral Spray
2	Leitungswasser

#### **Vorbereitung der TEM-Präparate**

##### Cacodylatpuffer

Für 0,1M Cacodylatpuffer wurden 21,4 g Natriumcacodylat x 3H<sub>2</sub>O in 1000ml destilliertem Wasser gelöst. Für 0,2M Cacodylatpuffer wurden 42,8 g Natriumcacodylat x 3H<sub>2</sub>O in 1000ml

destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde mit HCl der pH-Wert auf 7,4 - 7,6 gebracht und dann filtriert.

### Fixierlösung

4 ml GLA ( 1 % Glutaraldehyd, aus 25%-iger Lösung von Serva Feinbiochemica GmbH & Co., 69115 Heidelberg, Deutschland, Bestellnummer: 23114, Vertrieb durch Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co.. KG, 55216 Ingelheim am Rhein, Deutschland) und 3,125 ml PFA (1% Paraformaldehyd, aus 32%-iger Lösung von Electron Microscopy Science,USA-Hatfield,Pennsylvania 19440, Bestellnummer: 15714-S) wurden mit 0,1 M Cacodylatpuffer auf 100 ml aufgefüllt.

### Osmierung

**1) Stock-Fixierlösung: 4% Osmiumsäure in destilliertem Wasser:** 1 g kristallines OsO<sub>4</sub> in 25 ml destilliertem Wasser gelöst. Osmiumtetroxid wurde mitsamt der aufgebrochenen Ampulle in die Lösung geworfen, daher wurde die Ampulle vorher sehr gut entfettet und abgespült. Die fertige Lösung wurde in einer Säureflasche im Osmium-Kühlschrank aufbewahrt. Die Säureflasche wurde zusätzlich mit Parafilm luftdicht verschlossen.

**2) Arbeitslösung – 2% Osmiumsäure:** Im Verhältnis 1:1 wurde die Stock - Fixierlösung mit 0,2 M Cacodylat Puffer gemischt.

Alle Arbeiten unter dem Abzug und mit Handschuhen durchgeführt. Lagerung: Säureflasche, im Exsikkator, 4°C.

### Araldit

13 Anteile **Araldit CY212** (Serva Feinbiochemica GmbH & Co., 69115 Heidelberg, Deutschland, Bestellnummer: 13824, Vertrieb durch Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co.. KG, 55216 Ingelheim am Rhein, Deutschland) und 12 Anteile **Dodecylbernsteinsäureanhydrit (DDSA, Härter)** (Serva Feinbiochemica GmbH & Co., 69115 Heidelberg, Deutschland, Bestellnummer: 20755, Vertrieb durch Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co.. KG, 55216 Ingelheim am Rhein, Deutschland) wurden miteinander vermischt. Je nach Arbeitsschritt (siehe Tabelle 6) kam noch 3% oder 2% **2,4,6-Tri-(dimethylaminomethyl)phenol/Beschleuniger** (Serva Feinbiochemica GmbH & Co., 69115 Heidelberg, Deutschland, Bestellnummer: 36975, Vertrieb durch Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co.. KG, 55216 Ingelheim am Rhein, Deutschland) hinzu.

Propylenoxidgemisch

Ein fertiges Propylenoxidgemisch wurde verwendet.

Die Zahnsteinpräparate wurden wie in Tabelle 6 dargestellt vorbereitet.

**Tabelle 6:** Vorbereitung der Präparate für das TEM.

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Vorgang</b>	<b>Bedingungen</b>
<b>Fixierung</b>		
1	1 Stunde in die Fixierlösung	Unter Abzug, anschließend bei 4°C.
2	4 x 10 Minuten in Cacodylatpuffer (0,1 M)	Unter Abzug, bei Raumtemperatur.
3	1 x Cacodylatpuffer (0,1 M)	Aufbewahrung bei 4°C. Dann weiter mit Arbeitsschritt 4.
<b>Osmierung</b>		
4	1 Std OsO <sub>4</sub> - Arbeitslösung ( 1:1 Gemisch )	Unter Abzug, bei Raumtemperatur, im Dunkeln.
5	5 x 10 Minuten spülen in destilliertem Wasser	Unter Abzug, bei Raumtemperatur.
6	Ethanol 50%	4°C, über Nacht.
<b>Entwässerung und Einbettung, 1.Tag</b>		
7	1 x 10 min Ethanol 50%	Im offenen Rollrandglas, bei Raumtemperatur.
8	2 x 10 min Ethanol 70%	Im offenen Rollrandglas, bei Raumtemperatur.
9	2 x 10 min Ethanol 90%	Im offenen Rollrandglas, bei Raumtemperatur.
10	1 x 10 min Ethanol 100% hier-nach: Araldit- Propylenoxid – Gemisch vorbereitet (3% Beschleuniger)	Im offenen Rollrandglas, bei Raumtemperatur.
11	2 x 20 min Ethanol 100%	Im geschlossenen Rollrandglas, bei Raumtemperatur, unter Abzug.
12	2 x 20 min Propylenoxid	Im geschlossenen Rollrandglas, bei Raumtemperatur, unter Abzug.



## Material und Methode

13	Araldit-Propylenoxid-Gemisch (3% Beschleuniger)	Über Nacht im offenen Rollrandglas, bei Raumtemperatur, unter Abzug. Dann weiter mit Schritt 14.
<b>Einbettung, 2. Tag</b>		
14	Araldit-Gemisch angesetzt (2% Beschleuniger)	Raumtemperatur
15	Araldit-Gemisch in neue, beschriftete Rollrandgläser gefüllt	Raumtemperatur
16	Präparate umgesetzt	Über Nacht im offenen Rollrandglas, bei Raumtemperatur, unter Abzug. Dann weiter mit Schritt 17.
<b>Umsetzen in Silikonform</b>		
17	Araldit-Gemisch angesetzt (2% Beschleuniger)	
18	Die Vertiefungen der Einbettformen zur Hälfte mit dem Araldit-Gemisch befüllt, vorsichtig die Präparate überführt. Hierbei die Anschnittseite zur Vertiefungsspitze positioniert.	
19	Zettelchen mit TEM-Nummern am unteren Vertiefungsrand schräg hinzugefügt.	
20	Die Vertiefung der Einbettformen leicht überhöht mit dem Araldit-Gemisch aufgefüllt.	
21	Die Einbettformen für 2 Tage bei 65°C zum Auspolymerisieren in den Brutschrank gestellt.	

### Ultradünnschnitte

Die Ultradünnschnitte mit 60 – 100 nm Schichtdicke wurden mit dem Ultracut E (Reichert-Jung, 1170 Wien, Österreich) mit einem Diamantmesser (Ultra Diamond 45°, MS2703, Länge der Schneide 3mm, DiAtome, Pennsylvania 19440, USA) hergestellt und auf Kupfergrids 1x2 aufgezogen.

### Kontrastierung

Ein Parafilm wurde ausgelegt und darauf je ein Tropfen Uranylacetat, 3 Tropfen destilliertes Wasser, ein Tropfen Bleicitrat und erneut 3 Tropfen destilliertes Wasser aufpipettiert (je 60µl). Anschließend wurde das Kupfergrid auf welches der Ultradünnschnitt aufgezogen war mit der Kopfseite auf den Uranylacetattropfen gelegt und 10 Minuten bei Raumtemperatur

inkubiert. Im Anschluss wurde es 3x für je 20 Sekunden in destilliertem Wasser gewaschen und zum Schluss 5 Minuten auf Bleicitrat inkubiert und erneut 2x für je 20 Sekunden in destilliertem Wasser gewaschen. Nach anschließendem halbstündigem Trocknen der Kupfergrids wurde mit dem TEM mikroskopiert.

### Transmissionselektronenmikroskopie

Das Mikroskopieren erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop (Tecnai 12, FEI, Hillsboro, Oregon 97124, USA) in unterschiedlichen Vergrößerungen. Die Bilder wurden mit Hilfe der Mikroskosoftware Microscop Control erzeugt.

### **3.3.3 Auswertungsmethode**

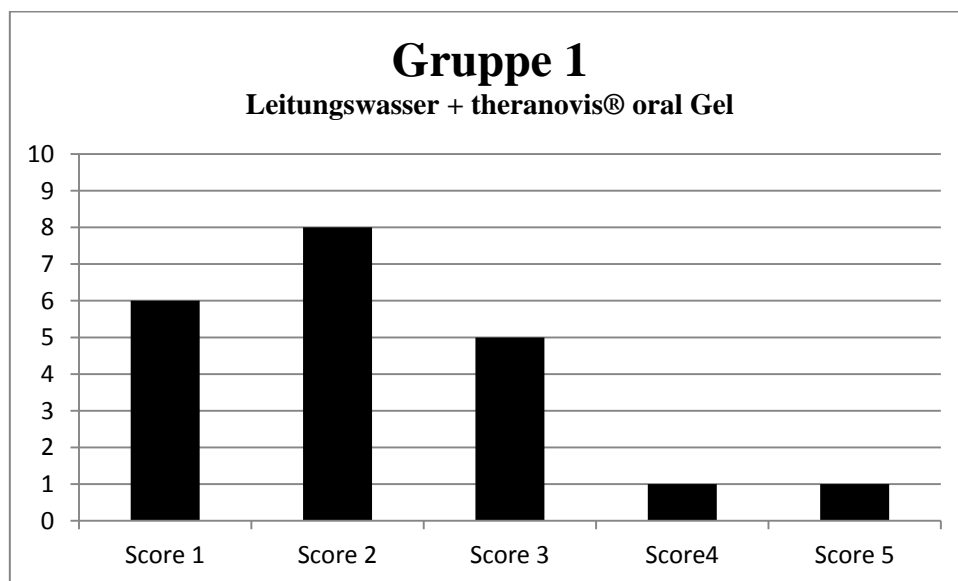
Zur Auswertung dieser 3. Versuchsreihe wurden die Bilder der einzelnen TEM-Präparate der unterschiedlichen Gruppen miteinander verglichen. Es wurde dahingehend untersucht ob es auffällige Unterschiede zwischen dem Anteilverhältnis der organischen und anorganischen Bestandteile gibt.

## 4 Ergebnisse

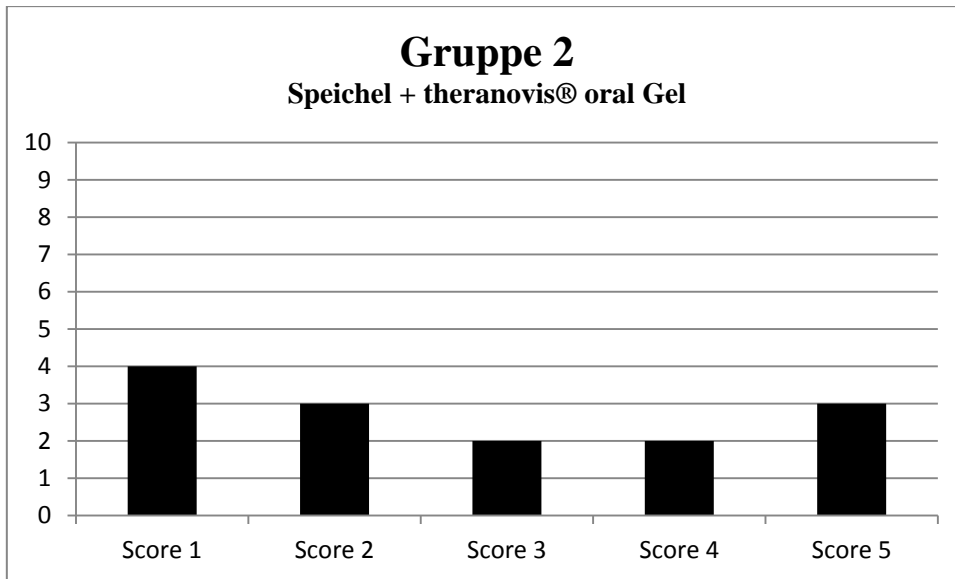
### 4.1 Ergebnisse des Scoring

Die Verteilung der Scores zeigt keine erkennbare Verschiebung zwischen den einzelnen Gruppen ( Abbildung 6 bis 11 ). Mittelwerte der Scores in den einzelnen Gruppen, zeigen ebenfalls nur geringe Unterschiede ( Tabelle 7 ). Der Medianwert liegt bei allen Gruppen zwischen 2 und 3. Unterschiede des minimalen bzw. des maximalen vorkommenden Score kommen in Gruppe 4 und Gruppe 5 vor. In einem Hypothesentest wurde mit Hilfe des Kruskal - Wallis - Test das Scoring genauer untersucht, um zu entscheiden, ob ein statistischer Unterschied innerhalb der Gruppen bezüglich der Scoreverteilung vorliegt. Dieser Test zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Scoreverteilung innerhalb der Gruppen gibt ( Tabelle 8 ).

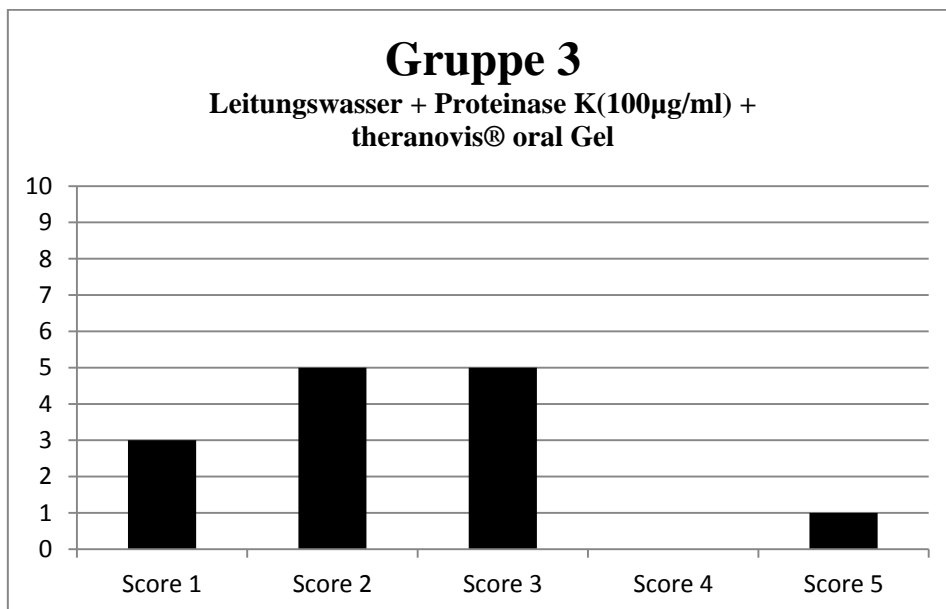
#### 4.1.1 Graphische Darstellung



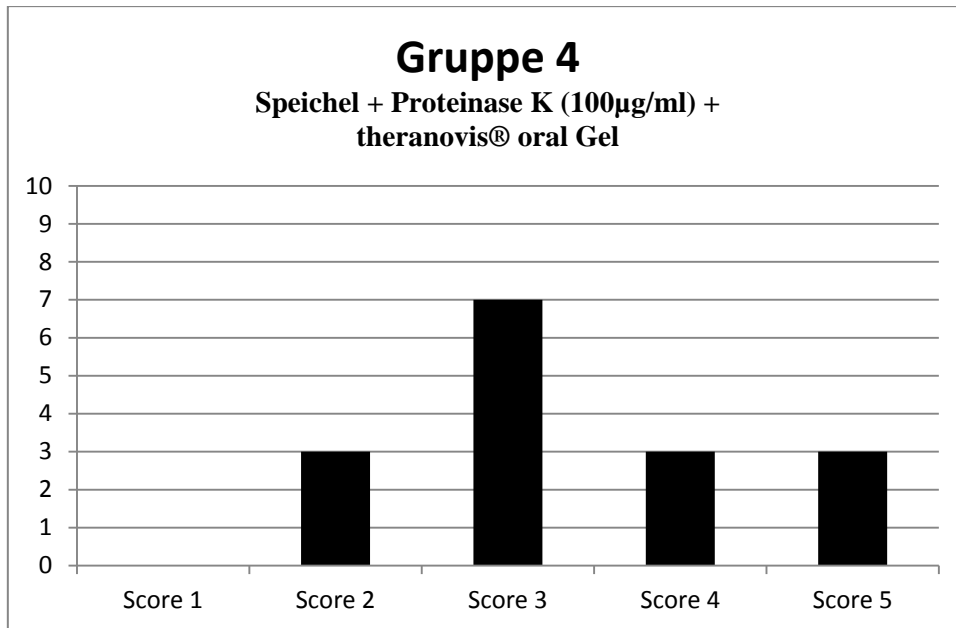
**Abbildung 6** Darstellung der Scoreverteilung in Gruppe 1.



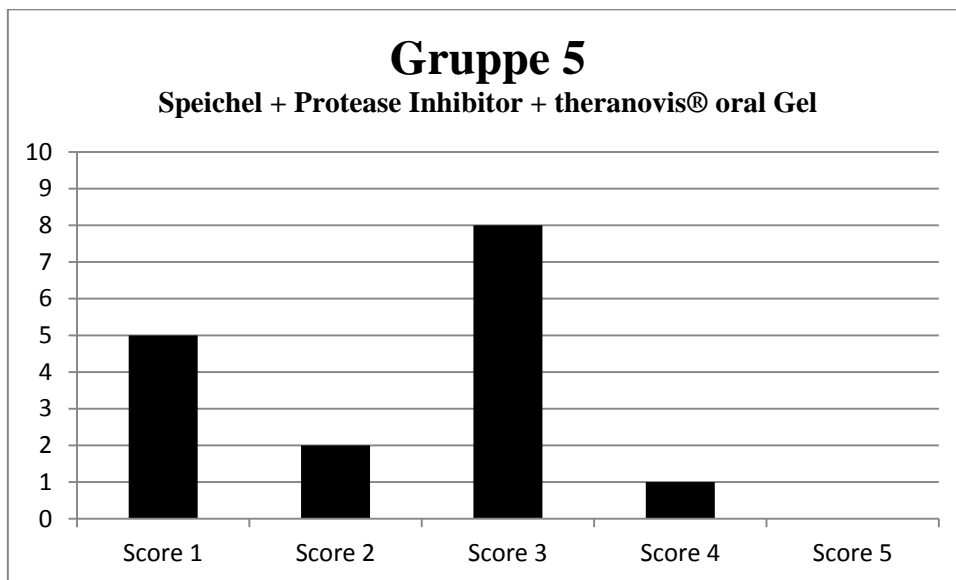
**Abbildung 7** Darstellung der Scoreverteilung in Gruppe 2.



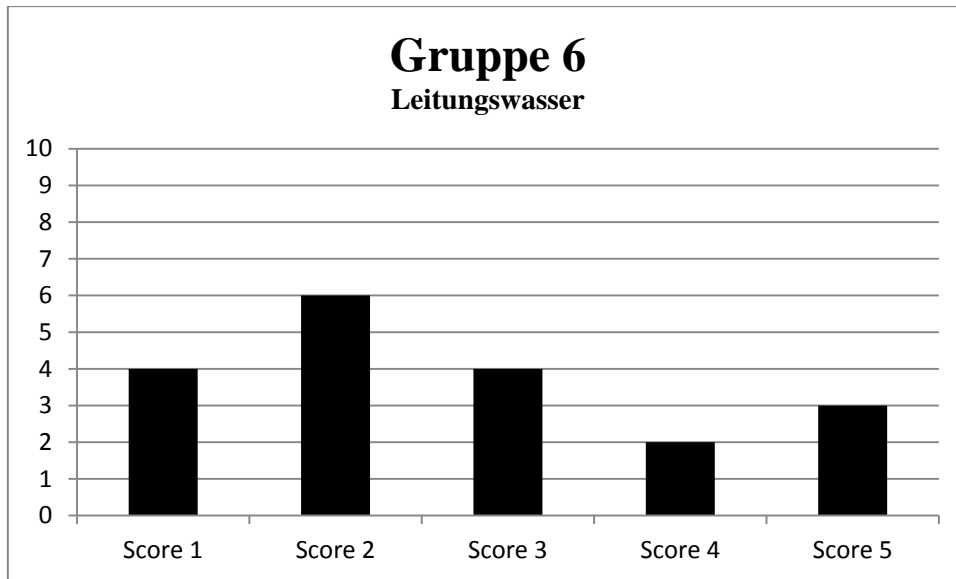
**Abbildung 8** Darstellung der Scoreverteilung in Gruppe 3.



**Abbildung 9** Darstellung der Scoreverteilung in Gruppe 4.



**Abbildung 10** Darstellung der Scoreverteilung in Gruppe 5.



**Abbildung 11** Darstellung der Scoreverteilung in Gruppe 6.

#### 4.1.2 Statistische Auswertung

##### Mittelwerte

**Tabelle 7.** Mittelwerte der Scores in den einzelnen Gruppen.

<b>Gruppe</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>	<b>Medianwert</b>	<b>Minimum*</b>	<b>Maximum*</b>
1	2,19	1,078	2,00	1	5
2	2,79	1,578	2,50	1	5
3	2,36	1,082	2,00	1	5
4	3,38	1,025	3,00	2	5
5	2,31	1,014	3,00	1	4
6	2,68	1,376	2,00	1	5

\* bezogen auf den Score.

Hypothesentest (Kopie des Protokolls siehe Anhang 9.4 Abbildung 31 – 33 )

**Tabelle 8.** Hypothesentest.

<b>Nullhypothese</b>	<b>Test</b>	<b>Signifikanz</b>	<b>Entscheidung</b>
Die Verteilung der Scores ist in allen Gruppen identisch	Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben	,068	Nullhypothese beibehalten

→ Die Nullhypothese konnte bestätigt werden

**4.2 Ergebnisse der Gewichtsmessung**

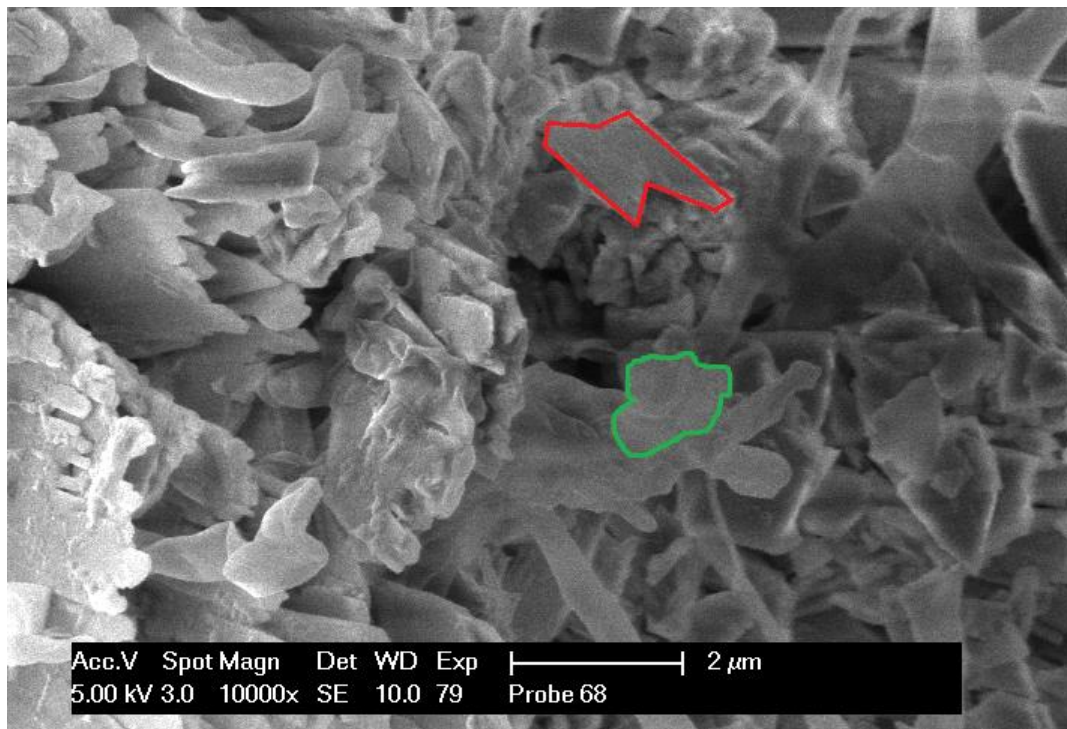
Die Gewichtsmessungen zeigen keine großen Unterschiede zwischen den Gruppen ( Tabelle 9 ). Zum einen verändern sich in allen Gruppen Ausgangs- und Endgewicht nicht stark. Zum anderen gibt es keinen klaren Unterschied zwischen den relativen Endgewichten zwischen den Gruppen. Graphische Darstellungen der Gewichtsmessungen in denen der prozentuelle Gewichtsverlust in Abhängigkeit von der Einwirkzeit dargestellt ist ( siehe Anhang Abbildung 34 bis 39 ) machen dies ebenfalls deutlich.

**Tabelle 9.** Gegenüberstellung Ausgangsgewicht und Endgewicht.

<b>Gruppe</b>	<b>Ausgangsgewicht</b>		<b>Endgewicht nach 20 Tagen (nach 3 Stunden Lufttrocknung)</b>	
	<b>absolut in mg</b>	<b>relativ in %</b>	<b>absolut in mg</b>	<b>relativ in %</b>
<b>1</b>	<b>60,50</b>	<b>100</b>	<b>56,70</b>	<b>93,72</b>
<b>2</b>	<b>60,00</b>	<b>100</b>	<b>56,10</b>	<b>93,50</b>
<b>3</b>	<b>69,60</b>	<b>100</b>	<b>65,80</b>	<b>94,54</b>
<b>4</b>	<b>68,00</b>	<b>100</b>	<b>63,10</b>	<b>92,79</b>
<b>5</b>	<b>63,70</b>	<b>100</b>	<b>58,90</b>	<b>92,46</b>
<b>6</b>	<b>62,50</b>	<b>100</b>	<b>56,5</b>	<b>90,40</b>

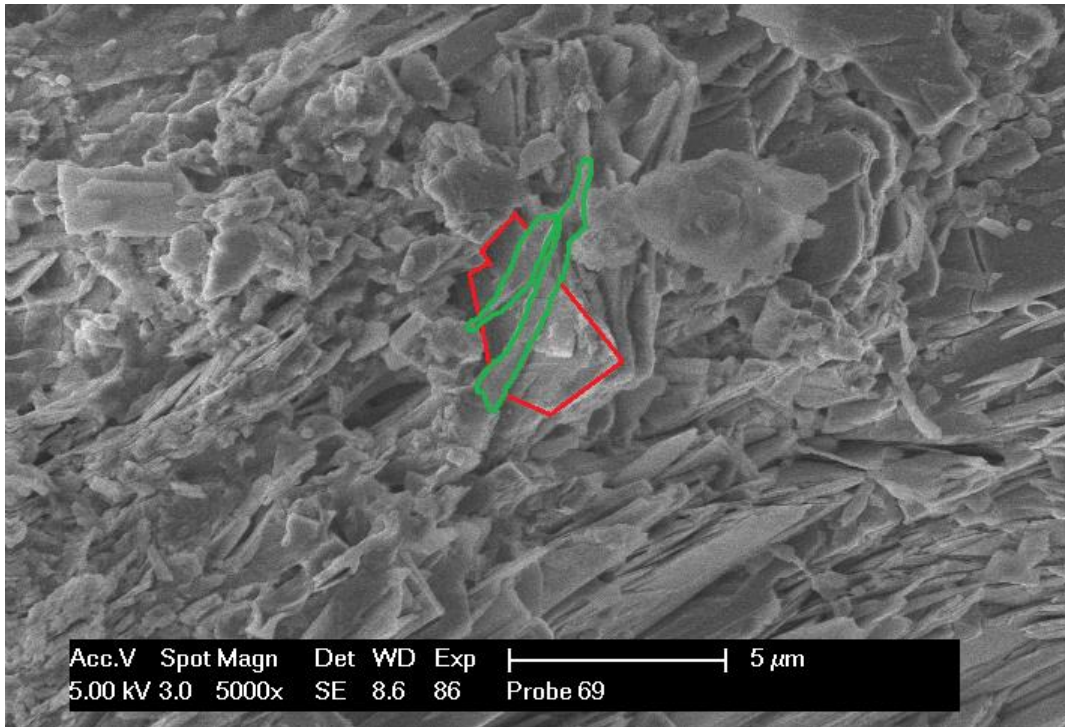
### 4.3 REM-Bilder

In allen REM-Bildern der Zahnsteinpräparate sind scharfe, kantige, kristalline Strukturen und runde, weiche, organische Strukturen erkennbar. Die einzelnen REM-Bilder unterscheiden sich bezüglich des Verhältnisses der kristallinen und der organischen Strukturen. In den REM-Bildern der Gruppen 1, 2, 3 ( Abbildung 12, 13, 14 und im Anhang Abbildung 40, 41 und 42) überwiegen die kristallinen Strukturen. In den Gruppen 4, 5 und 7 ( Abbildung 15, 16, 18 und im Anhang Abbildung 43 und 44 ) überwiegen hingegen die organischen Strukturen. Hier erscheinen deutliche kristalline Strukturen nur vereinzelt und an einigen Stellen zeichnen sie sich unterhalb mehrerer organischer Strukturen ab ( Abbildung 15 ). In diesen Gruppen 4, 5 und 7 wird somit die Zahnsteinoberfläche hauptsächlich durch einen „Bakterienrasen“ gebildet. In den Gruppen 1, 2 und 3 ist dieser „Bakterienrasen“ nahezu vollständig aufgelöst. An der Oberfläche vom Zahnstein der Gruppe 6 ( Abbildung 17 und im Anhang Abbildung 45 ) sieht man gleichermaßen sowohl einen „Bakterienrasen“ als auch freiliegende kristalline Strukturen, welche nicht von organischen Strukturen bedeckt sind. Hier wirkt der „Bakterienrasen“ im Vergleich zu der Gruppe 4,5 und 7 ( Abbildung 15, 16 und 18 ) teilweise aufgelöst.

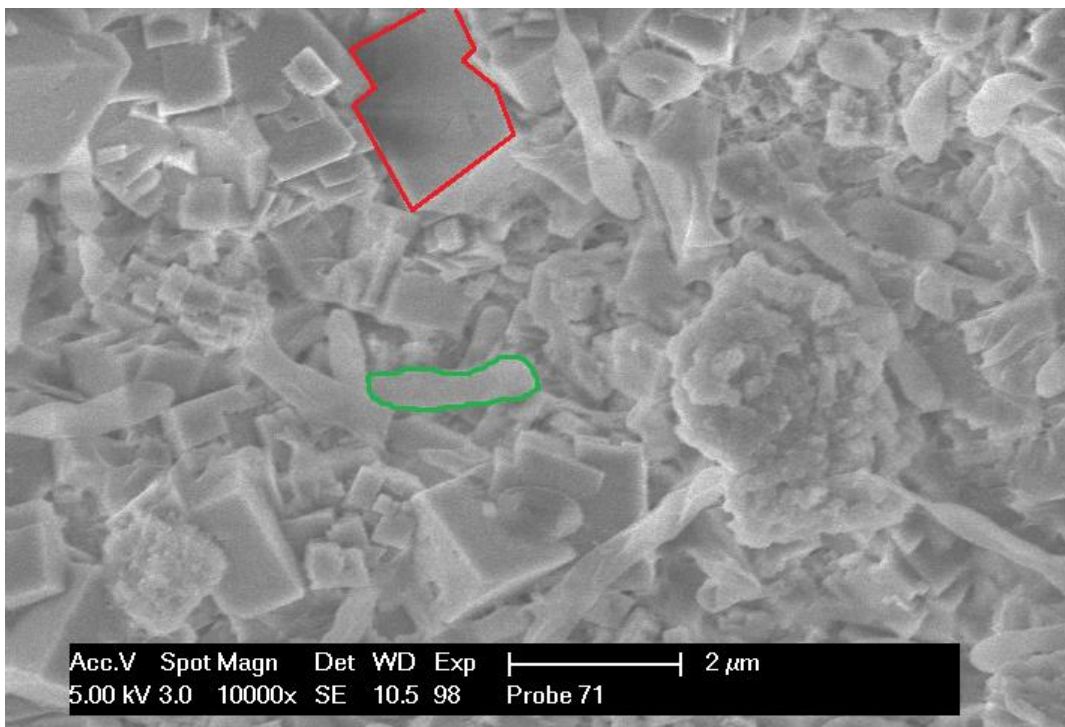


**Abbildung 12** REM Bild. Zahnsteinbrocken von Gruppe 1 (Sray#1) der Versuchsreihe 2. Scharfe, kantige, kristalline Strukturen (rot) kommen gehäuft vor. Runde weiche, organische Strukturen (grün) sind seltener.

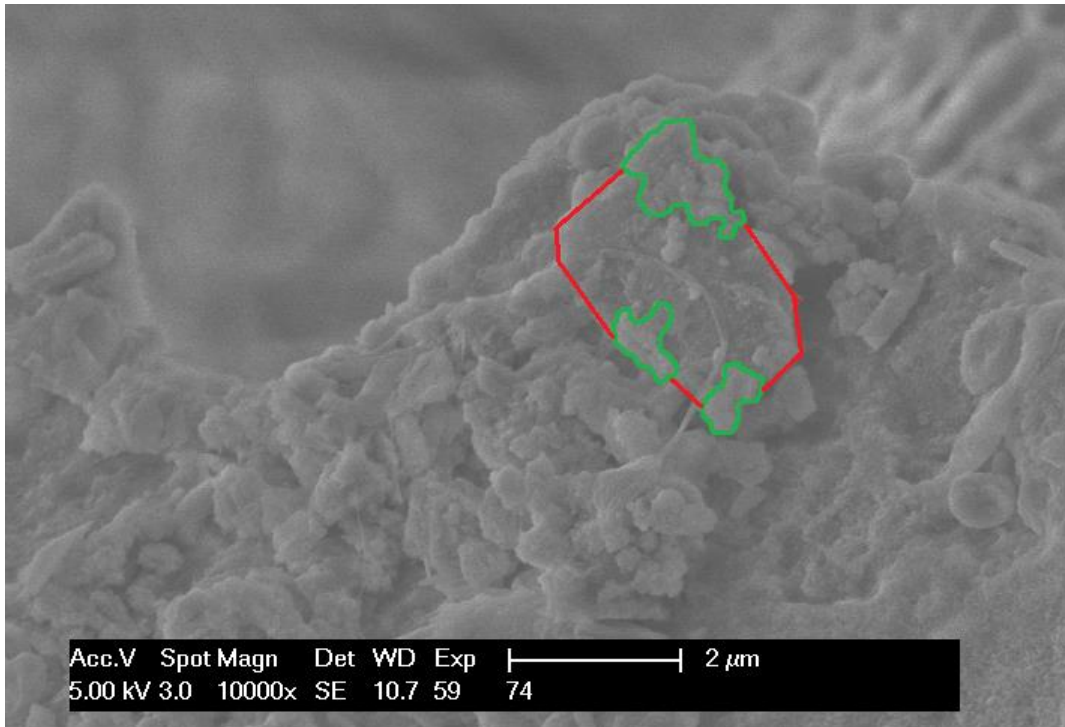




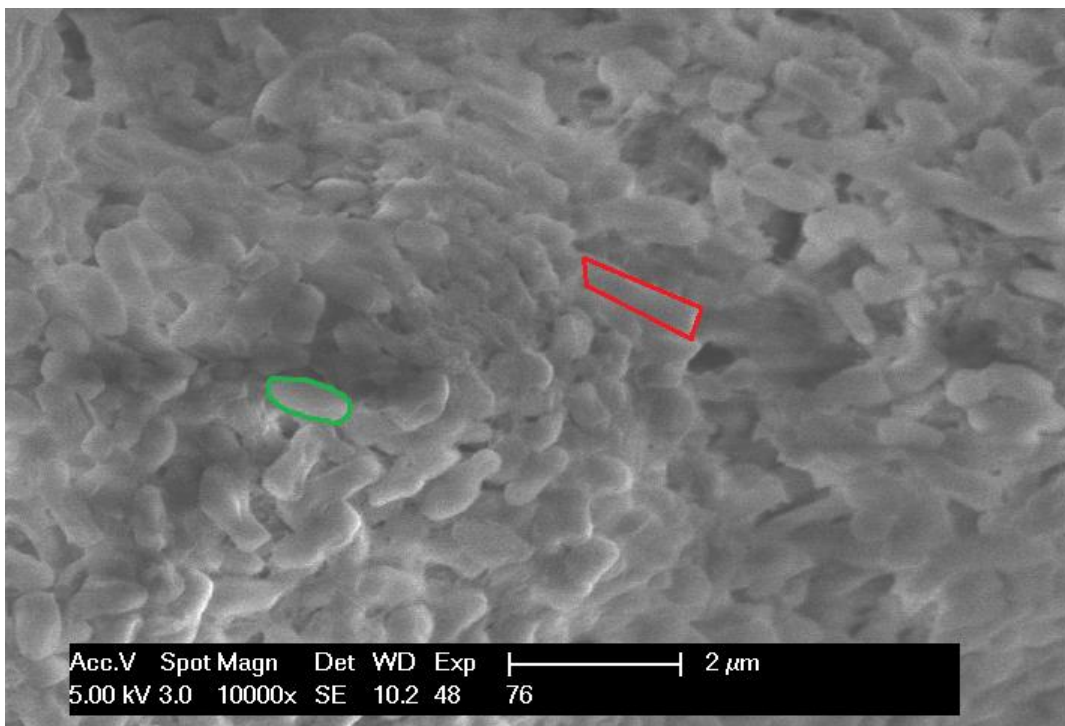
**Abbildung 13** REM Bild. Zahnsteinbrocken von Gruppe 2 (Spray#2) der Versuchsreihe 2. Scharfe, kantige, kristalline Strukturen (rot) sind dominant vorhanden. Runde, weiche, organische Strukturen (grün) kommen nur vereinzelt vor.



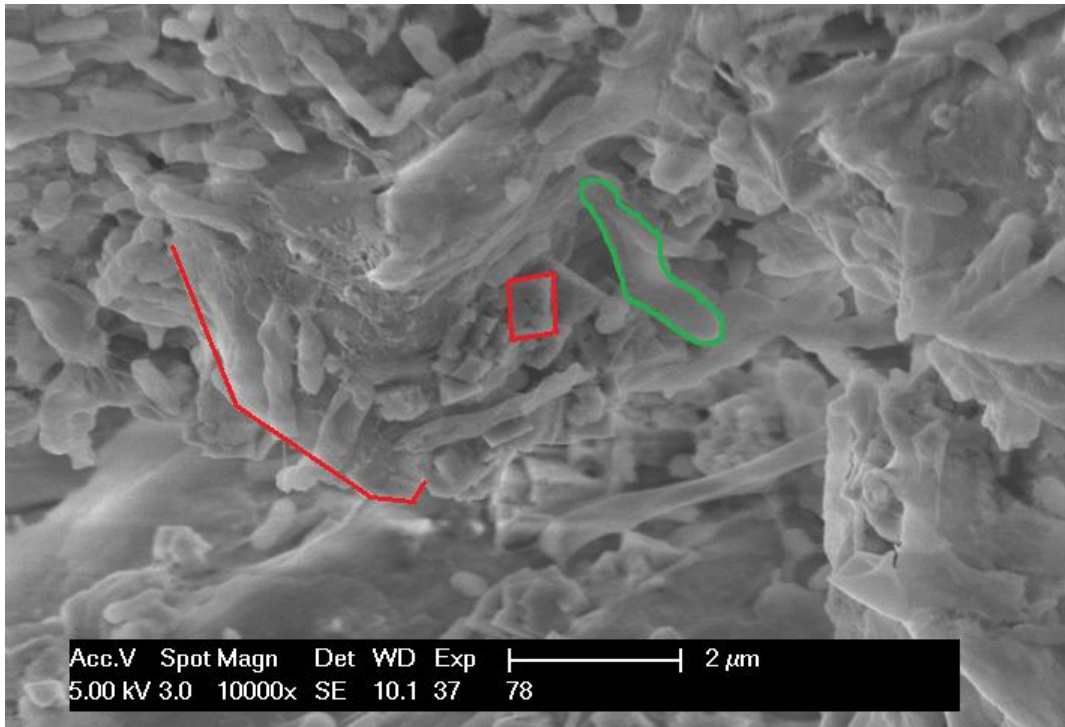
**Abbildung 14** REM Bild. Zahnsteinbrocken von Gruppe 3 (Spray#3) der Versuchsreihe 2. Scharfe, kantige, kristalline Strukturen (rot) sind dominant vorhanden. Runde, weiche, organische Strukturen (grün) kommen nur vereinzelt vor.



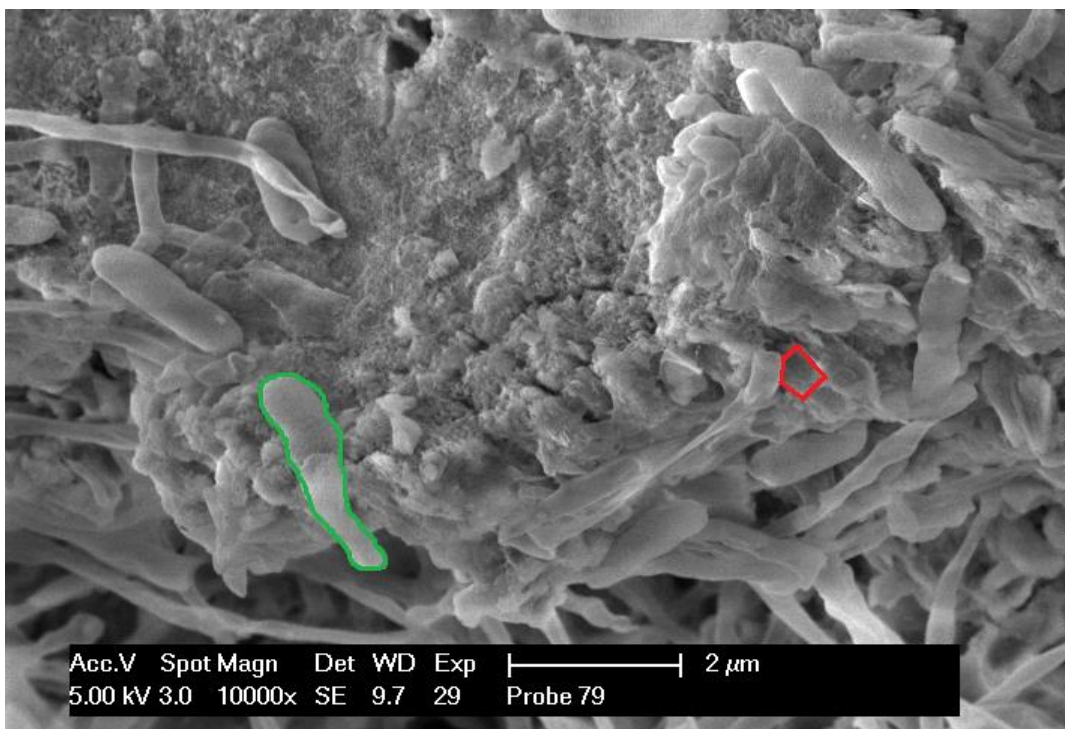
**Abbildung 15** REM Bild. Zahnsteinbrocken von Gruppe 4 (Spray#4) der Versuchsreihe 2. Runde, weiche, organische Strukturen (grün) sind häufiger vertreten. Scharfe, kantige, kristalline Strukturen (rot) erscheinen selten. Es wirkt, als würden die kristallinen Strukturen von den organischen bedeckt.



**Abbildung 16** REM Bild. Zahnsteinbrocken von Gruppe 5 (Spray#5) der Versuchsreihe 2. Runde, weiche, organische Strukturen (grün) sind häufiger vertreten. Scharfe, kantige, kristalline Strukturen (rot) sind verschwindend gering vorhanden.



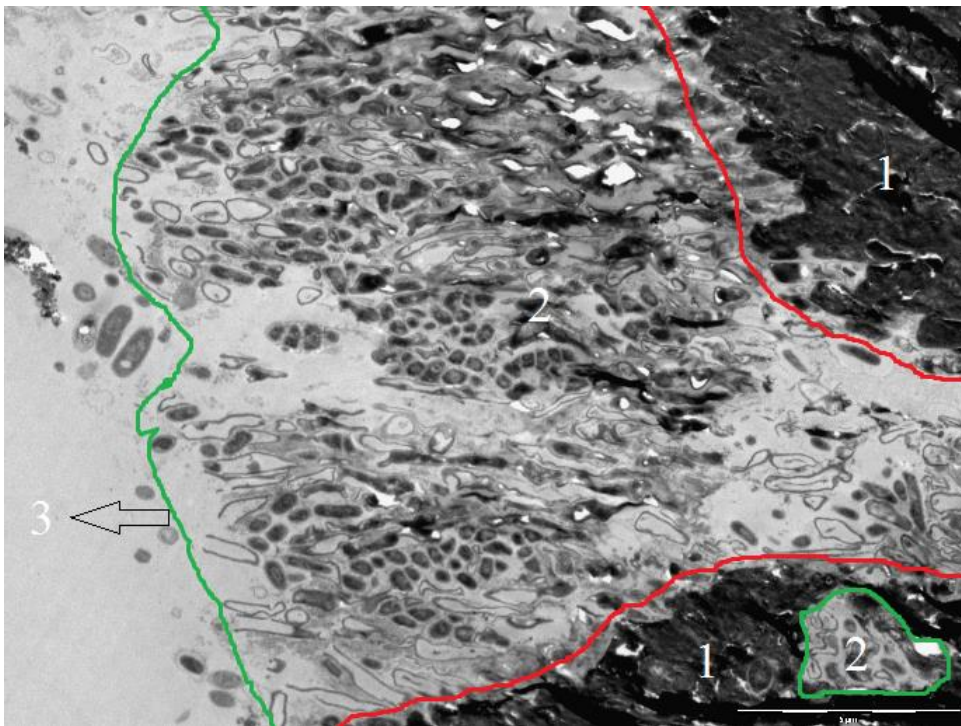
**Abbildung 17** REM Bild. Zahnsteinbrocken von Gruppe 6 (theranovis® oral Spray) der Versuchsreihe 2. Runde, weiche, organische Strukturen (grün) und scharfe, kantige, kristalline Strukturen (rot) sind annähernd gleich stark vertreten.



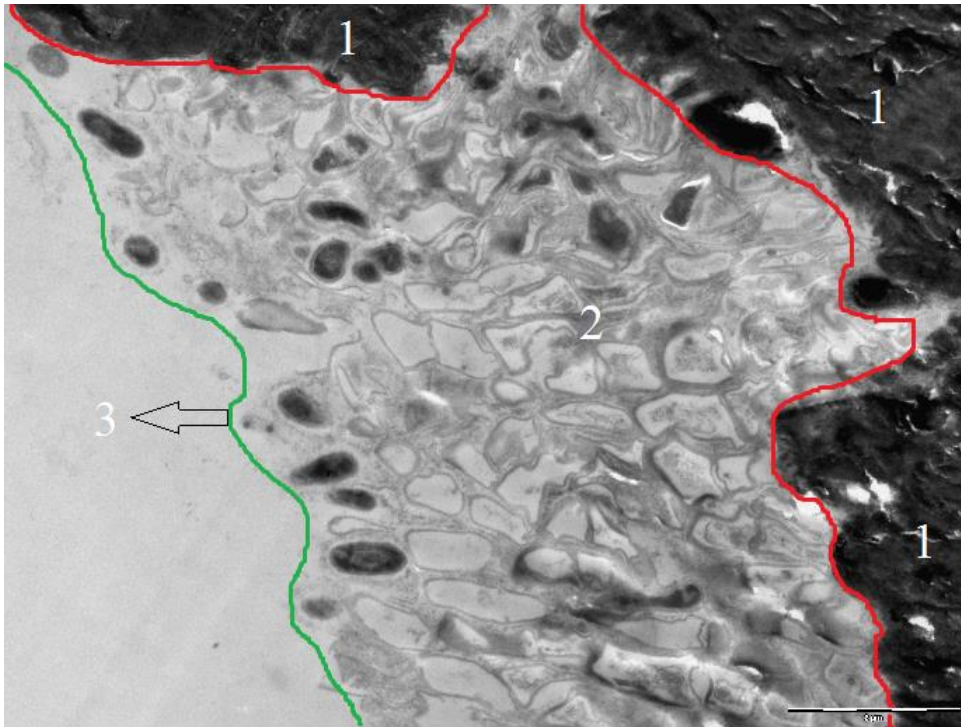
**Abbildung 18** REM Bild. Zahnsteinbrocken von Gruppe 7 (Leitungswasser) der Versuchsreihe 2. Runde, weiche, organische Strukturen (grün) sind häufiger vertreten. Scharfe, kantige, kristalline Strukturen (rot) kommen nur vereinzelt vor.

#### 4.4 TEM-Bilder

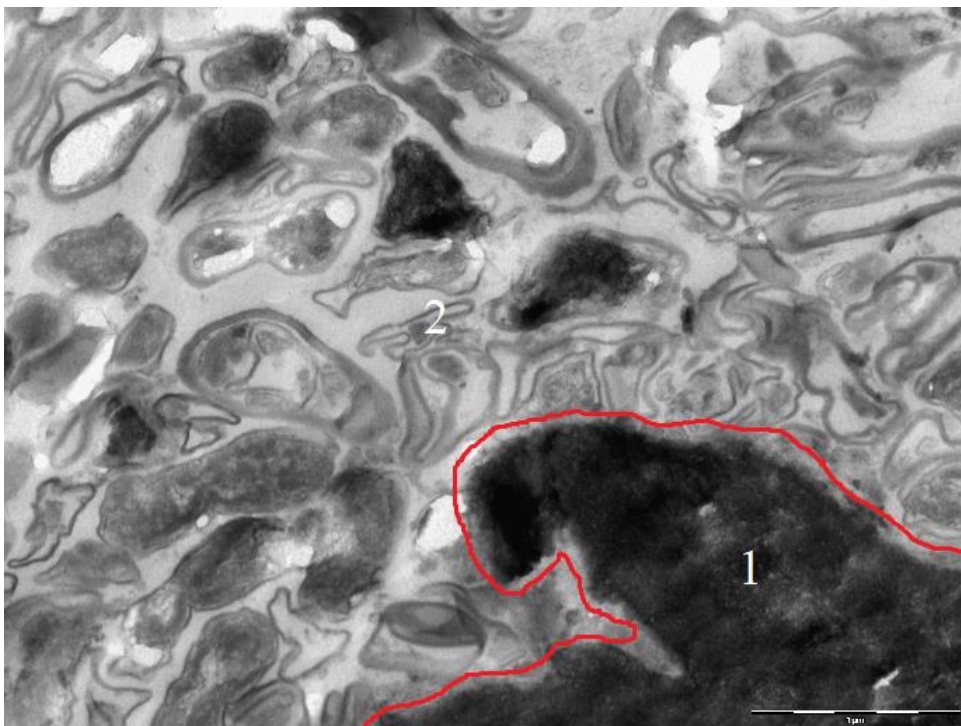
Beim Vergleich der TEM-Bilder fallen zwei Unterschiede zwischen den Zahnsteinbrocken von Gruppe 1 und Gruppe 2 auf. Zum einen wird die Zahnsteinoberfläche bei den Zahnsteinproben aus Gruppe 1 von dem bakterienreichen Anteil gebildet ( Abbildung 19 und 20 ), bei den Zahnsteinproben von Gruppe 2 meist hingegen von dem kristallinen Anteil ( Abbildung 23 und 24 ). Hier fehlt vermehrt der bakterienreiche Anteil an der Oberfläche. Ein weiterer Unterschied ist, dass der bakterienreiche Anteil von den Zahnsteinproben aus Gruppe 2 ( Abbildung 22, 24 und 25 ) im Vergleich zu Gruppe 1 ( Abbildung 19, 20 und 21 ) weniger dicht ist, es ist aufgelockert. Diese Auflockerung des organischen Anteils erkennt man in Abbildung 25 und 26 auch an tieferen Schichten.



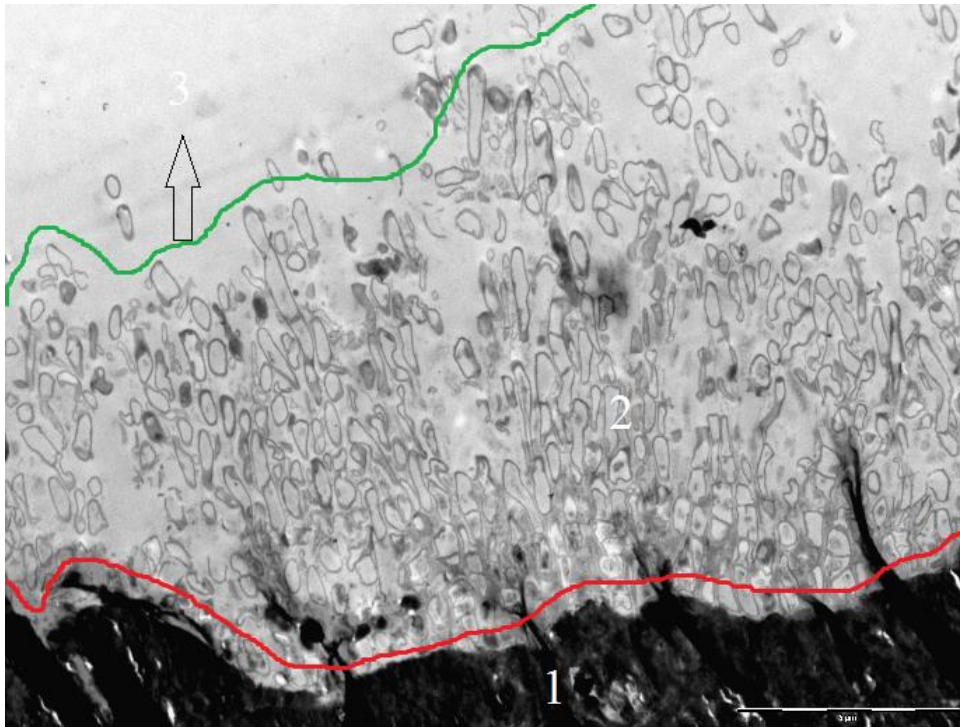
**Abbildung 19** TEM-Bild, 4.800x. Zahnsteinbrocken der Gruppe 1 (Wasser) der 3. Versuchsreihe. 1: Bakterienarmer, kristallreicher Anteil; 2. Bakterienreicher Anteil, bildet hier nach außen gleichzeitig die Zahnsteinoberfläche; 3. Zahnsteinoberfläche.



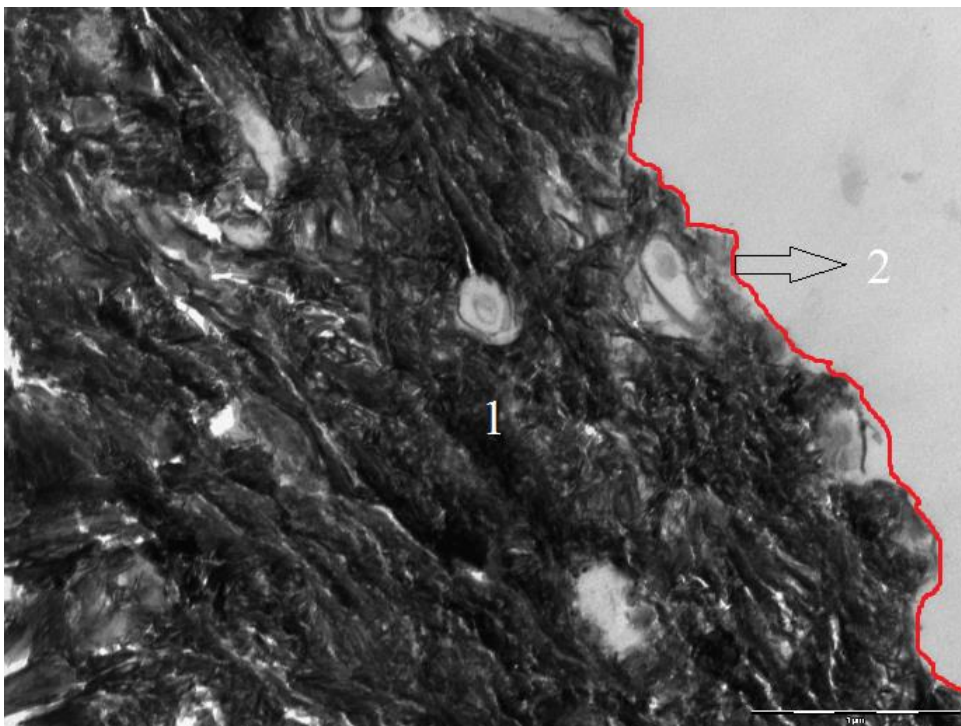
**Abbildung 20** TEM-Bild, 9.300x. Zahnsteinbrocken der Gruppe 1 (Wasser) der 3. Versuchsreihe. 1: Bakterienarmer, kristallreicher Anteil; 2. Bakterienreicher Anteil, bildet hier nach außen gleichzeitig die Zahnsteinoberfläche; 3. Zahnsteinoberfläche.



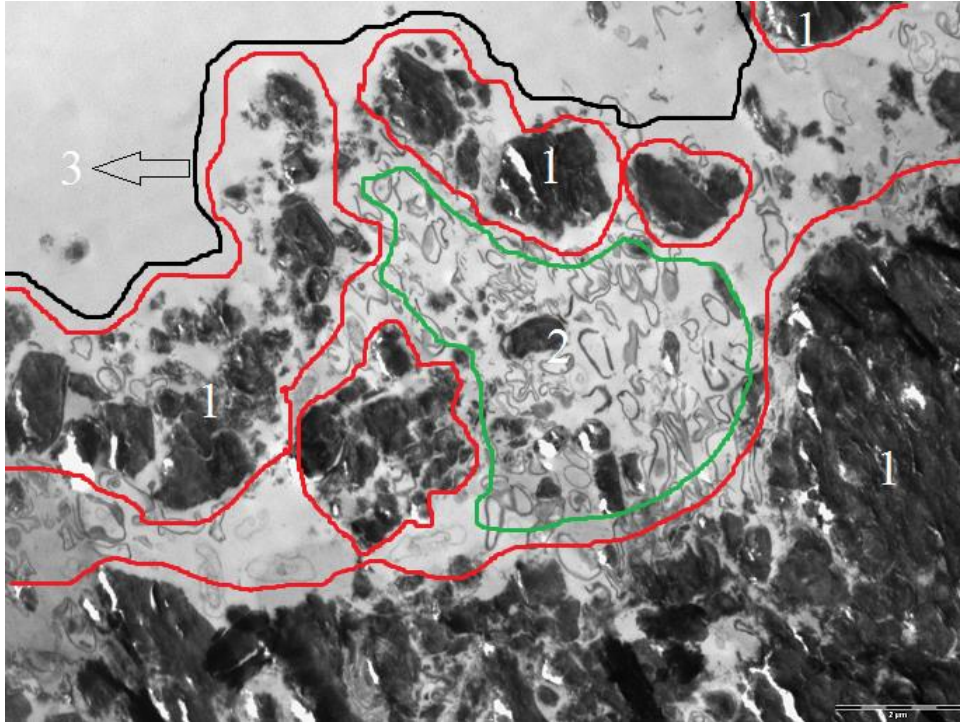
**Abbildung 21** TEM-Bild, 23.000x. Zahnsteinbrocken der Gruppe 1 (Wasser) der 3. Versuchsreihe. 1: Bakterienarmer, kristallreicher Anteil; 2. Bakterienreicher Anteil.



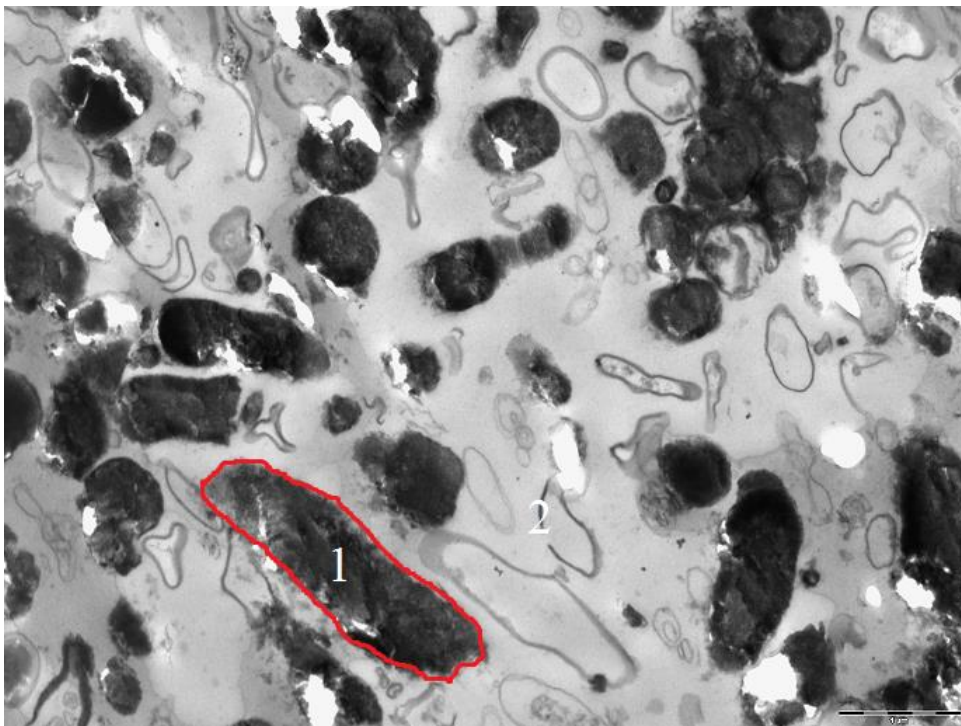
**Abbildung 22** TEM-Bild, 4.200x. Zahnsteinbrocken der Gruppe 2 (theranovis® oral Spray) der 3. Versuchsreihe. 1: Bakterienarmer, kristallreicher Anteil; 2: Bakterienreicher Anteil, bildet hier nach außen gleichzeitig die Zahnsteinoberfläche; 3: Zahnsteinoberfläche.



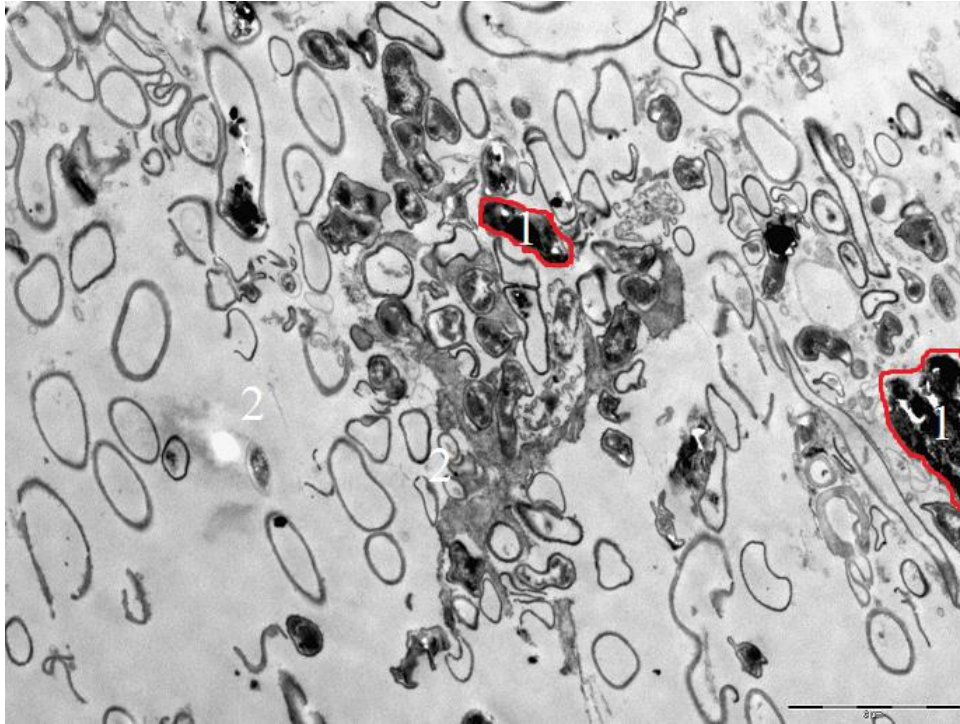
**Abbildung 23** TEM-Bild, 23.000x. Zahnsteinbrocken der Gruppe 2 (theranovis® oral Spray) der 3. Versuchsreihe. 1: Bakterienarmer, kristallreicher Anteil bildet hier nach außen gleichzeitig die Zahnsteinoberfläche; 2: Zahnsteinoberfläche.



**Abbildung 24** TEM, 6.000x. Zahnsteinbrocken der Gruppe 2 (theranovis® oral Spray) der 3. Versuchsreihe. 1: Bakterienarmer, kristallreicher Anteil bildet hier nach außen gleichzeitig die Zahnsteinoberfläche; 2. Bakterienreicher Anteil; 3. Zahnsteinoberfläche.



**Abbildung 25** TEM, 13.000x. Zahnsteinbrocken der Gruppe 2 (theranovis® oral Spray) der 3. Versuchsreihe. 1: Kristalliner Anteil. 2: Bakterienreicher, organischer Anteil.



**Abbildung 26** TEM-Bild, 9.300x. Zahnsteinbrocken der Gruppe 2 (theranovis® oral Spray) der 3. Versuchsreihe. 1. Kristalline Anteile, eingebettet in einer sich hier heller darstellenden organischen Matrix; 2: Bakterienreicher Anteil.



## **5 Diskussion**

### **5.1 Diskussion der Zusammensetzung der Lösungen in der 1. Versuchsreihe**

Die Festlegung der einzelnen Lösungen in den jeweiligen Gruppen zielte vorwiegend darauf ab, abzuklären, ob bei der eventuell vorhandenen Wirkung von theranovis® oral gegen Zahnstein biochemische Vorgänge eine bestimmende Rolle spielen. Hierfür diente zum einen die Lösung der Gruppe 2 (Speichel + theranovis® oral) mit den vorhandenen Proteinen aus dem Speichel und den Kernölen und Kräuterextrakten, zum anderen die Lösung aus Gruppe 5 (Speichel + theranovis® oral + Protease Inhibitor) bei der diese Proteine durch den Protease Inhibitor zusätzlich in ihrer Funktion ungehindert waren, da proteolytische Aktivitäten von vorhandenen Proteasen durch den Protease Inhibitor inhibiert werden. Die Lösung aus Gruppe 4 (Speichel + theranovis® oral + Proteinase) diente hingegen als Gegenspieler hierzu, da die vorhandenen Proteine durch die Proteinase mit einer Konzentration von 100µg/ml inhibiert worden. Mit der Lösung aus Gruppe 3 (Leitungswasser + theranovis® oral + Proteinase) hatte man eine Referenzgruppe zur Gruppe 4 um eventuell vorhandene Effekte der Proteinase selbst festzuhalten bzw. auszuschließen. Mit der Lösung von Gruppe 1 (Leitungswasser + theranovis® oral) hatte man eine Lösung bei der sich die Wirkung von theranovis® oral alleine zeigen kann, ohne Einbindung biochemischer Prozesse mit den Speichelproteinen. Die Gruppe 6 mit Leitungswasser diente in dieser Versuchsreihe als Hauptreferenzgruppe bezüglich einer eventuell vorhandenen Wirkung von theranovis® oral gegen Zahnstein.

### **5.2 Diskussion der Durchführung der 1. Versuchsreihe**

Die 1. Versuchsreihe lief über 12 Wochen. Solche Versuchszeiträume wurden bei den meisten Untersuchungen von Produkten bezüglich deren Wirkung gegen Zahnstein gewählt, so zum Beispiel von Triratana et al. (Triratana et al., 1991) und von Schaeken und van der Hoeven (Schaeken and van der Hoeven, 1993). Zudem gibt der Hersteller von theranovis® oral an, dass der Zahnstein bei konsequenter Anwendung nach 2-6 Wochen vollständig verschwindet. Die Rahmenbedingungen wurden bei dieser Durchführung, so fern möglich, so gewählt wie sie auch in vivo vorkommen. Die Wirkung erfolgte bei einer Umgebungstemperatur von 37°C, wie sie auch beim Gesunden in der Mundhöhle herrscht. Die mechanische Belastung wurde der im Alltag vorkommenden nachempfunden. Das tägliche Putzen mit einer handelsüblichen Zahnbürste für 5-10 Sekunden pro Zahn entspricht den Verhältnissen wie sie auch beim täglichen Zähneputzen vorkommen (Naseem et al., 2017) bzw. empfohlen werden (Van der Weijden et al., 1993) und (Hawkins et al., 1986), desweiteren die regelmäßige Abformung

mit Impregum, was ebenfalls eine mechanische Belastung darstellt, wie sie im Alltag bei der Mastikation vorkommt, zum Beispiel beim Essen eines Toffee.

### **5.3 Diskussion der Dokumentation in der 1. Versuchsreihe**

Die Dokumentation erfolgte in visueller Form. Zum einen über die Fotodokumentation mit den Bildern, zum anderen über die Volumendokumentation durch die ausgegossenen Abformungen. Diese wurden in Kombination gewählt, da man Veränderungen oberflächlicher Natur so festhalten und im Nachhinein auswerten kann. Die Fotodokumentation und Abformung am Anfang und Ende diente hierbei als Hauptdokumentation der Wirkung der einzelnen Lösungen. Die weiteren Dokumentationen im Verlaufe des Versuches dienten zur Verlaufsdokumentation, im Falle von eindeutigen Unterschieden in den Ergebnissen zur weiteren Differenzierung, was hier jedoch nicht der Fall war.

### **5.4 Diskussion des Scoring**

Aufgrund der Tatsache, dass es sich in der 1. Versuchsreihe zum einen um unterschiedliche Zähne und zum anderen um extrahierte Zähne handelte, liess sich hier der Volpe-Manhold-Score (Volpe et al., 1965), der sehr häufig in der Literatur bezüglich zahnsteinhemmender Wirkung von Produkten Verwendung fand, so zum Beispiel von Lobene et al., Singh und in zahlreichen weiteren Studien (Lobene et al., 1987; Singh, 1988), nicht anwenden. Bei diesem Score handelt es sich um eine Möglichkeit mit Zahnstein bedeckte Frontzähne des Unterkiefers im Mund durch objektive Längenmessung einzustufen. Eine weitere Möglichkeit der Bewertung ist ein auf visuellen Eindrücken basierendes Scoring, welches das Zahnsteinvorkommen prozentual einteilt. Ein derartiges Scoring wurde von A. Gaffar et al. 1983 bei der Untersuchung von EDITEMPA und Zahnsteinbildung durchgeführt (Gaffar et al., 1983).

Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Scoring wurde das Zahnsteinvorkommen vom Anfangszustand und Endzustand, welches mit der Fotodokumentation und den mit Gips ausgegossenen Abformungen festgehalten wurde, ebenfalls nach visueller Auswertung prozentual eingeteilt. Abhängig von der prozentualen Einteilung ergab sich der entsprechende Score. Eine derartige Einteilung birgt das Risiko der Subjektivität. Um dieses Risiko möglichst klein zu halten, wurden die einzelnen Prozentintervalle bis zum Erreichen des nächsten Scores so festgelegt, dass sie bei den Randscores Score 1, Score 4 und Score 5 eng gewählt wurden, und zwar wurde hier eine prozentuelle Bandbreite von 10% gewählt. Bei dem Score 2 und Score 3 hingegen wurde eine Bandbreite von 30% bzw. 40% gewählt. Durch diese Auswahl der Bandbreiten sollte der Subjektivitätsfaktor möglichst innerhalb von Score 2 und

Score 3 bleiben, und zudem bekommen Score 1, Score 4 und Score 5 so eine stärkere Aussagekraft. Mit einem so gewählten Scoring lässt sich besonders eine Ja-Nein-Entscheidung gut treffen. Quantitative Unterschiede aber lassen sich bei einem solchen Scoring nicht festhalten. Eine gewisse Anzahl an Scores jedoch wurde benötigt, um eventuelle Unterschiede zwischen den Gruppen darzustellen, worauf diese Versuchsreihe ebenfalls abzielte.

### **5.5 Diskussion der statistischen Auswertung**

Die statistische Auswertung ermöglicht einen direkten Vergleich der einzelnen Gruppen um Unterschiede darzustellen. Da das Scoring keinen Wertungsfaktor beinhaltet, hat bei den Mittelwerten der Medianwert höhere Aussagekraft. Dieser ist auch stabiler gegenüber Ausreißern. Der Kruskal-Wallis-Test erlaubt eine Aussage darüber zu treffen, in wie weit sich die Verteilung der Scores in den einzelnen Gruppen voneinander unterscheiden. Eine Aussage hierüber ist wichtig, um eine grundlegende Aussage über die Wirkung von theranovis® oral machen zu können. Deswegen wurde dieser Test zur statistischen Auswertung herangezogen. Er hat innerhalb der statistischen Auswertung die stärkste Aussagekraft.

### **5.6 Diskussion der Gewichtsmessung**

In der Literatur sind Methoden beschrieben, bei denen das Gewicht von Zahnstein gemessen wurde, um die Wirkung eines Stoffes gegen Zahnstein zu untersuchen. So untersuchten Scruggs et al. 1991 die Wirkung von 7 Zahnpasten, welche unter anderem Zinkzitat enthielten, gegen Zahnstein. Dazu werteten sie das Trockengewicht nach einstündigem Trocknen des Zahnsteins bei 110 ° und das Aschegewicht nach langsamen Hochfahren der Temperatur auf 600 ° C aus (Scruggs et al., 1991). Die selbe Methode wurde von Disney et al. bei der Untersuchung von 6 Zahnpasten und deren Wirkung auf Zahnstein angewandt (Disney et al., 1989). Bei der hier durchgeführten Gewichtsmessung wurde der Zahnstein luftgetrocknet, da keine Hitzewirkung auf den Zahnstein entstehen sollte. Diese Hitzewirkung nämlich hätte eventuell strukturelle Veränderungen am Zahnstein zur Folge gehabt und die REM-Untersuchungen beeinflusst.

### **5.7 Diskussion der Ergebnisse**

Die Ergebnisse aus den hier durchgeführten Versuchsreihen sind bezüglich ihrer Aussage über die Wirkung von theranovis® oral gegen Zahnstein different. Dieser Unterschied jedoch lässt sich zum einen darauf zurückführen, dass innerhalb der einzelnen Lösungen der unterschiedlichen Versuchsreihen auf unterschiedliche Komponenten Wert gelegt wurde. Das Au-

## Diskussion

genmerk wurde auf mögliche unterschiedliche aktive Komponenten gelegt. Bezüglich dieses Aspektes unterscheidet sich die 1. Versuchsreihe von den anderen. In der 1. Versuchsreihe wurde die Zielstellung auf die Speichelproteine als mögliche Einflussfaktoren gelegt. Bei den weiteren Versuchsreihen hingegen lag der Schwerpunkt bei den einzelnen Inhaltstoffe von theranovis® oral und deren Konzentrationen. Die Speichelproteine konnten in der 1. Versuchsreihe nicht als Einflussfaktoren identifiziert werden.

Ein weiterer Grund für diese Differenz kann in der unterschiedlichen Methodik liegen, mit der die gewonnenen Ergebnisse ausgewertet wurden. Bei der 1. Versuchsreihe erfolgte die Dokumentation durch visuelle Eindrücke im Rahmen dessen, was das menschliche Auge sehen kann. Dies ist nur oberflächlich. Zudem erfolgte das Scoring. Und um nach diesem Scoring Rückschlüsse auf die Wirkung und den Wirkmechanismus von theranovis® oral treffen zu können, müssten sich Unterschiede bezüglich der Scoreverteilung zwischen den einzelnen Gruppen zeigen. Würde sich ein solcher Unterschied zeigen, könnte man eine qualitative Aussage treffen, ob theranovis® oral in der entsprechenden Lösung eine sichtbar stärkere Wirkung gegen Zahnstein zeigt oder nicht. Man kann somit eine Ja-Nein-Aussage machen. Spezifischere Aussagen über quantitative Unterschiede einer eventuell vorhandenen Wirkung kann mit dieser Methode schlecht sichtbar gemacht werden, da das Scoring durch subjektiv wahrgenommene, oberflächliche visuelle Eindrücke getroffen wird. Hinzu kommt noch, dass aufgrund dieses subjektiven Charakters große Bandbreiten für die mittleren Scores gewählt wurden, und dies eine feinere Differenzierung nicht zulässt. Die graphische Darstellung der Scores in den einzelnen Gruppen zeigt keine deutlichen Unterschiede innerhalb der Gruppen. Wobei Gruppe 4 die einzige Gruppe ist, bei der Score 1 nicht vorkommt, und Gruppe 5, Referenzgruppe der Gruppe 4, ist die einzige Gruppe bei der Score 5 nicht vorkommt, was dafür spricht, dass biochemische Faktoren mit den Speichelproteinen eine Rolle spielen könnten. Statistisch jedoch hat dieser Unterschied keine Aussagekraft. Der aussagekräftigere Kruskal-Wallis-Test ergibt, dass man davon ausgehen kann, dass die Scoreverteilung über alle Gruppen hinweg identisch ist. Diese Aussage jedoch beruht wohlgerne auf dem nicht feiner differenzierten Scoring oberflächlicher visueller Eindrücke. Nach diesem Scoring lässt sich eine Ja – Nein – Entscheidung zwar treffen, jedoch bringt es bei negativer Aussage, wie es hier der Fall ist, eine große Ungenauigkeit mit sich. Dieser Zusammenhang würde erklären, warum auch die Referenzgruppe mit dem Leitungswasser in dieser Versuchsreihe keinen Unterschied zeigte, auch wenn theranovis® oral eine Wirkung gegen Zahnstein hat. Vor diesem Hintergrund kann auch erklärt werden, warum keine ersichtlichen Unterschiede bei der Gewichtsmessung detektiert wurden. Die hervorgerufenen Unterschiede könnten einfach in an-

deren Dimensionen der Einheit gelegen haben. Zumal hier die Tatsache eine wesentliche Rolle spielen wird, dass es keine mechanische Behandlung der Zahnsteinproben gab. Die Methodik der Dokumentation im Rahmen der Mikroskopie ist viel feiner als die Fotodokumentation und die Gewichtsmessung. Diese Methodik hat bezüglich der Aussagekraft bezugnehmend auf die Frage der Wirkung von theranovis® oral gegen Zahnstein daher eine stärkere Aussagekraft.

Ein weiterer Unterschied zwischen 1. Versuchsreihe und den anderen Versuchsreihen liegt in der Herkunft der verwendeten Zahnsteinproben. Bei den Zahnsteinproben aus der 1. Versuchsreihe handelte es sich nicht um frischen Zahnstein, sondern um älteren Zahnstein, welcher längere Zeit in Thymol bzw. Alkohol gelagert war. Eine mögliche Wirkung dieser Substanzen auf Zahnstein könnte ebenfalls eine Beeinflussung darstellen, und wäre bei den frisch gewonnenen Zahnstein aus den übrigen Versuchsreihen nicht vorhanden.

Die Ergebnisse aus der genaueren Methodik der Mikroskopie und den Versuchsreihen, bei denen das Augenmerk auf die Inhaltsstoffe von theranovis® oral gelegt wurde, zeigen deutlich strukturelle Veränderungen des Zahnsteins. Und zwar wird der organische Anteil des Zahnsteins nach der Einwirkzeit der Testlösungen desto geringer, je höher die Konzentration der ätherischen Öle ist. Dies zeigen die mikroskopischen Bilder. Das Rasterelektronenmikroskop wurde herangezogen, um die oberflächlichen Strukturveränderungen an Zahnstein durch die Wirkung der einzelnen Lösungen zu untersuchen. In einer Studie von Le Geros et al. aus dem Jahre 2003 konnten Unterschiede an Zahnstein so erkannt werden (LeGeros et al., 2003). Zudem nutzte Gaengler 1993 das REM für mikromorphologische Untersuchungen am Zahnstein (Gaengler et al., 1993).

Um die Beobachtungen im REM zu validieren und Veränderungen in tieferen Anteilen des Zahnsteins zu untersuchen, wurde weiter das TEM herangezogen, da sich mit Hilfe des TEM an den Ultradünnschnitten Strukturveränderungen auch in der Tiefe vergleichen lassen .

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen sich nicht direkt mit Ergebnissen anderer in der Literatur publizierter Studien vergleichen. Dies liegt daran, dass in der Literatur bisher keine Studien zu Produkten ähnlich wie theranovis® oral gibt, bei denen die Methodik der vorliegenden Studie entspricht. Sehr wohl jedoch lassen sich indirekt die Ergebnisse einiger Studien mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie vergleichen. So zeigten Kohut et al. 1997 in einer Studie, dass eine Zahnpasta mit ätherischen Ölen und einer nur geringen Konzentration von 1,3 % Pyrophosphat eine Wirkung gegen Zahnstein besitzt (Kohut et al., 1997). 2003 stellten zudem LeGeros et al. dar, dass eine Mundspüllösung mit ätherischen Ölen und Zinkchlorid einen antimikrobiellen Effekt hat und die Bildung von Dikalziumphos-

phatdihydrat, das löslichste Kalziumphosphat, begünstigt (LeGeros et al., 2003). Santos et al. untersuchten eine Zahnpasta mit ätherischen Ölen und Zinkziträt und kamen zu Ergebnissen, die für eine Wirkung gegen Zahnstein sprechen (Santos et al., 2000) . Von diesen Studien jedoch hebt sich die hier vorliegende Studie dahingehend ab, dass in dem untersuchten Produkt theranovis® oral nur ätherische Öle enthalten sind. Bei den anderen zuvor erwähnten Studien von Kohut et al., LeGeros et al. und Santos et al. spielten die ätherischen Öle nur eine Nebenrolle. Die ätherischen Öle wurden stets in Kombination mit Pyrophosphaten oder Zinksalzen untersucht. Zudem wurde die Wirkung auf die Bildung des Zahnsteins untersucht und nicht die Wirkung auf bestehenden Zahnstein, wie es in der hiesigen Studie der Fall ist.

### **5.8 Zusammenfassende Bewertung**

Durch die Versuchsreihen dieser Studie konnten erstmals wissenschaftliche Erkenntnisse über die Wirkung von theranovis® oral gegen Zahnstein gewonnen werden. Die statistische Auswertung des Scoring aus der 1. Versuchsreihe lässt keine Aussage bezüglich der Wirkung von theranovis® oral gegen Zahnstein zu. Des Weiteren kann man aus der statistischen Auswertung ableiten, dass biochemische Aspekte in Kontakt mit Speichelproteinen bei der Wirkung von theranovis® oral unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Rolle spielen. Für spezifischere Schlussfolgerungen aus der 1. Versuchsreihe bedarf es weiterer differenzierterer Untersuchungen mit Analysemethoden, die eine Quantifizierung zulassen. Teile der Schlussfolgerung aus der 1. Versuchsreihe konnten auch mit der Gewichtsmessung aus der 2. Versuchsreihe bestätigt werden, bei der keine messbaren Veränderungen gefunden wurden. Sehr wohl aber zeigt theranovis® oral durch seine Wirkung strukturelle Veränderungen des Zahnsteins. Dies ergaben die REM- und TEM-Untersuchungen. Bei beiden mikroskopischen Untersuchungen konnten die selben Veränderungen beobachtet werden. In beiden Untersuchungen zeigte sich der organische Anteil des Zahnsteins aufgelockert bis hin zur vollständigen Auflösung an der Oberfläche des Zahnsteins. Dadurch, dass sich der ‚organische Rasen‘ aufgelockert zeigte, kamen die kristallinen Anteile vermehrt zum Vorschein. Die REM - Bilder der 2. Versuchsreihe zeigten dieses Phänomen in unterschiedlicher Intensität, abhängig von der verwendeten Lösung. Bei den Proben, die mit Spray#1, Spray#2 und Spray#3 behandelt wurden, zeigte es sich in aufsteigender Intensität. Bei den Proben die in Spray#4, Spray#5 und Leitungswasser exponiert waren zeigte sich dieses Phänomen nicht. Bei den Proben mit theranovis® oral hingegen schon, aber nicht in der Intensität wie bei Spray#1, Spray#2 und Spray#3. Die Wirkungsintensität steht hierbei in direkter Abhängigkeit zu der Konzentration der ätherischen Öle: Je höher die Konzentration, desto stärker die Wirkung.

Diese Beobachtungen aus den REM- und TEM-Bildern zeigen, dass sich die Struktur des Zahnsteines durch die Wirkung von theranovis® oral derart verändert, dass der „organische Klebstoff“ aufgelöst wird. Dies könnte durchaus zu einem veränderten Verhalten gegenüber mechanischer Belastung führen. Um dies zu untersuchen, bedarf es weiterer Untersuchungen mit Methoden, mit denen man spezifische Aussagen treffen kann bezüglich der Wirkintensität. Klinische Studien mit einem Studiendesign wie bei Sowinski et al. (Sowinski et al., 1998) erlauben solche Aussagen. Bei dieser Studie handelt es sich um eine klinische Doppelblindstudie mit einem Verlauf über 12 Wochen, bei der die Wirkung gegen Zahnstein mit Hilfe des Volpe – Manhold – Scoring festgehalten wird. Solche In – vivo – Studien zeigen differenzierte Ergebnisse und erfassen auch Wirkungen, die bei der Zahnsteinbildung eine Rolle spielen könnten. Die in der vorliegenden Studie gezeigten strukturellen Veränderungen könnten nämlich auch eine wichtige Rolle bei der Zahnsteinbildung spielen. Bei weiterführenden Studien bezüglich theranovis® oral und dessen Wirkung gegen Zahnstein sollte das Augenmerk auf die einzelnen Inhaltsstoffe und deren Konzentrationen gelegt werden.

### **5.9 Schlussfolgerungen**

Unter den gewählten Versuchsbedingungen war im Rahmen der vorliegenden In – vitro – Studie im Vergleich zu Wasser eine Zahnstein entfernende Wirkung von theranovis® oral nicht nachweisbar. Die elektronenmikroskopischen Analysen zeigen jedoch, dass theranovis® oral die organischen Komponenten des Zahnsteins an- bzw. auflösen kann.

Zur validen Einschätzung der potentiell Zahnstein modulierenden Wirkung von theranovis® oral sind weiterführende ( klinische ) Studien erforderlich.

## **6 Literaturverzeichnis**

1. Ainamo J (1970) Concomitant periodontal disease and dental caries in young adult males. *Suom Hammaslaak Toim* 66:303-366
2. Barbakow F, Imfeld T (1989) [Dental calculus-inhibiting tooth pastes and mouthwashes. A review of the literature of clinical trials]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 99:902-906
3. Charles CH, Cronin MJ, Conforti NJ, Dembling WZ, Petrone DM, McGuire JA (2001) Anticalculus efficacy of an antiseptic mouthrinse containing zinc chloride. *J Am Dent Assoc* 132:94-98
4. Chikte UM, Rudolph MJ, Reinach SG (1992) Anti-calculus effects of dentifrice containing pyrophosphate compared with control. *Clin Prev Dent* 14:29-33
5. Davey HP, Embery G, Cummins D (1997) Interaction of zinc with a synthetic calcium phosphate mineral. *Caries Res* 31:434-440
6. Disney JA, Graves RC, Cancro L, Payonk G, Stewart P (1989) An evaluation of 6 dentifrice formulations for supragingival anticalculus and antiplaque activity. *J Clin Periodontol* 16:525-528
7. Friskopp J, Isacson G (1984) A quantitative microradiographic study of mineral content of supragingival and subgingival dental calculus. *Scand J Dent Res* 92:25-32
8. Gaengler P, Kurbad A, Weinert W (1993) Evaluation of anti-calculus efficacy. An SEM method of evaluating the effectiveness of pyrophosphate dentifrice on calculus formation. *J Clin Periodontol* 20:144-146
9. Gaffar A, Moreno EC, Muhlemann HR, Niles HP (1983) Effects of EDITEMPA on dental calculus and caries formation in vivo. *Calcif Tissue Int* 35:362-365



## Literaturverzeichnis

10. Hannig C, Becker K, Hausler N, Hoth-Hannig W, Attin T, Hannig M (2007) Protective effect of the in situ pellicle on dentin erosion - an ex vivo pilot study. Arch Oral Biol 52:444-449
11. Hawkins BF, Kohout FJ, Lainson PA, Heckert A (1986) Duration of toothbrushing for effective plaque control. Quintessence Int 17:361-365
12. Hidaka S, Abe K, Liu SY (1993a) In vitro and in vivo evaluations of Chinese traditional (kampo) medicines as anticalculus agents in the rat. Arch Oral Biol 38:327-335
13. Hidaka S, Abe K, Takeuchi Y, Liu SY (1993b) Inhibition of the formation of oral calcium phosphate precipitates: beneficial effects of Chinese traditional (kampo) medicines. J Periodontal Res 28:27-34
14. Hidaka S, Okamoto Y, Ishiyama K, Hashimoto K (2008) Inhibition of the formation of oral calcium phosphate precipitates: the possible effects of certain honeybee products. J Periodontal Res 43:450-458
15. Jin Y, Yip HK (2002) Supragingival calculus: formation and control. Crit Rev Oral Biol Med 13:426-441
16. Kazmierczak M, Mather M, Ciancio S, Fischman S, Cancro L (1990) Clinical evaluation of anticalculus dentifrices. Clin Prev Dent 12:13-17
17. Kohut BE, Yu D, Hovliaras-Delozier C (1997) Anticalculus efficacy of an essential oil dentifrice containing 1.3% pyrophosphate ion. J Clin Dent 8:138-141
18. Larsen MJ, Pearce EI (2003) Saturation of human saliva with respect to calcium salts. Arch Oral Biol 48:317-322
19. LeGeros RZ, Rohanizadeh R, Lin S, Mijares D, LeGeros JP, Charles CH, et al. (2003) Dental calculus composition following use of essential-oil/ZnCl<sub>2</sub> mouthrinse. Am J Dent 16:155-160

## Literaturverzeichnis

20. Lobene RR, Soparkar PM, Newman MB, Kohut BE (1987) Reduced formation of supragingival calculus with use of fluoride-zinc chloride dentifrice. *J Am Dent Assoc* 114:350-352
21. Mukherjee S (1969) An in vitro study of anti-calculus agents. *J Periodontal Res* 4:26-35
22. Naseem S, Fatima SH, Ghazanfar H, Haq S, Khan NA, Mehmood M, et al. (2017) Oral Hygiene Practices and Teeth Cleaning Techniques Among Medical Students. *Cureus* 9:e1487
23. Parfitt GJ (1960) A survey of the oral health of Navajo Indian children. *Arch Oral Biol* 1:193-205
24. Santos SL, Conforti N, Mankodi S, Kohut BE, Yu D, Wu MM, et al. (2000) Anticalculus effect of two zinc citrate/essential oil-containing dentifrices. *Am J Dent* 13:11C-13C
25. Schaeken MJ, van der Hoeven JS (1993) Control of calculus formation by a dentifrice containing calcium lactate. *Caries Res* 27:277-279
26. Scruggs RR, Stewart PW, Samuels MS, Stamm JW (1991) Clinical evaluation of seven anticalculus dentifrice formulations. *Clin Prev Dent* 13:23-27
27. Segreto VA, Collins EM, D'Agostino R, Cancro LP, Pfeifer HJ, Gilbert RJ (1991) Anticalculus effect of a dentifrice containing 0.5% zinc citrate trihydrate. *Comm Dent Oral Epidemiol* 19:29-31
28. Singh SM (1988) The anticalculus effect of a mouthrinse containing pyrophosphate salts and a copolymer. *Am J Dent* 1:9-11
29. Sowinski J, Petrone DM, Battista G, Petrone ME, DeVizio W, Volpe AR (1998) Clinical comparison of two tartar control dentifrices: a twelve-week study. *J Clin Dent* 9:101-104

## Literaturverzeichnis

30. Stephen KW, Burchell CK, Huntington E, Baker AG, Russell JI, Creanor SL (1987) In vivo anticalculus effect of a dentifrice containing 0.5% zinc citrate trihydrate. *Caries Res* 21:380-384
31. Stookey GK, Warrick JM, Miller LL (1995) Effect of sodium hexametaphosphate on dental calculus formation in dogs. *Am J Vet Res* 56:913-918
32. ten Cate JM (1996) The role of saliva in mineral equilibrium – caries and calculus formation. *Br Dent J*:123-126
33. Theilade J, Schroeder HE (1966) I. Advances in endodontic treatment (concluded). Recent results in dental calculus research. *Int Dent J* 16:205-221
34. Triratana T, Kietprajak C, Banditsing P, Kraiwaphan P (1991) Clinical comparison of anticalculus dentifrices: a three-month study of Thai children and teenagers. *J Clin Dent* 3 Suppl B:B23-25
35. Van der Weijden GA, Timmerman MF, Nijboer A, Lie MA, Van der Velden U (1993) A comparative study of electric toothbrushes for the effectiveness of plaque removal in relation to toothbrushing duration. Timerstudy. *J Clin Periodontol* 20:476-481
36. Volpe AR, Manhold JH, Hazen SP (1965) In Vivo Calculus Assessment. I. A method and its examiner reproducibility. *J Periodontol* 36:292-298
37. White D, Cox E, Suszcynskymeister E, Baig AA (2002) In vitro studies of the anticalculus efficacy of a sodium hexametaphosphate whitening dentifrice. *J Clin Dent* 13:33-37
38. White DJ, Gerlach RW (2000) Anticalculus effects of a novel, dual-phase polypyrophosphate dentifrice: chemical basis, mechanism, and clinical response. *J Contemp Dent Pract* 1:1-19

## **7 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützend begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. M. Hannig, Direktor der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und präventive Zahnheilkunde des Universitätsklinikum des Saarlandes, für die Überlassung des Themas, die hochgeschätzte wissenschaftliche Betreuung und die immer vorhandene Bereitschaft und sich genommene Zeit für die Klärung von Fragestellungen.

Dr. Natalia Umanskaya, wissenschaftliche Mitarbeiterin der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und präventive Zahnheilkunde der Universität des Saarlandes, danke ich für die jeder Zeit vorhandene Bereitschaft der wissenschaftlichen Unterstützung, besonders bei den Vorbereitungen und Durchführungen der Arbeiten im Labor.

Frau Wiebke Hoth-Hannig, MTA der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und präventive Zahnheilkunde der Universität des Saarlandes, danke ich für die kompetente Vorbereitung der TEM - Präparate und dem Mikroskopieren am TEM. Zudem gilt dieser Dank für die Klärung der Fragen, die entstanden während dem Schreiben meiner Dissertation.

Herrn Norbert Pütz, Mitarbeiter der Abteilung für Elektronenmikroskopie (Personalrat des Verwaltungs- und Technischen Personals) der Universität des Saarlandes, danke ich für die kompetente Einführung in die Rasterelektronenmikroskopie.

PD Dr. Stefan Gräber, wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik der Universität des Saarlandes, danke ich für die Betreuung bei der statistischen Auswertung.

Des Weiteren danke ich allen Anderen, die an dieser Stelle nicht namentlich genannt sind und mich mit unterstützender Hand während der Doktorarbeit begleitet haben.


## **8 Anhang**

### **8.1 Inhaltsangabe von theranovis® oral**

Wasser, reine Kernöle, Extrakte aus Kernölen, Alkohol zur Konservierung, pflanzliches Geliermittel (bei theranovis® oral Gel) .

Hersteller ist theranovis GmbH & Co. KG, Am Ockenehimer Graben 23, 55411 Bingen

## 8.2 Herstellerbeschreibung von Proteinase K



### Proteinase K

*From Tritirachium album*  
**Product No. A3830**

---

#### Description

---

<b>Molecular weight:</b>	27000 g/mol
<b>CAS-No.:</b>	[39450-01-6]
<b>HS-No.:</b>	35079090
<b>EINECS:</b>	2544578
<b>E.C.:</b>	3.4.21.14
<b>Solubility (in water, 20°C):</b>	soluble
<b>pH (1 % in water, 20°C):</b>	6.2 - 6.8
<b>Appearance:</b>	white lyophilizate
<b>Activity:</b>	min. 30 mAnsonU/mg
<b>Unit definition:</b>	One milliAnson Unit (mAU) is the activity that releases folin-positive amino acids and peptides corresponding to 1 µmol tyrosine per minute.*
<b>DNases/RNases:</b>	not detectable
<b>pH optimum:</b>	7.5 - 12.0
<b>pI:</b>	8.9
<b>Inactivation (temperature):</b>	> 65°C
<b>Working concentration:</b>	varies from approx. 10 - 100 µg/ml
<b>Stability (+4°C, in solution):</b>	12 months (storage conditions: 50 mM Tris · HCl, pH 8.0, 1 mM CaCl <sub>2</sub> )
<b>Storage:</b>	+4°C (lyophilizate), -20°C single-use aliquots
<b>Safety:</b>	R: 36/37/38-42 / WGK 0 S: 22-24-26-38/37 irritant, sensitizing

**\* Alternative Unit definition:** 1 DMC-unit catalyzes the hydrolysis of 1 µmol dimethyl casein per minute at 25 °C, pH 7.0. The liberated amino groups are determined with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid.

---

#### Comment

Proteinase K belongs to the family of the subtilisin type serine proteases. It shows endo- and exoproteolytic activity. Activated by calcium (1-5 mM), the enzyme cleaves proteins preferably behind hydrophobic amino acids (aliphatic, aromatic and other hydrophobic amino acids). Proteins will be completely digested, if the incubation time is long enough and the protease concentration is high. Temperatures above 65°C or the serine protease inhibitors AEBSF, PMSF or DFP inhibit the activity. Proteinase K is not inactivated by EDTA (see Ref. 5), iodoacetic acid or, interestingly, by other serine protease inhibitors like TLCK and TPCK. Proteinase K is used to destruct proteins in cell lysates (tissue, cultured cells) and to liberate nucleic acids, since it very effectively digests DNases and RNases.

1

Abbildung 27 Kopie der Seite 1 der Herstellerbeschreibung von Proteinase K.

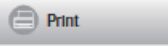

**Application and Literature**

- (1) Preparation of genomic DNA from bacteria (miniprep): bacteria from a saturated liquid culture are lysed and proteins removed by digestion with 100 µg/ml proteinase K for 1 hr at 37°C (Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (eds.) (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*. Supplement 40 Page 2.4.1; Greene Publishing & Wiley-Interscience, New York).
- (2) Whole-Mount in situ hybridization and detection of RNAs in vertebrate embryos and isolated organs: digestion of the sample e. g. in 10 µg/ml proteinase K for 15 min. at room temperature; the length of treatment and/or concentration of the enzyme needs to be optimized! (Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (eds.) (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*. Supplement 35 Page 14.9.3; Greene Publishing & Wiley-Interscience, New York).
- (3) Preparation of DNA from cells or tissue samples for PCR: cells or tissue samples are incubated over night at 50°C with 100 µg/ml proteinase K (Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (eds.) (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*. Supplement 17 Page 15.3.1; Greene Publishing & Wiley-Interscience, New York).
- (4) Isolation of vaccinia virus DNA: digestion of the virus in a suspension with 2 mg/ml proteinase K for 4 hr at 37°C. (Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (eds.) (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*. Supplement 43 Page 16.17.8; Greene Publishing & Wiley-Interscience, New York).
- (5) Proteinase K has two binding sites for Ca<sup>2+</sup>, located close to the active site, but not directly involved in the catalytic mechanism. Removal of the Ca<sup>2+</sup> reduces the catalytic activity of proteinase K by 80 %. The residual activity is usually sufficient to degrade proteins that commonly contaminate preparations of nucleic acids. Therefore, digestions with proteinase K for nucleic acid purification are usually carried out in the presence of EDTA. If the presence of Ca<sup>2+</sup> is necessary, add Ca<sup>2+</sup> to 1 mM and remove later by addition of EGTA (pH 8.0, final conc. 2 mM). (Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition page B16. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.)

J8120319

**Abbildung 28** Kopie der Seite 2 der Herstellerbeschreibung von Proteinase K.

## 8.3 Gebrauchsanweisung für den Protease Inhibitor (PI)

For life science research only. Not for use in diagnostic procedures.

# cOplete

## Protease Inhibitor Cocktail Tablets in glass vials

For the complete inhibition of proteases during extractions from animal and plant tissues or cells, yeast and bacteria

**Cat. No. 11 697 498 001**      20 tablets  
**Cat. No. 11 836 145 001**      3 × 20 tablets

**Version 12.0**  
 Content version: December 2005  
 Store at +2 to +8°C

---

### 1. What this Product Does

#### 1.1 Properties

cOplete tablets inhibit a broad spectrum of serine, cysteine and metalloproteases as well as calpains. Due to the optimized composition of the tablets they show excellently inhibition effects and are therefore very well suited for the protection of proteins isolated from animal tissues, plants, yeast and bacteria. cOplete contains both irreversible and reversible protease inhibitors.

#### 1.2 Contents

20 (or 3 × 20, resp.) cOplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets in a glass vial. Each tablet is sufficient for a volume of 50 ml solution.

#### 1.3 Stability

- The tablets are stable at +2 to +8°C, stored dry, until expiration date.
- The stock solution is stable for 1–2 weeks, stored at +2 to +8°C, or at least for 12 weeks at –15 to –25° C.

#### 1.4 Application

Used for the inhibition of serine, cysteine, and metalloproteases in bacterial, mammalian, yeast, and plant cell extracts. cOplete contains both reversible and irreversible protease inhibitors. Therefore, we recommend the addition of cOplete to all stock buffers and solutions normally protected with protease inhibitors and not only during the initial purification steps. cOplete contains EDTA (18.5 mg/tablet yield 1 mM solution of EDTA in 50 ml). Therefore, the extraction buffer should not contain divalent cations like Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> or Mn<sup>2+</sup> otherwise the inhibition of the metalloproteases might be incomplete. If the protein of interest will be purified by IMAC (immobilized metal-chelate affinity chromatography), e.g. Poly-His tagged recombinant proteins, EDTA has to be eliminated (e.g. by dialysis) prior to the chromatography. Alternatively, the product cOplete, EDTA-free can be used (see table "Ordering Information"). These tablets are identical to cOplete, with the only difference that no EDTA or other chelating agent are present.

### 2. How to Use this Product

#### 2.1 Preparation of Working Solutions

One tablet cOplete is sufficient for the inhibition of the proteolytic activity in 50 ml extraction solution. If very high proteolytic activity is present, one tablet should be used for 25 ml extraction buffer. The tablets can be added directly to the extraction medium. Alternatively a stock solution (25 × conc.) can be prepared.

If it is necessary to inhibit proteolytic activity in a smaller volume we recommend to use cOplete, Mini (1 tablet for 10 ml extraction solution, see "Ordering Information"). The composition of the cOplete Mini tablet is identical to the normal cOplete tablet, therefore comparable results are achieved with both product types.

#### 2.2 Stock solution (25 × conc.)

Dissolve one tablet cOplete in 2 ml redist. H<sub>2</sub>O or in 100 mM phosphate buffer, pH 7.0.

### 3. Results

In extracts from animal tissues mainly serine, cysteine and metalloproteases are found; in plant extracts serine and cysteine proteases dominate. For bacterial extracts serine and metalloproteases are typical (1). cOplete tablets inhibit efficiently serine, cysteine and metalloproteases in a broad range. Occasionally, aspartic proteases ("acid proteases") can interfere upon isolations from animal tissues. These proteases, however, exhibit pronounced activities only at low pH values. If extraction or single isolation steps have to be performed at this pH range the addition of pepstatin\* is recommended to inhibit aspartic protease activity as a precaution. Typical values for the inhibition of different proteases and protease mixtures by cOplete are shown in table 1.

Protease resp. protease mixture	Enzyme concentration (mg/ml)	pH-value	% inhibition after immediate addition to the protease	% inhibition after 60 min incubation (protease + cOplete) at +15 to +25° C
Pancreas-extract	0.015	7.8	87%	99%
	0.03	6.5	89%	96%
Pronase	0.0015	7.8	88%	99%
	0.003	7.0	90%	95%
Thermolysin	0.0008	7.8	99%	100%
Chymotrypsin	0.0015	7.8	97%	97%
Trypsin	0.0002	7.8	93%	89%
Papain	1.0	6.5	95%	73%

**Table 1: Inhibition of different proteases by cOplete Protease Inhibitor Tablets.**  
 One cOplete tablet was added per 50 ml incubation solution. Proteolytic activity was determined with the Roche Applied Science Universal Protease Substrate (casein, resorufin-labeled\*). When extractions or single-step isolations are necessary in the acid pH range, simply include pepstatin\* along with cOplete tablets to ensure aspartic (acid) protease inhibition. All experiments were performed at room temperature.  
 Personal research communications indicate that acetylcholinesterase is strongly inhibited by cOplete. Butyrylcholin-esterase is inhibited to a lesser extent.

\* available from Roche Applied Science

1210.116972340019 www.roche-applied-science.com

Abbildung 29 Kopie der Seite 1 der Gebrauchsanweisung für den Protease Inhibitor (PI).



#### 4. Additional Information on this Product

##### 4.1 Absorption

A solution of 1 tablet cO/mplete dissolved in 50 ml H<sub>2</sub>O has an absorption of 0.08 at 280 nm.

##### 4.2 Quality Control

The inhibitory power of cO/mplete has been demonstrated with many proteases and protease mixtures. In these experiments drastically higher concentrations of proteases were used compared to the concentration usually present in extracts (see table 1). The inhibitory activity of each lot is tested with a concentrated pancreas extract and a concentrated pronase solution. Thereby, the proteolytic activities are typically inhibited by 95% after one hour (detection with universal protease substrate casein, resorufin-labeled\*).

##### 4.3 Reference

- North, M.J. (1969) in: Proteolytic Enzymes - A Practical Approach (Beynon, P.J. & Bond, J.S. eds.), IRL press Oxford, pp. 117-119.

#### 5. Ordering Information

For additional information, please visit  
[www.roche-applied-science.com/proteaseinhibitor](http://www.roche-applied-science.com/proteaseinhibitor)

##### cO/mplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets in glass vials:

Product	Pack size	Cat. No.
cO/mplete	20 tablets in a glass vial (for 50 ml each)	11 697 498 001
	3 x 20 tablets in glass vials (for 50 ml each)	11 836 145 001
cO/mplete, Mini	25 tablets in a glass vial (for 10 ml each)	11 836 153 001
cO/mplete, EDTA-free	20 tablets in a glass vial (for 50 ml each)	11 873 580 001
cO/mplete, Mini, EDTA-free	25 tablets in a glass vial (for 10 ml each)	11 836 170 001

##### cO/mplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets in EASYpacks:

Product	Pack size	Cat. No.
cO/mplete	20 tablets in foil blisters (for 50 ml each)	04 693 116 001
cO/mplete, Mini	30 tablets in foil blisters (for 10 ml each)	04 693 124 001
cO/mplete, EDTA-free	20 tablets in foil blisters (for 50 ml each)	04 693 132 001
cO/mplete, Mini, EDTA-free	30 tablets in foil blisters (for 10 ml each)	04 693 159 001

##### Kits and Sets:

Product	Pack size	Cat. No.
Pefabloc SC PLUS	Set I: contains 100 mg Pefabloc SC and 5 ml PSC protector solution	11 873 601 001
	Set II: contains 1g Pefabloc SC and 2 x 25 ml PSC protector solution	11 873 628 001
Protease Inhibitor Set	Small quantities of 10 most commonly used protease inhibitors	11 206 893 001

##### Substrate:

Product	Pack size	Cat. No.
Universal Protease Substrate (Casein, resorufin-labeled)	15 mg	11 080 733 001
	40 mg	11 734 334 001

##### Individual Protease Inhibitors:

Product	Pack size	Cat. No.
Aprotinin	10 mg	10 236 624 001
	50 mg	10 981 532 001
	100 mg	11 583 794 001
Bestatin	10 mg	10 874 515 001
	50 mg	11 359 070 001
Calpain Inhibitor I	25 mg	11 086 090 001
Calpain Inhibitor II	25 mg	11 086 103 001
Chymostatin	10 mg	11 004 638 001
E-64	10 mg	10 874 523 001
	25 mg	11 585 681 001
Leupeptin	5 mg	11 017 101 001
	25 mg	11 017 128 001
	50 mg	11 034 626 001
	100 mg	11 529 048 001
α <sub>2</sub> -Macroglobulin	25 IU	10 602 442 001
Pefabloc SC	100 mg	11 429 868 001
	500 mg	11 585 916 001
	1 g	11 429 876 001
Pepstatin	2 mg	10 253 286 001
	10 mg	11 359 053 001
	50 mg	11 524 488 001
PMSF	1 g	10 236 608 001
	10 g	10 837 091 001
	25 g	11 359 061 001
TLCK - HCl	100 mg	10 874 485 001
Trypsin Inhibitor (chicken, egg white)	1 g	10 109 878 001
Trypsin Inhibitor (soybean)	50 mg	10 109 886 001

This combination comprises only the most important products related to the product described.

Please refer to our latest catalog for our current product range or contact your local Roche Applied Science representative directly.

##### Trademarks

COMPLETE is a Trademark of Roche

Other brands or product names are trademarks of their respective holders.

##### Regulatory Disclaimer

For life science research only. Not for use in diagnostic procedures.

##### Contact and Support

To ask questions, solve problems, suggest enhancements or report new applications, please visit our **Online Technical Support Site** at:

[www.roche-applied-science.com/support](http://www.roche-applied-science.com/support)

To call, write, fax, or email us, visit the Roche Applied Science home page, [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com), and select your home country. Country-specific contact information will be displayed. Use the Product Search function to find Pack Inserts and Material Safety Data Sheets.



Roche Diagnostics GmbH  
Roche Applied Science  
68296 Mannheim  
Germany

Abbildung 30 Kopie der Seite 2 der Gebrauchsanweisung für den Protease Inhibitor (PI).

### 8.4 Zusammensetzung der einzelnen Spray-Lösungen: Spray#1 bis Spray#5

**Tabelle 10.** Zusammensetzung der einzelnen Spray-Lösungen: Spray#1 bis Spray#5.

Spray-Lösung	Zusammensetzung							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Spray#1 ( Lot#2B01 )	55,6 %	35 %	5 %	2 %	0,2 %	0,2 %	1 %	1 %
Spray#2 ( Lot#2B12 )	64,8 %	30 %	2 %	1 %	0,1 %	0,1 %	1 %	1 %
Spray#3 ( Lot#2B13 )	71,8 %	25 %	1 %	1 %	0,1 %	0,1 %	0,5 %	0,5 %
Spray#4 ( Lot#2B14 )	86,1 %	12,5 %	0,5 %	0,5 %	0,05 %	0,05 %	0,2 %	0,2 %
Spray#5 ( Lot#2B15 )	89,6 %	10 %	0,1 %	0,1 %	0 %	0 %	0,1 %	0,1 %

A= Wasser; B= Ethylalkohol; C= Pfefferminzöl; D= Rosmarinöl; E= Niemöl; F= Thymianöl; G= Traubenkernöl; H= Grapefruitkernextrakt. Prozentangaben in Massenprozent.

## 8.5 Kopie des Protokolls der statistischen Auswertung

```

GET DATA /TYPE=XLSX
  /FILE='E:\Daten_Gasha_j_3.xlsx'
  /SHEET=name 'Sheet1'
  /CELLRANGE=full
  /READNAMES=on
  /ASSUMEDSTRWIDTH#32767.
EXECUTE.
DATASET NAME DataSet1 WINDOW=FRONT.
MEANS TABLES=Score BY Gruppe
  /CELLS=COUNT MEAN STDDEV MEDIAN MIN MAX.

```

**Mittelwerte**

Anmerkungen

Ausgabe erstellt	29-DEC-2016 11:46:19	
Kommentare		
Eingabe	Aktiver Datensatz	DataSet1
	Filter	<keine>
	Gewichtung	<keine>
	Aufgeteilte Datei	<keine>
	Anzahl der Zeilen in der Arbeitsdatei	100
Behandlung fehlender Werte	Definition von Fehlend	Für jede abhängige Variable einer Tabelle werden benutzerdefinierte, fehlende Werte für die abhängige Variable und alle Gruppenvariablen als fehlend behandelt.
	Verwendete Fälle	Die Fälle, die für jede Tabelle verwendet werden, haben in keiner unabhängigen Variable fehlende Werte, und nicht alle abhängigen Variablen haben fehlende Werte.
Syntax	MEANS TABLES=Score BY Gruppe /CELLS=COUNT MEAN STDDEV MEDIAN MIN MAX.	
Ressourcen	Prozessorzeit	00:00:00,03
	Verstrichene Zeit	00:00:00,06

[DataSet1]

Verarbeitete Fälle

	Fälle					
	Eingeschlossen		Ausgeschlossen		Insgesamt	
	N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
Score * Gruppe	100	100,0%	0	0,0%	100	100,0%

Seite 1

Abbildung 31 Kopie der Seite 1 des Protokolls der statistischen Auswertung.

## Anhang

### Bericht

Score						
Gruppe	N	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
1	21	2,19	1,078	2,00	1	5
2	14	2,79	1,578	2,50	1	5
3	14	2,36	1,082	2,00	1	5
4	16	3,38	1,025	3,00	2	5
5	16	2,31	1,014	3,00	1	4
6	19	2,68	1,376	2,00	1	5
Insgesamt	100	2,60	1,239	3,00	1	5

\*Nonparametric Tests: Independent Samples.

NPTESTS

```
/INDEPENDENT TEST (Score) GROUP (Gruppe)  
/MISSING SCOPE=ANALYSIS USERMISSING=EXCLUDE  
/CRITERIA ALPHA=0.05 CILEVEL=95.
```

### Nicht parametrische Tests

#### Anmerkungen

Ausgabe erstellt	29-DEC-2016 11:47:27	
Kommentare		
Eingabe	Aktiver Datensatz	DataSet1
	Filter	<keine>
	Gewichtung	<keine>
	Aufgeteilte Datei	<keine>
	Anzahl der Zeilen in der Arbeitsdatei	100
Syntax	NPTESTS /INDEPENDENT TEST (Score) GROUP (Gruppe) /MISSING SCOPE=ANALYSIS USERMISSING=EXCLUDE /CRITERIA ALPHA=0.05 CILEVEL=95.	
Ressourcen	Prozessorzeit	00:00:00,74
	Verstrichene Zeit	00:00:02,78

Seite 2

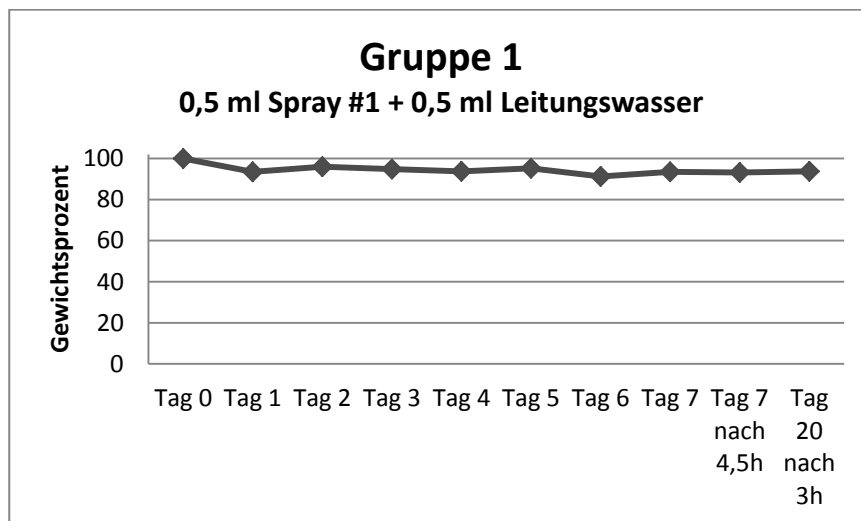
**Abbildung 32** Kopie der Seite 2 des Protokolls der statistischen Auswertung.

	Nullhypothese	Test	Sig.	Entscheidung
1	Die Verteilung von Score ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben	,068	Nullhypothese beibehalten

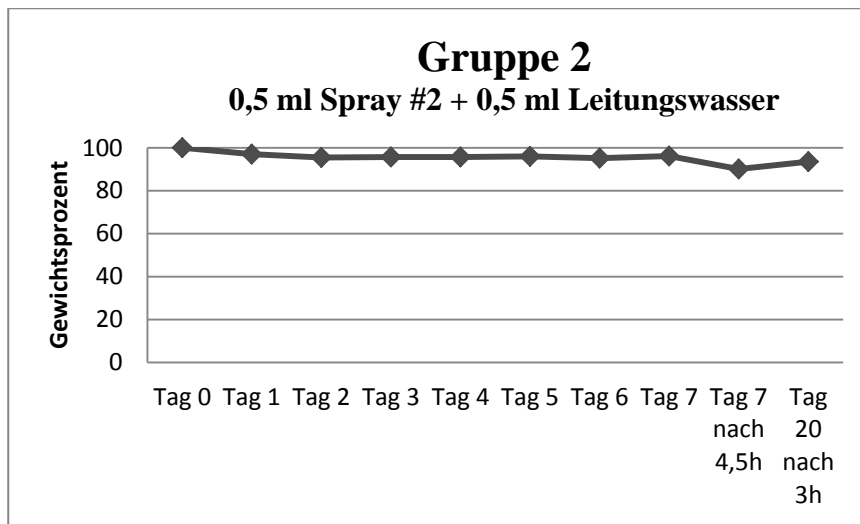
Asymptotische Signifikanzen werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

**Abbildung 33** Kopie der Seite 3 des Protokolls der statistischen Auswertung.

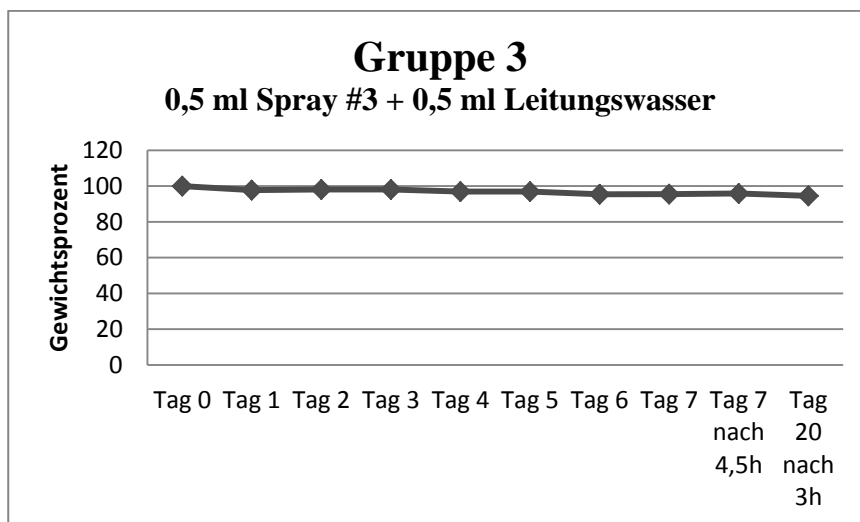
### 8.6 Graphische Darstellung der Gewichtsmessungen der 2. Versuchsreihe



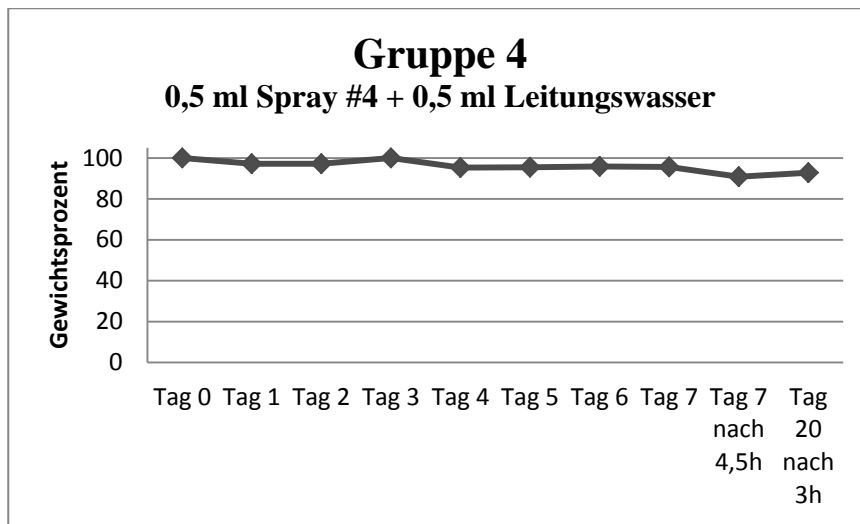
**Abbildung 34** Prozentueller Gewichtsverlust der Zahnsteinstücke aus Gruppe 1 in Abhängigkeit von der Einwirkzeit.



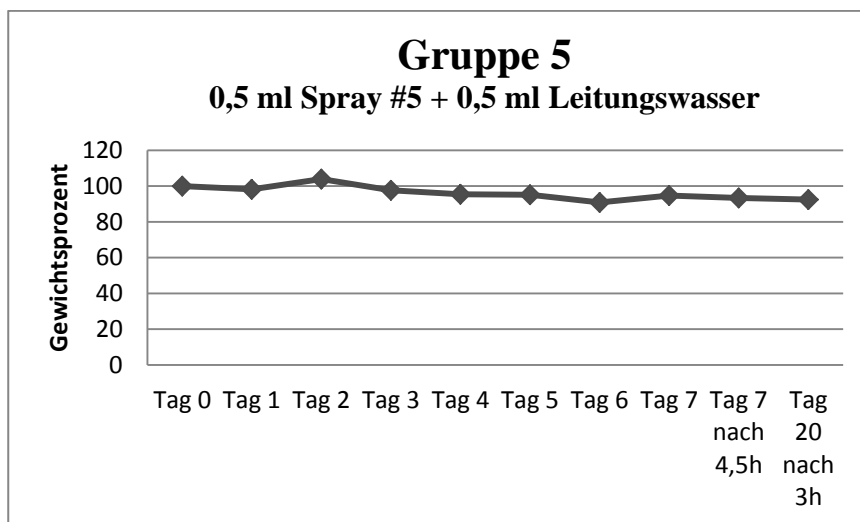
**Abbildung 35** Prozentueller Gewichtsverlust der Zahnsteinstücke aus Gruppe 2 in Abhängigkeit von der Einwirkzeit.



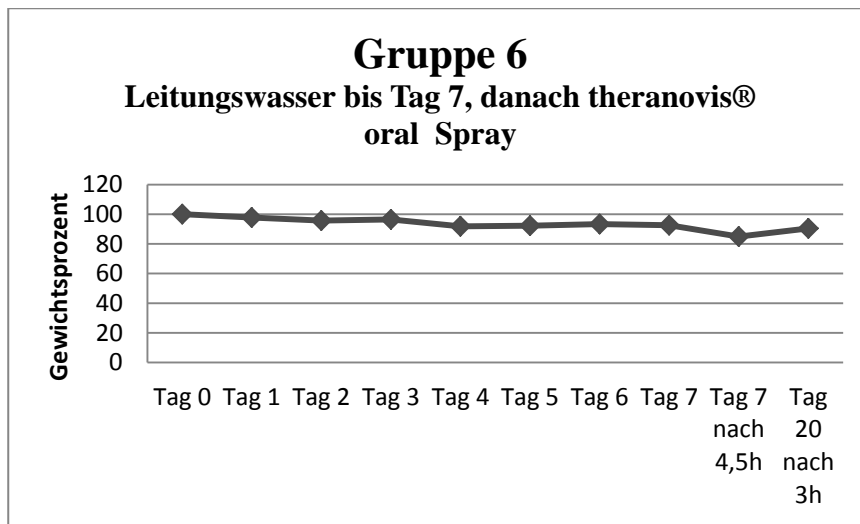
**Abbildung 36** Prozentueller Gewichtsverlust der Zahnsteinstücke aus Gruppe 3 in Abhängigkeit von der Einwirkzeit.



**Abbildung 37** Prozentueller Gewichtsverlust der Zahnsteinstücke aus Gruppe 4 in Abhängigkeit von der Einwirkzeit.



**Abbildung 38** Prozentueller Gewichtsverlust der Zahnsteinstücke aus Gruppe 5 in Abhängigkeit von der Einwirkzeit.



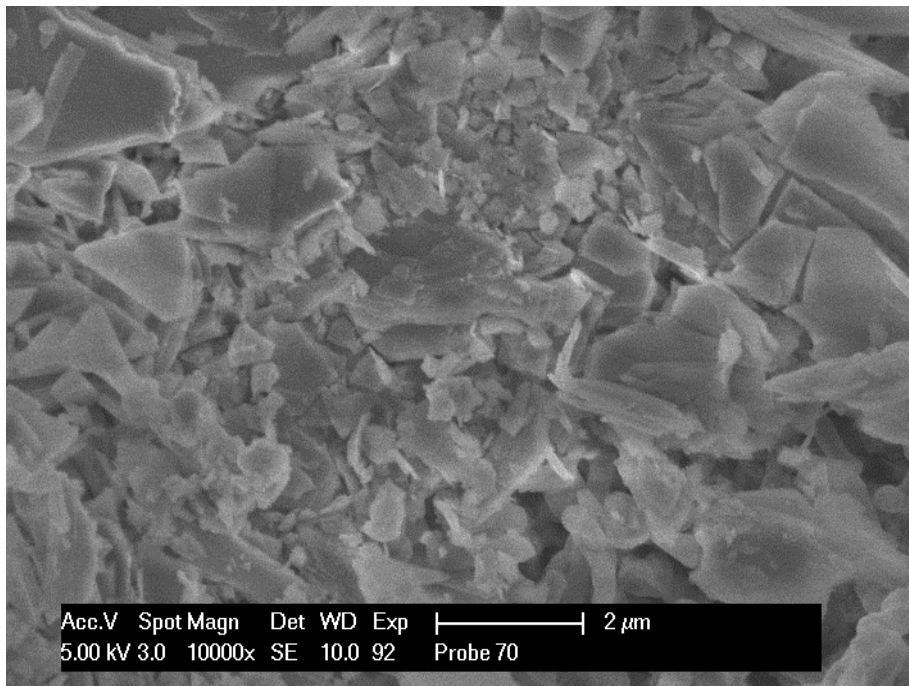
**Abbildung 39** Prozentueller Gewichtsverlust der Zahnsteinstücke aus Gruppe 6 in Abhängigkeit von der Einwirkzeit.

### 8.7 REM-Bilder der 2. Versuchsreihe



**Abbildung 40** REM-Bild. Zahnsteinbrocken von Gruppe 1 (Spray#1) der Versuchsreihe 2. Scharfe, kantige, kristalline Strukturen kommen vereinzelt vor. Runde weiche, organische Strukturen sind häufiger, sind jedoch aufgelockert.

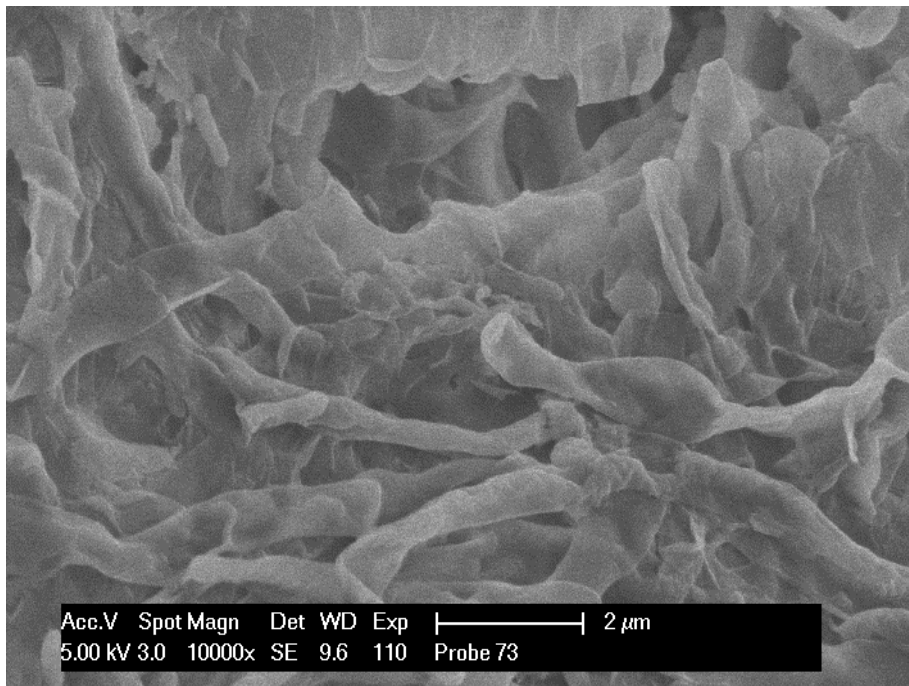




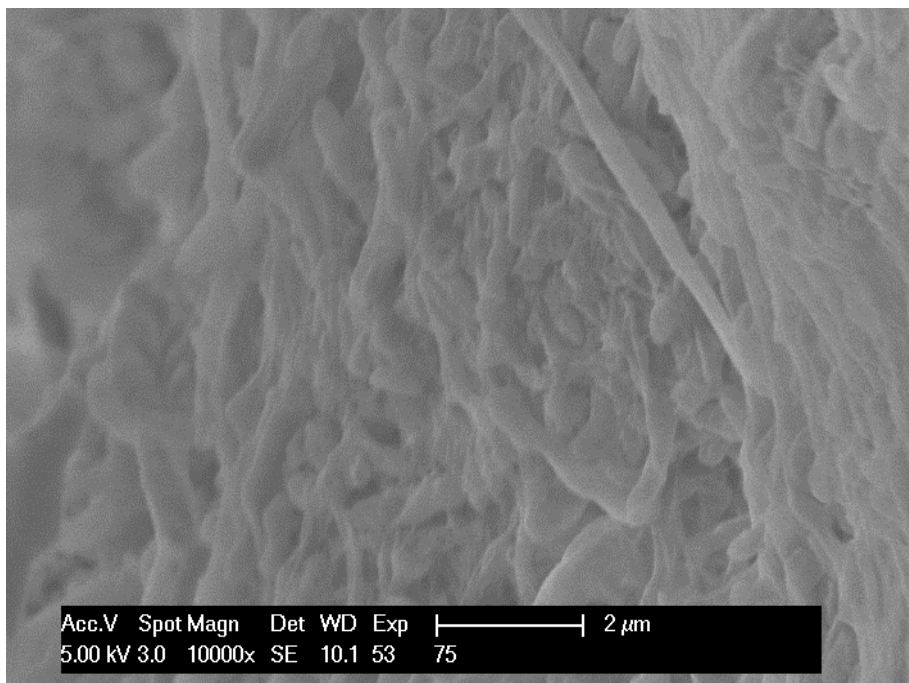
**Abbildung 41** REM Bild. Zahnsteinbrocken von Gruppe 2 (Spray#2) der Versuchsreihe 2. Scharfe, kantige, kristalline Strukturen sind dominant vorhanden. Runde, weiche, organische Strukturen kommen nur vereinzelt vor.



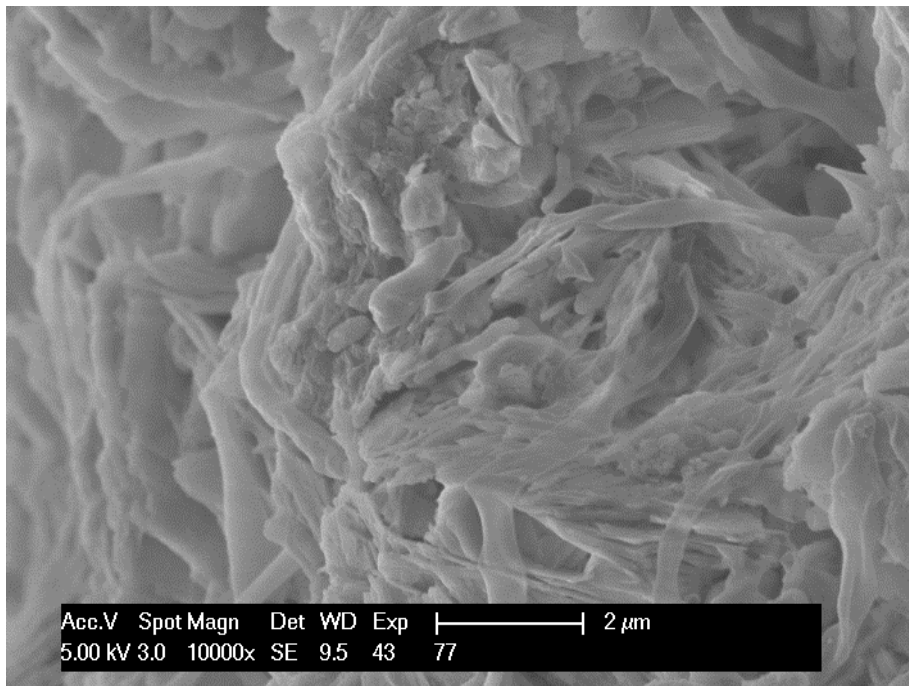
**Abbildung 42** REM Bild. Zahnsteinbrocken von Gruppe 3 (Spray#3) der Versuchsreihe 2. Scharfe, kantige, kristalline Strukturen sind dominant vorhanden. Runde, weiche, organische Strukturen sind seltener.



**Abbildung 43** REM Bild. Zahnsteinbrocken von Gruppe 4 (Spray#4) der Versuchsreihe 2. Runde, weiche, organische Strukturen sind häufiger vertreten. Scharfe, kantige, kristalline Strukturen erscheinen selten. Es wirkt, als würden die kristallinen Strukturen von den organischen bedeckt.



**Abbildung 44** REM Bild. Zahnsteinbrocken von Gruppe 5 (Spray#5) der Versuchsreihe 2. Runde, weiche, organische Strukturen sind häufiger vertreten. Scharfe, kantige, kristalline Strukturen sind verschwindend gering vorhanden.



**Abbildung 45** REM Bild. Zahnsteinbrocken von Gruppe 6 (theranovis® oral Spray) der Versuchsreihe 2. Runde, weiche, organische Strukturen und scharfe, kantige, kristalline Strukturen sind erkennbar