

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde,

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. M. Hannig

**Wirkung von
Chlorhexidin und Aluminium-Ionen
auf die initiale Biofilmbildung *in situ***

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2018

vorgelegt von:

Laura Urgatz

geb. am: 16.09.1991 in Zweibrücken

Tag der Promotion:

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Rupf

2. Berichterstatter:

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Al-Lactat	Aluminium-Lactat, $C_9H_{15}AlO_9$
Al1-P	Aluminium-Lactat-Paste, <i>Lacalut white</i>
Al1-CHX-P	Aluminium-Lactat-Chlorhexidin-Paste, <i>Lacalut extra sensitiv</i>
Al3-CHX-P	Aluminium-Lactat-Aluminium-Fluorid-Aluminium-Hydroxid-Paste, <i>Lacalut aktiv</i>
AlF₃	Aluminiumfluorid
Al(OH)₃	Aluminiumhydroxid
B-P	Basispaste
B-CHX-P	Chlorhexidin - Basispaste
bspw.	beispielsweise
bzgl.	bezüglich
CAPB	Cocamidopropyl
CHX	Chlorhexidin
D	Dentin
d.h.	das heißt
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
EPS	extrazelluläre Polysaccharide
et al.	und andere
Etbr	Ethidiumbromid
FM	Fluoreszenzmikroskopie
Gew.-%	Gewichtsprozent
GI	Gingiva-Index
h	Stunde
Max	Maximum

min	Minute
Min	Minimum
mm	Millimeter
NaF	Natriumfluorid
P	Politur
PEG-32	Polyethylenglykol – 32
PI	Plaqueindex
PK	Prüfkörper
PRP	Prolin-reiche Proteine
q1	erste Quantile
q3	dritte Quantile
REM	Rasterelektronenmikroskopie
s	Sekunde
S	Schmelz
S.	Seite
SiO₂	Siliciumoxid
SLS	Natriumlaurylsulfat, NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄
sog.	sogenannte
spp.	Spezies
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TiO₂	Titanoxid
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1	Deutsche Zusammenfassung	1
1.2	Englische Zusammenfassung.....	3
2	EINLEITUNG	5
2.1	Literaturübersicht.....	6
2.1.1	Biofilm	6
2.1.2	Biofilmmodelle	13
2.1.3	Plauekontrolle	15
2.1.4	Chlorhexidin	16
2.1.5	Metall-Ionen.....	19
2.2	Ziel der Arbeit / Fragestellung.....	20
3	MATERIAL UND METHODE	21
3.1	Studiendesign.....	21
3.2	Probanden	21
3.3	Zahnpastaformulierungen	21
3.4	Herstellung der Schienen	22
3.5	Herstellung der Prüfkörper	22
3.5.1	Extraktion und Vorbereitung der Rinderzähne	22
3.5.2	Politur und Reinigung der Prüfkörper.....	23
3.6	Montage der Prüfkörper.....	24
3.7	Versuchsaufbau.....	24

3.8	Fluoreszenzmikroskopie	28
3.8.1	Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie	28
3.8.2	Herstellung der Färbelösung	28
3.8.3	Färben und Fixieren der Prüfkörper	29
3.8.4	Durchführung der Mikroskopie	29
3.8.5	Quantifizierung der Biofilme	29
3.9	Rasterelektronenmikroskopie	32
3.9.1	Fixierung des Biofilms	32
3.9.2	Durchführung der Rasterelektronenmikroskopie	33
3.9.3	Energiedispersive Röntgenspektroskopie	33
3.10	Statistik	33
4	ERGEBNISSE	35
4.1	Fluoreszenzmikroskopie	35
4.1.1	Visualisierung des <i>In-situ</i> -Biofilms	35
4.1.2	Schmelzprüfkörper	37
4.1.3	Dentinprüfkörper	44
4.2	Rasterelektronenmikroskopie	50
4.2.1	Visualisierung des <i>In-situ</i> -Biofilms	50
4.2.2	Energiedispersive Röntgenspektroskopie	54
5	DISKUSSION	57
5.1	Diskussion von Material und Methode	57
5.1.1	Fragestellung	57
5.1.2	Kommerzielle und experimentelle Zahnpasten	58
5.1.3	Verwendung und Herstellung boviner Prüfkörper	59
5.1.4	<i>In-situ</i> -Biofilmmodell	60

5.1.5	Studienbedingungen.....	62
5.1.6	Darstellung und Quantifizierung des Biofilms	62
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	65
5.3	Schlussfolgerung.....	69
6	LITERATURVERZEICHNIS	70
7	PUBLIKATION / DANKSAGUNG	83
7.1	Publikation.....	83
7.2	Danksagung	83
8	LEBENS LAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Wirkung von Chlorhexidin und Aluminium-Ionen auf die initiale Biofilmbildung *in situ*

Ziel: Chlorhexidin (CHX) wird Zahnpasten zur Hemmung der Biofilmneubildung zugesetzt. Ebenso werden Aluminiumverbindungen mit diesem Ziel eingesetzt. In der vorliegenden Studie sollte der Einfluss von Chlorhexidin und Aluminiumverbindungen einzeln sowie in Kombination in kommerziellen und experimentellen Zahnpasten untersucht werden.

Material und Methode: Die Biofilmbildung erfolgte *in situ* auf bovinen Schmelz- (S) und Dentinprüfkörpern (D) (jeweils $n=288$), die auf Kunststoffschienen mittels Silikon im Oberkiefermolarenbereich von sechs Probanden befestigt wurden. Innerhalb einer Verweildauer von 24 h wurden im 1. Quadranten positionierte Prüfkörper nach 30 min, 12 h und 23,5 h für jeweils 30 s geputzt. Die Prüfkörper des 2. Quadranten wurden nicht geputzt, jedoch in der Mundhöhle belassen. Alle Prüfkörper wurden 2 min mit dem Putzschaum kontaminiert. Folgende Zahnpasten wurden eingesetzt: Basispaste (B-P: PEG-32, Sorbitol, Hydroxyethylzellulose, SiO_2 , TiO_2 , SLS ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$)), Chlorhexidin-Basispaste (B-CHX-P: B-P + 0,05 % CHX), Aluminium-Lactat-Paste (Al1-P: B-P + Al-Lactat ($\text{C}_9\text{H}_{15}\text{AlO}_9$) 0,8%, NaF 1360 ppm), Aluminium-Lactat-Chlorhexidin-Paste (Al1-CHX-P: PEG 32, Sorbitol, Hydroxyethylzellulose, SiO_2 , TiO_2 , Cocamidopropyl, Al-Lactat 0,8%; NaF 1360ppm; Olaflur ($\text{C}_{27}\text{H}_{60}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_3$)) und Aluminium-Lactat-Aluminiumfluorid-Aluminiumhydroxid-Chlorhexidin-Paste (Al3-CHX-P: Al1-P + CHX 0,05%, AlF_3 1360ppm, $\text{Al}(\text{OH})_3$). Putzen mit Wasser (W) diente als Kontrolle. Biofilme auf den Prüfkörpern wurden mittels Vitalfluoreszenz (SYTO 9, Propidiumiodid) untersucht. Eine Bestimmung der Biofilmbedeckung erfolgte anhand eines 6-stufigen Scorings (S1 = einzelne Bakterien, S2 = bakterielle Aggregation, S3 = Kolonien, S4 = Bedeckung < 50%, S5 = Bedeckung > 50%, S6 = Bedeckung > 90%). Die Biofilmvitalität wurde mit einem 5-stufigen Scoring aufsteigend entsprechend des Anteils grüner Fluoreszenzen bewertet. Für die mit dem Zahnpastaschaum in Kontakt gekommenen, ungeputzten Schmelzprüfkörper wurde die Oberflächenbedeckung colorimetrisch gemessen. Die Rasterelektronenmikroskopie ermöglichte darüber hinaus eine morphologische Beschreibung der *in situ* unter dem Einfluss der Zahnpastaformulierungen entstandenen Biofilme.

Ergebnisse: Die Biofilmbildung unterlag unabhängig von den Pasten einer großen interindividuellen Variabilität. Auf Schmelz- und Dentinprüfkörpern der rechten Seite, die aktiv mit entsprechender Paste geputzt wurden, waren einzelne Bakterien und kleine Kolonien erkennbar

(median S/D): W:3/3, B-P: 3/2,5, B-CHX-P: 2/1,3, A11-P: 2/2, A11-CHX-P: 2/2, A13-CHX-P: 1/1. Alle wirkstoffhaltigen Pasten bewirkten eine signifikante Hemmung der initialen Biofilmbedeckung gegenüber der Kontrolle Wasser ($p < 0,001$). Auf ungeputzten Schmelz- und Dentinprüfkörpern der linken Seite waren sowohl vereinzelte Bakterienkolonien, als auch eine nahezu vollständige Biofilmbedeckung zu finden (median S/D): W: 4/5, B-P: 4/4, B-CHX-P: 4/4, A11-P: 3,5/3, A11-CHX-P: 4/3, A13-CHX-P: 2/3. Die Biofilmneubildung war auf ungeputzten Prüfkörpern, die mit A11-P und A13-CHX-P in Berührung kamen, vermindert ($p < 0,015$). Nach Anwendung der Aluminium-Paste und der CHX-Basispaste zeigte sich ein ausgeglichenes Verhältnis roter und grüner Fluoreszenz. Das Umspülen mit A11-CHX-P führte auf den Schmelzprüfkörpern sogar zu einem verhältnismäßigen Anstieg grüner Fluoreszenzen und somit zu einem hohen Anteil vitaler Bakterien. Die Anwendung von A13-CHX-P bewirkte eine signifikante Abnahme der Biofilmvitalität ($p < 0,001$). Mittels rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen war es möglich die Biofilmmorphologie näher zu beschreiben und Zahnpastentrückständen auf den Prüfkörperoberflächen nachzuweisen. Die Biofilme bestanden zumeist aus Kokken, die sich auf den Schmelzprismen bzw. den Dentintubuli ablagerten. Geputzte Prüfkörper wiesen im Vergleich zu umspülten Prüfkörpern eine geringere Biofilmbedeckung und vermehrt Zahnpastarückstände auf. Putzen mit A11-P führte zu nahezu bakterienfreien Prüfkörperoberflächen. Auf mit A11-CHX-P umspülten Prüfkörpern, lagerten sich große organische Putzkörper ab, die eine Anhaftungsstelle für Bakterien und Pellikelbestandteile boten. Auf Prüfkörpern, die mit A13-CHX-P umspült oder geputzt wurden, waren nur vereinzelt Kokken sichtbar. Mit Hilfe der energiedispersiven Röntgenspektroskopie konnten Aluminium-Rückstände auf diesen Prüfkörpern nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung: Die alleinige Verwendung von 0,05% Chlorhexidin zeigt eine begrenzte antibakterielle Wirkung. Aluminiumlactat scheint auch eine antibakterielle Wirkung zu besitzen. Letztendlich kann die Kombination von Aluminium-Ionen und Chlorhexidin zu einer signifikanten Abnahme der Biofilmbedeckung und Vitalität führen. Der Einfluss von Tensiden und Zahnpastabestandteilen auf den Wirkmechanismus von Aluminium-Ionen und Chlorhexidin bleibt fraglich und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

1.2 Englische Zusammenfassung

Effect of chlorhexidine and aluminum ions on initial biofilm formation *in situ*

Objectives: Chlorhexidine (CHX) is added to toothpastes to support the inhibition of biofilm reformation. Aluminum compounds are also used with this aim. In the present study, the influence of chlorhexidine and aluminum compounds should be investigated individually and in combination in commercial and experimental toothpastes.

Materials and methods: The biofilm formation was carried out *in situ* on bovine enamel (E) and dentin (D) specimens (n = 288), which were mounted to minisplits using silicone in the upper-jaw area of six subjects. In a time of 24 h the specimens positioned in the first quadrant were cleaned after 30 min, 12 h and 23.5 h for 30 s each. The specimens of the 2nd quadrant were not cleaned, but left in the mouth. All specimens were contaminated with the cleaning foam for 2 min. The following toothpastes were used: base paste (**BP**: PEG-32, sorbitol, hydroxyethylcellulose, SiO₂, TiO₂, SLS (NaC₁₂H₂₅SO₄)), chlorhexidine base paste (**B-CHX-P**: BP + 0.05% CHX) (**A11-P**: BP + Al-lactate (C₉H₁₅AlO₉) 0.8%, NaF 1360 ppm), aluminum lactate chlorhexidine paste (**AL1-CHX-P**: PEG 32, sorbitol, hydroxyethylcellulose, SiO₂, TiO₂, cocamidopropyl, Al-lactate (C₉H₁₅AlO₉) 0.8%, NaF 1360 ppm, Olaflur (C₂₇H₆₀F₂N₂O₃)) and aluminum lactate aluminum fluoride aluminum hydroxide chlorhexidine paste (**AI3-CHX-P**: A11-P + CHX 0.05%, AlF₃ 1360ppm, Al(OH)₃). Cleaning with water (W) served as control. Biofilms on the specimens were examined by means of vital fluorescence (SYTO 9, propidium iodide). A semiquantification of biofilm coverage and vitality was performed by scoring. A color histogram was additionally evaluated for non-brushing enamel specimens. Scanning electron microscopy also enabled a morphological description of the *in situ* biofilm under the influence of toothpaste formulations.

Results: Biofilm formation was subject to a high degree of interindividual variability, regardless of the pastes. On enamel and dentine specimens of the right side, which were actively brushed with appropriate paste, single bacteria and small colonies were detectable (median E/D): W: 3/3, BP: 3/2,5, B-CHX-P: 2/1,3, A11-P: 2/2, A11-CHX-P: 2/2, AI3-CHX-P: 1/1. All active-ingredient pastes caused a significant inhibition of initial biofilm coverage over the control water (p>0.001). On uncleaned enamel and dentin specimens on the left side, isolated bacterial colonies as well as near complete biofilm coverage were found (median S / D): W: 4/5, BP: 4/4, B-CHX-P: 4 / 4, A11-P: 3.5 / 3, A11-CHX-P: 4/3, AI3-CHX-P: 2/3. Biofilm reformation was reduced (P <0.015) on uncleaned specimens in contact with A11-P and AI3-CHX-P. After

applying the aluminum paste and the CHX base paste, a balanced ratio of red and green fluorescence was observed. Rinsing with A11-CHX-P even led to a relatively higher green fluorescence on the enamel test specimens and thus to a high proportion of vital bacteria. The application of A13-CHX-P causes a significant significant decrease in biofilm vitality ($p < 0.001$). Using scanning electron micrographs, it was possible to describe the biofilm morphology in more detail and to detect toothpaste residues on the specimen surfaces. The biofilms mostly consisted of cocci, which were deposited on the enamel prisms or the dentinal tubules. Brushed specimens showed a lower biofilm coverage and more toothpaste residues compared to washed specimens. Cleaning with A11-P resulted in almost bacteria-free specimen surfaces. On specimens sputtered with A11-CHX-P, large organic grits deposited which provided a site of attachment to bacteria and pellicle constituents. On specimens lapped or cleaned with A13-CHX-P, only isolated cocci were visible. With the aid of energy-dispersive X-ray spectroscopy, aluminum residues could be detected on these specimens.

Conclusion: The sole use of 0.05% chlorhexidine shows a limited antibacterial effect. Aluminum lactate also appears to have an antibacterial effect. Ultimately, the combination of aluminum ions and chlorhexidine can lead to a significant decrease in biofilm coverage and vitality. The influence of surfactants and dentifrices on the mechanism of action of aluminum ions and chlorhexidine remains questionable and should be the subject of further investigations.

2 Einleitung

Karies gilt noch heute als die häufigste Erkrankung in Industrieländern, die circa 60 - 90% der Schulkinder und nahezu die gesamte Bevölkerung im Erwachsenenalter betrifft (Peterson et al., 2005; GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators). Durch Forschung, systematische Prophylaxemaßnahmen und Strategien zur Patientenaufklärung leistet die Zahnmedizin einen wichtigen Beitrag zur Mundgesundheit (Longbottom et al., 2009). Die Deutsche Gesellschaft für Zahnerhaltung (DGZ) stellte 2016 eine neue Leitlinie zur Kariesprophylaxe vor (Geurtsen et al., 2016). Die häusliche Zahnpflege durch den Patienten selbst ermöglicht einen entscheidenden Eingriff zur Reduktion des bakteriellen Biofilms (Varoni et al., 2012). Dabei wird neben einer Reduktion zuckerhaltiger Getränken und Speisen, zweimal tägliches Zähneputzen mit einer fluoridhaltigen Zahnpasta empfohlen. Die hierbei zur Anwendung kommenden Zahnpasten stellen den wichtigsten Träger antimikrobieller Substanzen dar (Frandsen, 1985; van der Weijden & Slot, 2011). Da dennoch, wie die Prävalenzen biofilminduzierter oraler Erkrankungen zeigen, eine wirksame Plaquekontrolle von den meisten Menschen wohl nach wie vor nicht realisierbar ist, sind Forschung und Industrie weiterhin bemüht, sichere und wirksame Produkte zur Verbeugung der Karies, der Gingivitis und der Parodontitis zu entwickeln.

Chlorhexidin gilt als Goldstandard der chemischen Plaquekontrolle und wird effektiv zur Reduktion der Biofilmbildung und zur Therapie von Gingivitis und Parodontitis eingesetzt (Jones, 1997). Aufgrund der früher postulierten Interferenzen zwischen Chlorhexidin und anionischen Bestandteilen in Zahnpastaformulierungen, gibt es nur wenige Studien zur Wirkung chlorhexidinhaltiger Zahnpasten. Des Weiteren zeigten sich bei längerer oraler Anwendung Verfärbungen der Zahnoberflächen und Zunge. Diese sind zwar vollständig reversibel, führen aber zu einer verminderten Compliance der Patienten (Jenkins et al., 1993; Yates et al., 1993; Sanz et al., 1994). Forschungsgegenstand ist daher seit Jahrzehnten die orale Anwendung von Chlorhexidin für den alltäglichen Gebrauch zu ermöglichen.

Darüber hinaus sind verschiedene Metallsalze in der Lage, die Biofilmbildung zu hemmen (Skjorland et al., 1978). Klinische Studien weisen für eine mit Aluminium-Lactat und Chlorhexidin versetzten Zahnpasta einen plaquehemmenden und gingivitisreduzierenden Effekt nach (Rathe et al., 2007; Bellamy et al., 2009; Bellamy et al., 2011).

Zurzeit gibt es noch keine Untersuchungen zur Wirkungsweise von Chlorhexidin und Aluminium-Ionen in Zahnpastaformulierungen auf die initiale Biofilmbildung. Hierfür wurde ein

Studienmodell entwickelt, das fünf verschiedene experimentelle und kommerzielle Zahnpasten enthält, die dank einer systematischen Konzeption ihrer Inhaltsstoffe einen statischen Vergleich der Wirkung von Aluminium und Chlorhexidin einzeln, sowie in Kombination erlauben.

2.1 Literaturübersicht

2.1.1 Biofilm

Die Mikroflora der Mundhöhle umfasst mehr als 700 Bakterienspezies, von denen einige eine essentielle Rolle in der Pathogenese oraler Erkrankungen spielen (Aas et al., 2005; Paster et al., 2006; Do et al., 2013; Larsen & Fiehn, 2017). In den Anfängen der mikrobiologischen Wissenschaft galt es als Dogma, Bakterien in einzelnen Kulturen zu isolieren, um deren individuelle Eigenschaften zu erforschen. Heutzutage weiß man, dass Bakterien in der Natur zumeist Teil einer interagierenden, polymikrobiellen Gemeinschaft sind, die gemeinsam eine Oberfläche besiedeln und als Biofilm definiert werden (Hojo et al., 2009; Marsh et al., 2011). Die Mundhöhle bietet einen idealen Lebensraum für die Mikroorganismen, denn neben der optimalen Feuchtigkeit und den warmen Temperaturen ist eine Substratzufuhr für das Überleben und das Wachstum der Bakterien gesichert (Marsh, 2010). Der bedeutende Vorteil der Biofilme gegenüber dem planktonischen Milieu bietet sich für Bakterien in der Ausbildung einer Matrix. So können Nährstoffe gespeichert und wiederverwertet, äußere Umweltbedingungen gepuffert und Kooperationen durch Zell-Zell-Kommunikation ausgebildet werden (Flemming et al., 2016). Außerdem zeichnen sich Biofilme durch ihre Fähigkeit zur Adaption an sich verändernde Umweltbedingungen, z.B. durch Modifikation ihrer Genexpression, aus (Fornig et al., 2000).

Obwohl die orale Biofilmbildung ein natürlicher Prozess in der Mundhöhle ist, kann es durch nicht wirksame Mundhygienemaßnahmen oder exogene Faktoren wie ein verminderter Speichelfluss zur Akkumulation der Mikroorganismen auf der Zahnoberfläche kommen. Die Schutzwirkung des Speichels als Puffersystem für antimikrobielle Stoffwechselprodukte, wie z.B. Lactat, wird eingeschränkt, da dicken Plaquemassen nicht ausreichend vom Speichel penetriert werden können.

Bei dem Überangebot von fermentierbaren Kohlenhydraten kommt es durch Abbauprozesse der Mikroorganismen zur Säureproduktion und somit einem Abfall des pH-Wertes in der dentalen Plaque. Biofilme verändern sich in der Folge durch die Vermehrung von säureproduzierenden und säuretoleranten Spezies (bspw. *Streptokokkus mutans*) unter der Abnahme anderer Arten, die bevorzugt bei einem neutralen pH-Wert wachsen, und propagieren so die Entstehung einer Karies (Takahashi & Nyvad, 2008). Auch die Entstehung und Progression einer Parodontitis wird durch eine Akkumulation des Biofilms auf den Zahnoberflächen und in den

parodontalen Taschen ausgelöst (Harvey, 2017). Hierbei kommt es zu einer Entzündungsreaktion, die lokal in einem Anstieg der Sulkusfluid-Rate, oftmals in Kombination mit Blutung und einem Temperaturanstieg resultiert. Das Sulkusfluid enthält nicht nur Antikörper und neutrophile Granulozyten, die die lokalen Entzündungs- und Immunabwehrprozesse unterstützen, sondern auch Glykoproteine, die Mikroorganismen als Substrat dienen und so fatalerweise einen essentiellen Faktor für das Wachstum vieler anaerober und proteolytisch aktiver Spezies in einem subgingivalen Biofilm darstellen (ter Steeg et al., 1987). Ziel der Zahnmedizin ist es, aus prophylaktischem und therapeutischem Ansatz durch mechanische Reinigung und antimikrobielle Substanzen eine dynamische Balance zwischen dem Wirt Mundhöhle und den Mikroorganismen zu erreichen, um so der Entstehung von Krankheiten wie Karies, Gingivitis und Parodontitis vorzubeugen.

Die intraorale Biofilmbildung ist ein dynamischer und kontinuierlicher Prozess und kann zum besseren Verständnis in einzelne Phasen, die in den nachfolgenden Kapiteln erläutert werden, unterteilt werden (Marsh & Bradshaw, 1995).

Die Pellikel

Die Pellikel ist definiert als eine dünne Schicht auf der Schmelzoberfläche, die sich aus absorbierten Proteinen und Makromolekülen des Speichels und Sulkusfluids zusammensetzt (Sonju & Rolla, 1973; Vacca Smith & Bowen, 2000; Hannig & Joiner, 2006). Die Pellikelbildung ist ein selektiver und dynamischer Prozess und kann in zwei Phasen aufgeteilt werden. Die initiale Adsorption beginnt bereits wenige Sekunden nach Reinigung der Zahnoberfläche und ist charakterisiert durch unmittelbare Anlagerung von Speichelproteinen an die Schmelzoberfläche (Hannig et al., 2005). Nur wenige Minuten später folgt eine vergleichsweise langsamere Phase der Proteinadsorption auf einer Protein-beschichteten Schmelzoberfläche. Die Dicke der Pellikel erreicht nach 30 bis 90 min ein Plateau mit 100–1000 nm, abhängig von der Verfügbarkeit der Speichelproteine und den vorherrschenden intraoralen Bedingungen (Hannig, 1999b; Sonju & Rolla 1973).

In Kontakt mit elektrolythaltigem wässrigem Speichel zeigen die Calcium-Ionen der Schmelzkristalle eine größere Tendenz in Lösung zu gehen als die korrespondierenden Phosphat-Ionen. Daraus resultiert eine negativ geladene Schmelzoberfläche durch die verbliebenen Phosphat-Ionen. Diese Oberfläche wird zunächst von einer positiv-geladenen Schicht aus Calcium-Ionen beschichtet. In der initialen Phase der Pellikelbildung lagern sich so Speichelproteine durch elektrostatische Wechselwirkungen an die entstandene Ionen-Doppelschicht mit ihrer entsprechend gegensätzlich geladenen funktionellen Gruppe an (vgl. [Abb. 1](#)) (Bennick et al., 1979;

Moreno et al., 1982). Die Pellikelbildung erfolgt selektiv und Proteine, die eine hohe Affinität zu dieser Ionen-Doppelschicht aufweisen, bezeichnet man als „Pellikel-Präkursor-Proteine“ (Hannig, 1999b; Hannig et al., 2005; Hannig & Joiner, 2006). Dazu zählen Phosphoproteine mit einer hohen Affinität zu Hydroxylapatit wie Statherine, Histatin und Prolin-reiche Proteine (PRP). Außerdem konnten in der frühen Pellikel Muzine (Muzinglykoproteine I und II), Amylase, Lysozyme, Lactoferrin, Carboanhydrasen und Glykosyltransferasen nachgewiesen werden. Da heutzutage eine große Breite unterschiedlicher Proteine in der frühen Pellikel belegt ist, ist davon auszugehen, dass neben elektrostatischen Anziehungskräften auch Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen im Absorptionsprozess eine Rolle spielen (Hannig et al., 2005). Diese Wechselwirkungen sind treibende Kraft der Thermodynamik, die eine Entropiezunahme durch Austausch der geordneten Wassermoleküle durch absorbierte Proteine an der Schmelzoberfläche anstrebt (Vassilakos et al., 1993; Hannig & Joiner, 2006).

Die zweite Phase der Pellikelbildung ist charakterisiert durch eine langsame kontinuierliche Absorption der Biopolymere aus dem Speichel. Dieser Prozess beruht auf Protein-Protein-Interaktionen zwischen bereits absorbierten Proteinen in der Pellikelschicht und Proteinen sowie Proteinaggregaten des Speichels. Es ist belegt, dass die meisten der von der Parotis ausgeschiedenen Proteine in Form von Protein-Aggregaten mit einem hydrophoben Inneren und einer nach außen negativ-geladenen Oberfläche (Mizellen-ähnliche Struktur) vorliegen (Young et al., 1999). Zusätzlich wurden viele heterotypische Komplexe bestehend aus Speichelmuzinen und anderen Speichelproteinen identifiziert, die sich vor der Absorption auf der Zahnoberfläche bilden. Diese heterotypischen Komplexe bilden ein Reservoir für Pellikel-Präkursor-Proteine und schützen zusätzlich Speichelproteine vor proteolytischem Abbau (Iontcheva et al., 1997; Hannig & Joiner, 2006). Mizellen-ähnliche Aggregate und heterotypische Komplexe werden als „supramolekulare Pellikel-Präkursoren“ bezeichnet (Vitkov et al., 2004; Hannig & Joiner, 2006).

Die Pellikel hat eine große Relevanz bei physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen an der Grenzfläche zwischen Zahnoberfläche und Speichel. Sie wirkt als Lubrikant auf der Zahnoberfläche, Regulator bei De- und Remineralisationsprozessen und als Basis für die Adhärenz der Bakterien. Als Schmierschicht reduziert die Pellikel die Reibung zwischen antagonistischen Zähnen und zwischen Zahn und Schleimhaut. Dadurch schützt sie vor Attrition und Abrasion und ermöglicht ein angenehmes Kauen und Sprechen (Hannig, 2002; Joiner et al., 2008). Als semipermeable Membran spielt die Pellikel eine wichtige Rolle, indem sie Demineralisationsprozesse hemmen und Remineralisationsprozesse erleichtern kann. Sie kann Einfluss

auf die Säurediffusion sowie den Transport von Calcium- und Phosphat-Ionen in und aus der Schmelzoberfläche nehmen. Der Mechanismus zur Regulation der Ionendiffusion ist heute noch nicht vollständig erforscht. Busscher et al. suggerierten anhand von transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen, dass die Pellikel durch ihre poröse, maschenartige Struktur einen Ionenaustausch an der Schmelzoberfläche erlaubt (Hannig, 2002; Busscher et al., 2003). Neben den protektiven Eigenschaften der Pellikel, belegen zahlreiche Studien, dass die Pellikel auch Basis für die Adhärenz der Bakterien und somit essentiell für die Biofilmbildung auf der Zahnoberfläche ist. Viele orale Streptokokken besitzen die Fähigkeit, an Proteine wie α -Amylase, Prolin-reiche Proteine oder Prolin-reiche Glykoproteine zu binden und so als sogenannte Pionierkeime an die Pellikel zu binden. In einem späteren Stadium kommt es dann durch mikrobielle Co-Adhäsion und Ausbildung einer Extrazellulärmatrix zur Reifung eines komplexen Biofilms (Marsh, 2005; Hannig & Joiner, 2006; Hojo et al., 2009).

Interaktionen zwischen Pellikel, Speichel und Bakterien

Nur wenige der in der Mundhöhle vorkommenden Bakterien sind frei beweglich und können sich aktiv fortbewegen. Zumeist werden die Mikroorganismen passiv über den Speichelfluss oder das Sulkusfluid oder Sedimentation zur Zahnoberfläche transportiert. Nähert sich ein Bakterium einer mit Pellikelschicht überzogenen Schmelzoberfläche, führen physikalisch-chemische Kräfte (Van-der-Waals-Kräfte) und hydrophobe Kräfte zur Ausbildung eines schwachen, nichtspezifischen Anziehungsbereiches. Diese Wechselwirkungen sind relativ gering und die Anheftung in dieser Phase ist reversibel (Marsh & Bradshaw, 1995; Hannig & Joiner, 2006; Busscher et al., 2008). Laborstudien haben eine Vielzahl von spezifischen molekularen Interaktionen, die zur Adhäsion erster Bakterien auf der Pellikel-beschichteten Oberfläche führen, identifiziert. Die ersten Bakterien, die an die Zahnoberfläche binden, werden als Pionierkeime bezeichnet. *Streptococcus gordonii* zählt zu diesen frühen Besiedlern. Diese Bakterien binden an saure Prolin-reiche Proteine, die circa 25-30% der Proteinviefalt im Speichel ausmachen. Das α -Amylase-Protein A der Spezies interagiert zusätzlich mit in der Pellikel befindlichen Amylasen und führt so zur Adhäsion der Bakterien an der Zahnoberfläche (Rogers et al., 2001; Hojo et al., 2009). *Streptococcus sanguinis* gehört zu den physiologischen Mikroorganismen in der Mundhöhle nach dem Zahndurchbruch. Ein Komplex aus sekretorischem Immunglobulin A und α -Amylase ist für die frühe Adhäsion verantwortlich. (Gong et al., 2000; Hojo et al., 2009). Andere Bakterien wie *Streptococcus oralis* exprimieren auf ihrer Oberfläche Lektine, die Kohlenhydratstrukturen wie Galaktosidverbindungen erkennen und so über Liganden-Rezeptor-Verbindungen an die Pellikel binden können (Shibata et al., 1979; Marsh & Bradshaw,

1995). Auch Aktinomyzeten gehören zur Gruppe der primären Besiedler im Prozess der Biofilmbildung. An ihrem Kolonisierungsprozess sind vor allem Lipoteichonsäuren und die Fimbrien der *Actinomyces spp.* beteiligt. Typ-1 Fimbrien der *Actinomyces naeslundii* binden an Speichelproteine wie Statherine oder PRPs und bilden so eine sehr stabile Bindung zur Pellikel aus (Marsh & Bradshaw, 1995; Palmer et al., 2003). Neben ihrer spezifischen Bindung hängt die Ansiedlung vieler oraler Bakterien auch von ihrer Konzentration im Speichel ab. Diese primäre Kolonisierung nimmt einen Zeitraum von circa 2 Stunden nach der Zahnreinigung in Anspruch (Martin & Marsh, 2003).

Co-Aggregation durch Bakterien-Interaktion

Planktonische Bakterien, die die Pellikel-bedeckte Zahnoberfläche nicht direkt besiedeln können, binden über Rezeptoren an die Zelloberfläche der Pionierkeime, die bereits an der Pellikel adhären. Dieser als Co-Aggregation bezeichnete Vorgang beruht auf spezifischen Zell-Zell-Interaktionen und ist ein grundlegender Mechanismus im Rahmen der Biofilmbildung (Kolenbrander et al., 2002; Hojo et al., 2009). Orale Bakterien exprimieren auf ihrer Oberfläche viele Adhäsion-Moleküle, die ihnen verschiedene Interaktionen ermöglichen. Ein Oberflächenprotein der *Streptococcus gordinii* kann zur primären Adhäsion an Speichelproteine der Pellikel binden und gleichzeitig an einen Rezeptor auf der Oberfläche einer Zelle der *Actinomyces naeslundii* (Jenkinson et al., 1993; Marsh & Bradshaw, 1995). *Actinomyces spp.* haben zwei genetisch und funktionell unterschiedliche Arten der Fimbrien. Typ 1 Fimbrien erkennen Speichelproteine, Typ 2 Fimbrien können Lektin-ähnliche Verbindungen mit Streptokokken eingehen und so die Co-Aggregation unterstützen (Cisar et al., 1984; Marsh & Bradshaw, 1995). *Porphyromonas gingivalis*, ein typisches Parodontalpathogen, kann über das FimA-Protein auf seinen langen Fimbrien an eine Glyceraldehyd-3-Dehydrogenase auf der Oberfläche der *Streptococcus oralis* binden (Maeda et al., 2004). *Fusobacterium nucleatum* kann Co-Aggregate zu vielen oralen Bakterien, wie Streptokokken und obligate Anaerobier eingehen und spielt eine Schlüsselrolle in dieser Phase der Biofilmbildung, indem es eine Brücke zwischen den Pionierkeimen und Spätbesiedlern schafft (Kolenbrander et al., 2002). Die Vernetzung der einzelnen Bakterien und Bakterienaggregate ermöglicht nicht nur das räumliche Wachstum des Biofilms und der Vielfalt der Mikroflora, sondern auch weitere Formen der Zell-Zell-Kommunikation, den Austausch von Genen, Signalen und Stoffwechselprodukten (Hojo et al., 2009).

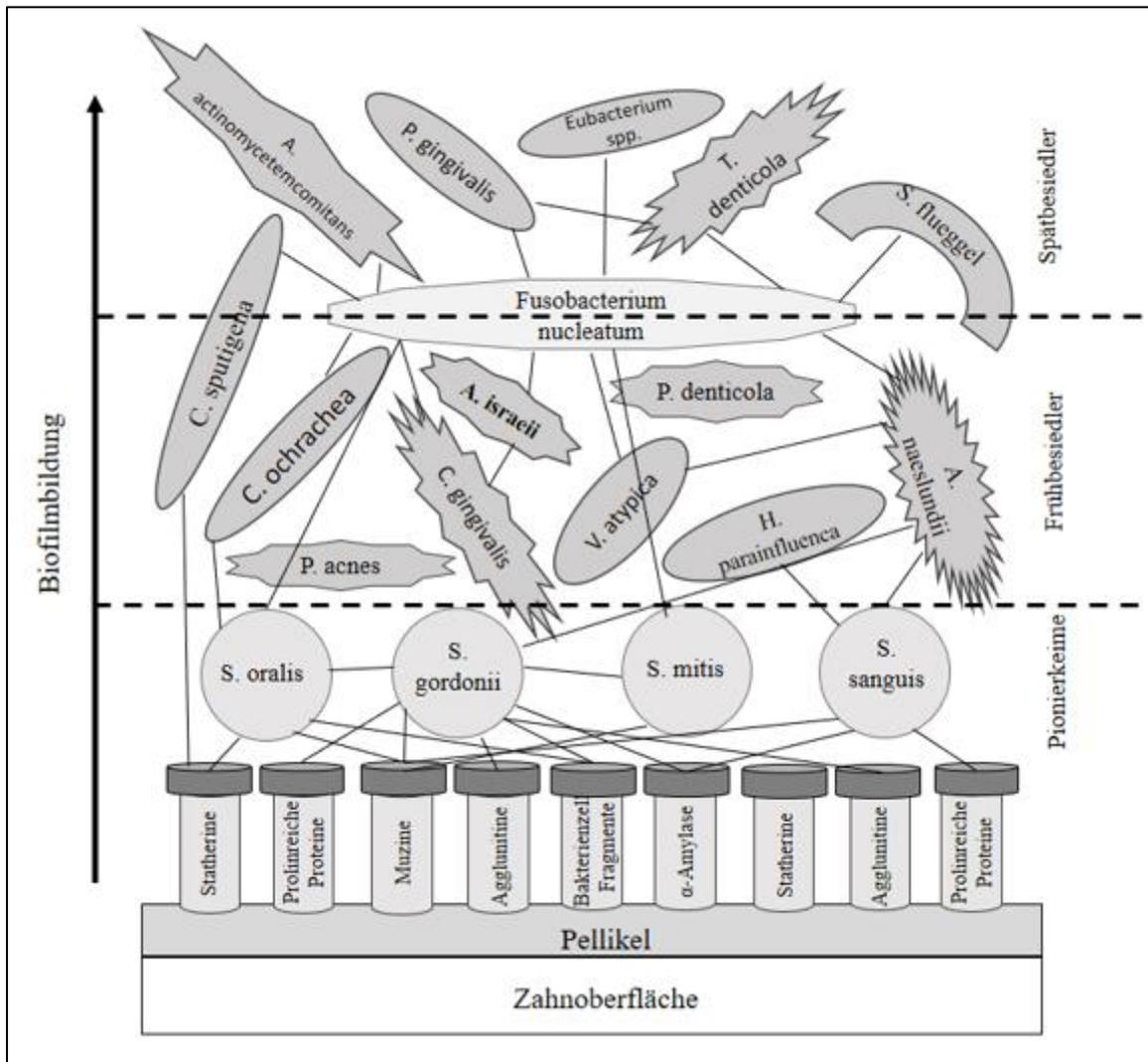


Abbildung 1: Schematische Darstellung der bakteriellen Kolonisierung zeigt Pionierkeime, die an Rezeptoren der Pellicel binden; Co-Aggregation zwischen Pionierkeimen, Fusobakterien und Spätbesiedlern auf der Zahnoberfläche (modifiziert nach Kolenbrander et al., 2002).

Entwicklung zum mikrobiellen Biofilm

Das Wachstum des Biofilms innerhalb der ersten 24h beruht neben einer weiteren kontinuierlichen Anhaftung der Mikroorganismen sowie auf Zellteilung und Proliferation, die zur Bildung von Mikrokolonien führt (Hannig, 1998). Ein wichtiger Bestandteil aller proliferierender Biofilme ist die Synthese extrazellulärer Polysaccharide (EPS) durch die Verstoffwechslung von Saccharose-Molekülen mit Glykosyltransferasen adhärenter Bakterien (Bowen & Koo, 2011; Flemming et al., 2016). Diese Polymere umfassen unlösliche Glukane sowie lösliche Glukane und Fruktane, die durch weitere Bakterienspezies metabolisiert werden können (Marsh & Bradshaw, 1995). Abhängig von der vergangenen Zeit der letzten Nahrungsaufnahme machen Glukane circa 10-20%, Fruktane circa 1-2% des Trockengewicht der Plaque aus (Bowen & Koo,

2011). Die Matrix ist ein gemeinsames Merkmal aller Biofilme und mehr als ein chemisches Gerüst zur Aufrechterhaltung der Biofilmmasse (Donlan & Costerton, 2002; Marsh, 2005;). Sie hat eine wichtige Rolle in der Entwicklung pathogener Eigenschaften des Biofilms. Eine großzügig ausgebildete Extrazellulärmatrix kann zu einem stark erhöhten Kariespotential an der Zahnoberfläche führen. In einer dicken Plaqueschicht ermöglichen EPS Zuckermolekülen in tiefere Schichten des Biofilms einzudringen. Durch Verstoffwechslung dieser durch säurebildende Streptokokken der Mutans-Gruppe fällt der pH-Wert an der Plaque-Schmelz-Grenze stark ab. Dies bestätigt eine Studie, die in Abhängigkeit der unterschiedlichen Verteilung von *Streptococcus mutans* und EPS eine maximale Demineralisation der Schmelzoberfläche bei einer Plaquezusammensetzung von 95% EPS und nur 5% Bakterien beobachtete (Zero et al., 1986; Marsh et al., 2011).

Reifung zur Plaque

Nach 2-4 h der Plaque-Bildung können hauptsächlich Zellen grampositiver Streptokokken der Population *S. sanguis*, *S. oralis* und *S. mitis* sowie Actinomyzeten auf der Pellikel-bedeckten Schmelzoberfläche identifiziert werden. Obligat anaerobe Bakterien kann man in diesem Stadium nur selten nachweisen. Mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte man sowohl Bereiche mit Palisaden, in denen Kokken und Filamente parallel und im rechten Winkel zur Schmelzoberfläche angeordnet sind, als auch Mikrokolonien erkennen. Verbindungen, in denen Kokken entlang filamentartiger Organismen angeordnet sind, bezeichnet man als Maiskolben (Martin & Marsh, 2003). Nach 1-2 Tagen sind auch grampositive Stäbchen außerhalb der Mikrokolonien der Kokken-Bakterien zu erkennen. Ist die Plaquebildung mehrere Tage fortgeschritten, ändert sich die Morphologie und Bakterienvielfalt der Mikroflora. Es gibt eine Verschiebung vom Streptokokken-dominierten Biofilm zu einem großen Aufkommen an Actinomyceten. In der Tiefe des Biofilms kommt es zur Abnahme des Redoxpotentials und Sauerstoffgehalts, was das Wachstum obligat anaerober Bakterien begünstigt. Direkt auf der Zahnoberfläche befindet sich eine Schicht dicht gepackter Bakterien, darüber eine Schicht variabler Struktur und Morphologie mit einer ausgeprägten extrazellulären Matrix. In der oberflächlichen Schicht befindet sich eine große Vielfalt unterschiedlicher Bakterienpopulationen. Kann die Plaque ungehemmt auf der Zahnoberfläche über 2-3 Wochen wachsen, stabilisiert sich eine relativ konstante Bakteriengemeinschaft. Der Biofilm kann abhängig von den Scherkräften durch Speichelfluss und Ernährung eine Dicke von 50-100 µm erreichen (Nyvad & Kilian, 1987; Marsh & Bradshaw, 1995; Martin & Marsh, 2003).

2.1.2 Biofilmmodelle

Das Erstellen eines vitalen und natürlichen Biofilmmodells stellt auch heutzutage noch eine Herausforderung für Wissenschaftler der Mikrobiologie und Zahnmedizin dar (Klug et al., 2016). Der orale Biofilm als ein individuelles Mikrobiom in einer komplexen Matrix wird von vielen externen Faktoren wie Speichelfluss, Temperaturschwankungen, pH-Wert-Änderungen, Stress, Immunantwort und Nahrungsaufnahme beeinflusst (Rittman, 1982; Saunders & Greenman, 2000; Aas et al., 2005; Paster et al., 2006; Hannig & Hannig, 2009). Es ist nahezu unmöglich, all diese Einflussfaktoren als modellierbare Parameter in ein Biofilmmodell zu integrieren. Dennoch wurden zahlreiche *In-vitro*-, *In-vivo*- und *In-situ*-Modelle entwickelt, die unterschiedlichen wissenschaftlichen Fragestellungen dienen.

In-vitro-Modelle finden in experimenteller Umgebung, d.h. außerhalb des lebenden Organismus statt und können in investigative und replikative Modelle unterteilt werden (Gilbert, 1995). Investigative Modelle dienen einer Simplifizierung, indem sie sich auf bestimmte Parameter konzentrieren, die einen Einfluss auf Struktur und Funktion der Biofilme haben. Die einfachste Form stellen Schüttelkulturen mit planktonischen Zellen dar. Studien zur Wirksamkeit antimikrobieller Substanzen sollten nur mit Bedacht in *In-vitro*-Modellen mit planktonischen Zellen durchgeführt werden. Die Organisation der Mikroorganismen in strukturierten Biofilmen hat einen erheblichen Einfluss auf die Resistenzentwicklung gegenüber antimikrobiellen Substanzen (Anwar et al., 1992; Costerton, 1995). Werden Umgebungsfaktoren wie Temperatur, pH und Sauerstoffpartialdruck sowie biochemische und mechanische Reize möglichst nahe dem natürlichen Mundhöhlenmilieu eingestellt, spricht man von replikativen Modellen. Solche *In-vitro*-Studien können Interaktionen der Bakterien und Matrix simulieren und stellen so eine bessere Methode zur Bewertung potentiell aktiver Substanzen dar. Eigenschaften wie die Fähigkeit desinfizierender Substanzen zur Haftung auf der Pellikel-bedeckten Zahnoberfläche oder auf der Oberfläche der oralen Weichgewebe können dennoch nicht erfasst werden (Cummins & Creeth, 1992)

Um die Komplexität des Biofilms und die klinischen Effekte antimikrobieller Substanzen besser zu verstehen, ist eine Untersuchungsmethode nötig, die Biofilme direkt in der natürlichen Mundhöhle generiert (Auschill et al., 2005; Hannig & Hannig, 2009). In sogenannten *In-situ*-Modellen können Prüfkörper in der Mundhöhle mit Hilfe von Teilprothesen oder Kunststoffschienen fixiert werden und wieder einfach entnommen werden. Als Träger sind humane oder bovine Schmelz- und Dentinprüfkörper sowie wie Glas- oder Plastikplättchen denkbar (Hannig, 1999b; Arweiler et al., 2004; Auschill et al., 2005). *In-situ*-Testverfahren müssen stets

garantieren, dass eine potentielle Schädigung der Probanden auszuschließen ist und von einer Ethikkommission genehmigt werden. Reproduzierbarkeit und Objektivität werden durch interindividuelle Unterschiede zwischen den Probanden in Bezug auf die mikrobielle Ausgangsflora, die Mundhygiene und den Tragekomfort erschwert (Sissons, 1997).

Optimal wäre es, einen Biofilm direkt *in vivo* am natürlichen Ort in der Mundhöhle zu entnehmen, wie beispielsweise in einer approximalen Nische oder als subgingivale Plaque in einer parodontalen Tasche. Das Lösen der Plaqueschicht stellt sich allerdings aufgrund der geringen Dicke und Stabilität des Biofilms als schwierig dar (Robinson et al., 1997). Da bei der Analyse des Biofilms meist potentiell toxische Materialien verwendet werden, ist eine direkte Untersuchung in der Mundhöhle nur eingeschränkt möglich.

Zum Nachweis einzelner Bakterien oder bakterieller Kolonien eignen sich die die Fluoreszenzmikroskopie, die konfokale Lasermikroskopie, die Elektronenmikroskopie oder Kulturtechniken (Nyvad & Kilian, 1987; Davey & O'Toole, 2000).

Zur Untersuchung der Morphologie komplexer Biofilme stellen elektronenmikroskopische Aufnahmen die Methode der Wahl dar. Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) ermöglicht eine hochauflösende Darstellung von Oberflächenstrukturen (Hannig, 1998). Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) können einzelne Schichten in der Tiefe des Biofilms bis in den Nanometerbereich eingesehen werden. Alle Proben müssen zunächst in aufwendigen Fixierungsprozessen vorbereitet werden. Feuchte Biofilmproben werden in einem mehrstufigen Verfahren dehydriert. Für die TEM müssen die Prüfkörper zusätzlich in Kunststoff eingebettet und anschließend in ultradünne Schichten geschnitten werden (Hannig, 1999c). Dadurch können Veränderungen der komplexen Struktur und der Organisation des Biofilms sowie Artefakte entstehen (Donlan & Costerton, 2002).

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen stellen im Gegensatz dazu eine einfache Methode zur Quantifizierung adhärenter Bakterien auf Prüfkörperoberflächen dar. Zusätzlich können mit geeigneten Färbelösungen Bakterien entsprechend ihrer Vitalität eingefärbt werden. Dies ist besonders bei Fragestellungen nach der Wirksamkeit antimikrobieller Substanzen interessant (Tawakoli et al., 2013).

2.1.3 Plaquekontrolle

Die Mikroorganismen der Mundhöhle spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der physiologischen Mundgesundheit, aber auch in der Ätiologie oraler Erkrankungen wie Karies, Gingivitis und Parodontitis (Kumar et al., 2005; Marsh, 2006). Viele Bakterienspezies sind harmlos und können präventive Aufgaben in der Mundhöhle übernehmen. Sie haben eine harmonische Beziehung zu ihrem Wirt und nutzen endogene Nährstoffe bei geringer Säureproduktion für Zellteilung und Wachstum. Ihre Etablierung schützt die Zahnflächen vor der Kolonisierung exogener Pathogene, indem sie antimikrobielle Substanzen wie Wasserstoffperoxide oder Bakteriozine produzieren (van Hoogmoed et al., 2008; Kleist & Callaway, 2013). Kommt es durch erhöhten Zuckerkonsum, unzureichende Mundhygiene oder einer geringen Speichelflussrate zu einer Störung des mikrobiellen Gleichgewichts, passen sich die Bakterienkolonien an die veränderten Umweltbedingungen an und es kommt zur Proliferation spezifischer pathogener Spezies (Hojo et al., 2009). Ziel ist es, mit geeigneten mechanischen und chemischen Substanzen die Bakterienproliferation einzuschränken und so die physiologische Mundflora zu erhalten.

Die nachweislich effektivste Methode zur Entfernung des Biofilms ist die mechanische Reinigung durch das Zähneputzen oder die Anwendung von Zahnseide und Interdentalbürstchen, sodass anschließend nur eine dünne Schicht von ungeordnetem Biofilm verharret (Kolahi & Soolari, 2006; van der Weijden & Slot, 2011). Dies schafft einen optimalen Angriffspunkt für antimikrobielle Substanzen, wie sie in typischen Mundhygieneartikeln in Form von Zahnpasten, Gels oder Mundspüllösungen enthalten sind (Marsh, 2010).

Antimikrobielle Mittel können die Biofilmbildung hemmen, den bereits etablierten Biofilm lösen oder individuelle Mikroorganismen des Biofilms zerstören (Auschill et al., 2005). Für die chemische Plaquehemmung sollten Mittel verwendet werden, die spezifisch gegen die hauptsächlich mit Karies und Gingivitis assoziierten Keimarten wirksam sind (Schiffner, 1995). Um die Wirkstärke der antimikrobiellen Substanzen zu bestimmen, wird *in vitro* die minimal inhibitorische Konzentration (MIC) bzw. die minimal bakterizide Konzentration (MBC) durch Kontakt des Agens mit einer reinen Kultur spezifischer planktonischer Zellen bestimmt. Jedoch zeigen Bakterien in einem Biofilmgefüge durch ihre strukturelle Organisation und die Fähigkeit zur Genexpression bei sich ändernden Umweltbedingungen eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen (Marsh, 2005). Wegen der primär nur kurzen Kontaktzeit zur Plaque ist eine verlängerte Verfügbarkeit der Substanzen durch reversible Bindung an orale Strukturen, ohne dass die Substanzen an Wirksamkeit verlieren, wünschenswert. Die

Substantivität, die als Wirkdauer eines Stoffes *in situ* definiert ist, ist somit ausschlaggebend zur Beschreibung der Effektivität antimikrobieller Substanzen *in situ* (Brex, 1997). Aufgrund der vielen Bestandteile einer kommerzieller Zahnpasten wie Poliermittel, Detergenzien, Aromen, Konservierungsmittel oder Feuchthaltemittel kann es zur gegenseitigen Inaktivierung einzelner Wirkstoffgruppen kommen. Ein Beispiel hierfür ist die Wechselwirkung zwischen dem Detergenz Natriumlaurylsulfat und Chlorhexidin, die in vielen Studien diskutiert wird (Elkerbout et al., 2016). Beiden wird aber auch eine plaquereduzierende Wirkung zugeschrieben, so dass die Wirksamkeit einer einzelnen Substanz immer im Zusammenhang des gesamten Wirkstoffkomplexes einer Zahnpastaformulierung betrachtet werden sollte (Arweiler et al., 2002).

2.1.4 Chlorhexidin

Chlorhexidin (CHX) ist ein wichtiger antimikrobieller Wirkstoff mit einer Vielzahl von Anwendungsgebieten im medizinischen, dentalen und pharmazeutischen Bereich (Russell & Day, 1993; Kaur et al., 2015). Aufgrund seines antibakteriellen Effekts, seiner Substantivität oder der geringen Toxizität findet Chlorhexidin seit mehr als 40 Jahren Anwendung in Mundspüllösungen, Gels oder Zahnpastaformulierung zur Therapie der Gingivitis und Parodontitis (Brex, 1997) und wird als Goldstandard der chemischen Plaquekontrolle angesehen (Jones, 1997).

Struktur CHX ist ein kationisches Bisbiguanid und wird zumeist als Salz der Dihydrochloride, Diacetate oder Digluconate angewandt. Chlorhexidin ist eine starke Base, bei physiologischem pH-Wert dissoziiert das Salz und ein zweifach positiv geladenes Chlorhexidin-Dikation wird freigesetzt. Das Molekül ist symmetrisch aufgebaut und besitzt je zwei Chlorophenyl- und Biguanid-Gruppen, die durch eine zentrale Hexamethylen-Kette verbunden sind (Kaur et al., 2015).

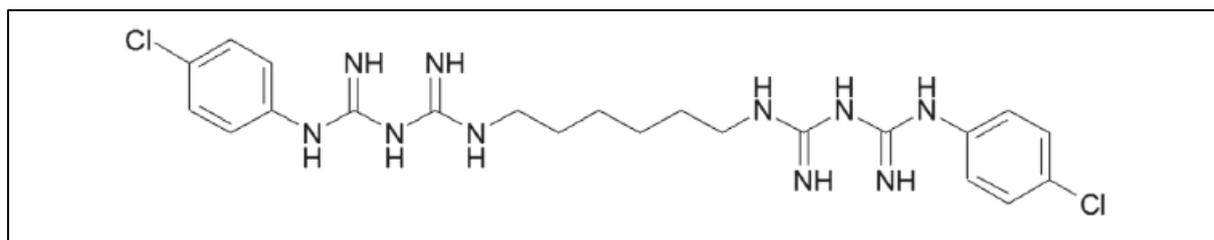


Abbildung 2: Chemische Struktur eines Chlorhexidin-Moleküls (<https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Chlorhexidin.svg>)

Wirkmechanismus: Der antibakterielle Effekt beruht auf der Bindung des kationischen Moleküls an die negativ geladene Zellmembran der Bakterien (Kaur et al., 2015). Die bakterielle Zellmembran verliert ihre Integrität und Chlorhexidin wird zur inneren Zellmembran angezogen. Dort bindet es an Phospholipide der inneren Zellmembran und führt so zu einer Erhöhung

der Membranpermeabilität für niedermolekulare Komponente wie Kalium-Ionen. In dieser bakteriostatischen (subletalen) Stufe sind alle Vorgänge reversibel und die Bakterienzelle kann sich nach Entfernung des Chlorhexidins und Neutralisation wieder erholen. Dies impliziert, dass Chlorhexidin ab einer für jede Bakterienspezies spezifischen Konzentration zur vollständigen Lyse der Bakterienzelle führt und somit bakterizid wirken kann (Jones, 1997; Varoni et al., 2012). Chlorhexidin wirkt bevorzugt gegen gram-positive Bakterien. Während *Streptococcus mutans* eine hohe Sensitivität gegenüber CHX zeigt, scheinen *Streptococcus sanguinis* als Pionierkeime der Biofilmbildung eine relative Resistenz aufzuweisen (Emilson, 1994). Erst bei höheren Konzentrationen wirkt Chlorhexidin gegen gram-negative Organismen, fakultative Anaerobier und Hefepilze (Sheiham, 1991; Varoni et al., 2012). Neben dem antibakteriellen Effekt ist die hohe Substantivität des Chlorhexidins entscheidend für die Wirksamkeit. Nach einminütigem Spülen mit 10ml einer 0,2%igen Chlorhexidin-Lösung verbleiben durchschnittlich 30% des Wirkstoffes in der Mundhöhle (Gjeramo et al., 1974; Bonesvoll, 1977). Diese Eigenschaft beruht auf der hohen Affinität des kationischen Moleküls zu den negativ geladenen Carboxylgruppen der Muzine und Speichelproteine der Pellikel auf der Zahnoberfläche und den Schleimhäuten. Eine Ablösung erfolgt durch sekretorische Calcium-Ionen der Speicheldrüsen (Greenstein et al., 1986). Der antibakterielle Effekt des Chlorhexidin ist somit das Resultat einer kurzzeitigen bakteriziden Wirkung, gefolgt von einer anhaltenden bakteriostatischen Wirkung aufgrund seiner Fähigkeit zur Bindung auf Zahnoberflächen und Schleimhäuten mit hoher Substantivität (Russell & Day, 1993; Jones, 1997; Varoni et al., 2012). Rolla und Melson (1975) postulierten zudem, dass Chlorhexidin nach Desorption von der Mundschleimhaut über 3 Mechanismen die Plaquebildung hemmen kann. Zum einen blockiert es die Säuregruppen der Speichelproteine und reduziert so die Proteinabsorption auf der Zahnoberfläche. Die Pellikelbildung wird dadurch gehemmt. Außerdem hemmt es durch den beschriebenen antibakteriellen Effekt die Adsorption der Bakterien auf der Zahnoberfläche oder die Akkumulation in bereits entstandener Plaque. Zum anderen hemmt Chlorhexidin die Plaquebildung durch Ausfällung der Agglutinations-Faktoren im Speichel und dem Ersatz der Calcium-Ionen in der Plaquematrix (Rolla & Melsen, 1975). Studien haben zudem Chlorhexidin einen Karies-hemmenden Effekt zugeschrieben. Chlorhexidin ist in der Lage, die Säureproduktion in etabliertem Biofilm unter experimentellen Bedingungen *in situ* zu hemmen (Loe et al., 1972; Zickert et al., 1982; Zhang et al., 2006). Acidophile und kariogene Bakterien wie *Streptococcus mutans* finden so weniger günstige Bedingungen für Wachstum und Proliferation im Biofilm vor (Oppermann, 1979).

Nebeneffekte. Eine Vielzahl klinischer Studien beschreibt das Vorkommen von Nebeneffekten bei der Verwendung von Chlorhexidin in der Mundhöhle. Alle im Folgenden beschriebenen Effekte sind nach Abbruch der Behandlung mit Chlorhexidin vollständig reversibel. Ein vielfach beschriebener Nebeneffekt bei längerer Anwendung von Chlorhexidin-haltigen Mundspüllösungen ist eine braune Verfärbung der Zähne, restaurativer Materialien, der Schleimhaut und des Zungenrückens. Das Ausmaß der Verfärbungen scheint von der Art der Applikation und der Konzentration abhängig zu sein (Flotra et al., 1971; Claydon et al., 2006; van Strydonck et al., 2012). Zahnpasten und Mundspüllösungen mit CHX haben einen bitteren Geschmack, der zu vorübergehenden Veränderungen der Geschmackswahrnehmung (Dysgeusie) führen kann (Addy et al., 1989; Kaur et al., 2015). Objektive Untersuchungen der Geschmacksempfindung haben eine Missempfindung auf die Wahrnehmung von süß und vornehmlich salzig bestätigt (Lang et al., 1988). In Einzelfällen wurde außerdem von Entzündungen der Schleimhaut berichtet (Gjeramo et al., 1974). Darüber hinaus kann Chlorhexidin die supragingivale Zahnsteinbildung fördern. Dieser Effekt ist vermutlich auf die Ausfällung von Speichelproteinen auf der Zahnoberfläche zurückzuführen (Slot et al., 2014).

Anwendung: Die plaquehemmende Wirkung von Chlorhexidin wurde erstmals 1969 von Schröder beschrieben. Im darauffolgenden Jahr führten Loe und Schiott die erste klinische Studie durch. Diese Studie zeigte, dass zweimal tägliches Spülen mit 10ml einer 0,2 %-igen Chlorhexidingluconat-Lösung für 60 s, in Abwesenheit einer mechanischen Reinigung der Zähne, das Plaquewachstum und die Entstehung einer Gingivitis hemmt (Loe & Schiott, 1970). Zahlreiche Studien folgten, die unterschiedliche Anwendungsformen und Konzentrationen in Bezug auf eine plaquehemmende Wirkung und Verfärbungen untersuchten (Jenkins et al., 1994; Hoffmann et al., 2001; Olympio et al., 2006; Slot et al., 2007; Slot et al., 2014; Supranoto et al., 2015). Chlorhexidin ist heutzutage in Form von Mundspüllösungen, Gels und als Bestandteil von Zahnpastaformulierungen kommerziell erhältlich. CHX-haltige **Mundspüllösungen** werden zur primären und sekundären Prävention von Parodontalerkrankungen und Karies empfohlen (Varoni et al., 2012). Ihre Verwendung führt v.a. bei Patienten, die im Alltag nicht zur ausreichenden Mundhygiene fähig sind, zu einer Abnahme von Plaque und Entzündung der Gingiva (Silverman & Wilder, 2006; Barnett, 2006). In Europa wurde eine 0,2%ige CHX-Lösung entwickelt, die heutzutage als Standardkonzentration für Mundspüllösungen angesehen wird (Franco Neto et al., 2008; Berchier et al., 2010). Des Weiteren sind Präparate zur Applikation von CHX in Form von **Gelen** erhältlich. Nachteilig ist hier die unzureichende Verteilung des Gels und somit des Wirkstoffes in der Mundhöhle und auf den Zahnoberflächen, sodass

Gele zumeist gezielt zur lokalen Applikation in die parodontale Tasche verwendet werden und so effektiv eine systematische Parodontitistherapie unterstützen (Saxen et al., 1976; Vinholis et al., 2001; Slot et al., 2010). Unter dem Aspekt, dass das zweimal tägliche Putzen mit einer Zahnpaste für die meisten Menschen der westlichen Bevölkerung zur täglichen Mundhygienearoutine zählt, ist es naheliegend, CHX in **Zahnpasten** zu integrieren (Slot et al., 2014; van der Weijden & Slot, 2011). Die Wirksamkeit wurde erstmals in einer *non-brushing* Studie nachgewiesen, in der die Anwendung einer Chlorhexidin-haltigen Zahnpasta in einer signifikanten Plaque – und Gingivitisreduktion im Vergleich zu einer Placebo-Paste resultierte (Putt et al., 1993; Slot et al., 2014). Nach einer Publikation von Barkvoll et al. 1989, in der eine *In-vivo*-Studie zeigt, dass die Wirkung von CHX durch Interaktionen mit anionischen Bestandteilen in Zahnpasten wie Natriumlaurylsulfat (SLS) signifikant gehemmt wird, sank das Interesse an der Integration von CHX in Zahnpasten. Es wurde eine Empfehlung ausgesprochen, CHX nicht mit SLS-haltigen Pasten zu kombinieren und nach dem Zähneputzen einen Zeitraum von mindestens 30 Minuten zu wahren, bevor eine Chlorhexidin-haltige Mundspüllösung angewandt wird (Barkvoll et al., 1989; Kolahi & Soolari, 2006). So gibt es nur wenige Studien, die dennoch einen plaquereduzierenden Effekt CHX-haltiger Zahnpasten nachweisen (Jenkins et al., 1993; Yates et al., 1993; Sanz et al., 1994; Rathe et al., 2007).

2.1.5 Metall-Ionen

Metallsalzen wird eine antimikrobielle Wirkung zugeschrieben. Studien belegen, dass verschiedene Metall-Ionen in der Lage sind, die Plaquebildung zu hemmen (Skjorland et al., 1978; Waerhaug et al., 1984). Polyvalente Kationen wirken vorrangig im Adsorptionsprozess über eine Interaktion mit negativ geladenen Komponenten des Biofilms. Darüber hinaus können sie durch Oxidationen von Thiolgruppen die Aktivität bakterieller Enzyme hemmen. Die Azidogenität des Biofilms wird dadurch gesenkt (Oppermann et al., 1980). Goudouri et al. (2014) publizierten eine Übersichtsarbeit zum Einsatz von Metall und Metallionen in der Therapie chronischer Parodontitis und Periimplantitis. Dazu zählen zumeist Silber, Zinn, Zink, Kupfer, Gold oder Aluminium (Spacciapoli et al., 2001). Insbesondere Zinkverbindungen kommen in aktuellen antierosiv wirkenden Zahnpflegeprodukten zur Anwendung (Ganss et al., 2011). Zinnfluorid wird in Mundpflegeprodukten zur Prävention von parodontalen Erkrankungen eingesetzt (z.B. Meridol®).

In der durchgeführten Untersuchung wurde der Schwerpunkt auf die biofilminhibierende Wirksamkeit von Aluminiumverbindungen gelegt. Deshalb wird im Folgenden die Wirkungsweise von Aluminiumverbindungen in Zahnpastaformulierungen beschrieben.

Die antimikrobielle Wirkung von Aluminium wurde unter Verwendung digitaler Bildanalysen dentaler Plaque sowie der Auswertung von Gingiva-Index, Plaque-Index, Verfärbungen und Zahnsteinbildungen nachgewiesen (Rathe et al., 2007; Bellamy et al., 2009; Bellamy et al., 2011).

Aluminium-Lactat ist ein Salz der Milchsäure und weist adstringierende, Protein-koagulierende und schwache hämostatische Eigenschaften auf (Fiedler, 1967). Protein-Koagulation führt zu einer oberflächlichen Koagulationsmembran, die wiederum eine adstringierende Wirkung in tieferen Teilen des Gewebes induziert (Goodman et al., 1955). Es wird suggeriert, dass diese Koagulationsmembran die Gingiva kurzzeitig vor externen Irritationen schützen kann (Fiedler, 1967). Aluminium-Lactat wirkt so entzündungshemmend und blutstillend. Bei einer Konzentration von 0,5% wirkt Aluminium-Lactat als Adstringens für circa 3-4 Stunden (Wannemacher, 1964; Rathe et al., 2007).

Aluminiumfluorid (AlF_3) ist ein lösliches Salz mit einem dreifach positiv geladenen Kation. Da es den selben Fluoridgehalt wie andere gebräuchliche Fluoridkomponenten (z.B. NaF) bereitstellt, vereint es die remineralisierende Eigenschaft des Fluorids mit der antimikrobiellen Eigenschaft des Aluminiums (Meyer-Lueckel et al., 2015). Studien belegen einen synergistischen kariostatischen Effekt von Aluminium und Fluorid (Kleber & Putt 1984, 1992). Das positiv geladene Aluminium-Ion wird in die Schmelzoberfläche aufgenommen und kann Calcium-Ionen in Hydroxyapatit-Kristallen ersetzen und so einen stabileren Komplex als CaHPO_4 bilden.

2.2 Ziel der Arbeit / Fragestellung

Chlorhexidin gilt als Goldstandard der antimikrobiellen Wirkstoffe in der Zahnmedizin (Kaur et al., 2015; Putt et al., 1993). Darüber hinaus sind verschiedene Metallsalze in der Lage, die Biofilmbildung zu hemmen (Skjorland et al., 1978). Klinische Studien weisen für eine mit Aluminium-Lactat und Chlorhexidin versetzten Zahnpasta einen plaquehemmenden und gingivitisreduzierenden Effekt nach (Rathe et al., 2007; Bellamy et al., 2009, 2011).

Ziel dieser Studie war es, in einem *In-situ*-Biofilmmodell die Wirkung von Zahnpasten mit Chlorhexidin und Aluminium-Ionen, einzeln sowie in Kombination, auf die initiale Biofilmbildung zu untersuchen. Mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen sollte der Einfluss kommerzieller und experimenteller Zahnpastaformulierungen auf die adhärenen Bakterien durch Bestimmung der Biofilmbedeckung und -vitalität erfasst werden. Die Rasterelektronenmikroskopie sollte darüber hinaus eine morphologische Beschreibung des *in situ* gewonnenen Biofilms unter dem Einfluss der Zahnpastaformulierungen ermöglichen.

3 Material und Methode

3.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine mono-zentrische, hypothesengenerierende experimentelle Studie. Das Studiendesign wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes mit einer Erweiterung eines vorliegenden Votums (Kennnummer 238/03) genehmigt.

3.2 Probanden

An der Studie nahmen sechs freiwillige Probanden im Alter von 21-25 Jahren teil. Zur Auswahl wurden ein kariesfreies, voll bezahntes Gebiss, ein gesunder Parodontalzustand und eine normale Salivation vorausgesetzt. Alle Probanden zeigten eine ausgewogene Ernährung, keinen übermäßigen Konsum an polyphenolhaltigen Getränken oder Lebensmitteln und sind Nichtraucher. Allgemeinerkrankungen oder regelmäßige Medikamenteneinnahme führten zum Ausschluss. Eine mögliche Antibiotika-Therapie sollte mindestens 6 Monate zurückliegen. Alle Probanden wurden über den Versuchsablauf aufgeklärt und stimmten schriftlich der Teilnahme zu.

3.3 Zahnpastaformulierungen

Zur vorliegenden Studie wurden Zahnpasten verwendet, die von der Firma Dr. Theiss Naturwaren GmbH bereitgestellt wurden. In der folgenden [Tabelle 1](#) sind die Pasten mit ihren prozentualen Bestandteilen aufgelistet. Putzen mit Wasser (W) diente als Kontrolle.

Tabelle 1: Bestandteile der Zahnpasten

Paste	Abkürzung	Bestandteile
Basispaste	B-P	PEG 32, Sorbitol, Hydraxyethylzellulose, SiO ₂ , TiO ₂ , SLS (NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄)
Chlorhexidin-Basispaste	B-CHX-P	B-P + CHX 0,05%
Aluminium-Lactat-Paste (Lacalut white)	AL1-P	B-P + Al-Lactat (C ₉ H ₁₅ AlO ₉) 0,8%; NaF 1360ppm,
Aluminium-Lactat-Chlorhexidin-Paste (Lacalut extra sensitiv)	AL1-CHX-P	PEG 32, Sorbitol, Hydraxyethylzellulose, SiO ₂ , TiO ₂ , Cocamidopropyl, Al-Lactat (C ₉ H ₁₅ AlO ₉) 0,8%; NaF 1360ppm; Olaflur (C ₂₇ H ₆₀ F ₂ N ₂ O ₃)
Aluminium-Lactat-Aluminium-Fluorid-Aluminium-Hydroxid Chlorhexidin-Paste (Lacalut aktiv)	AL3-CHX-P	AL1-P + CHX 0,05%, AlF ₃ 1360ppm, Al(OH) ₃

3.4 Herstellung der Schienen

Für alle Probanden wurden individuelle Schienen zur Montage der Prüfkörper im ersten und zweiten Quadranten angefertigt. Nach Abformung des Oberkiefers mit einem irreversibel elastischen Abformmaterial (Alginat Blueprint, Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Deutschland) wurden Modelle aus Superhartgips der Klasse IV (Die-Stone, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) hergestellt. Die Miniplast-Schienen wurden im Tiefziehverfahren (Erkopress ES 2004, Erkodent GmbH, Pfalzgrafenweiler, Deutschland) aus hart-elastischen, transparenten Duran-Folien (Scheu Dental GmbH, Iserlohn, Deutschland) mit einer Dicke von 0,7 - 1,0 mm angefertigt. Um einen höheren Tragekomfort für die Patienten zu garantieren und weder Ästhetik noch Phonetik einzuschränken, wurden die Schienen im 1. und 2. Quadranten jeweils nur den Molaren- und Prämolarenbereich umfassend ausgearbeitet. Die sichere Prüfkörpermontage erforderte bukkal eine Ausdehnung der Schienen von mindestens 8 mm sowie kleine Perforationen zur Retention.

3.5 Herstellung der Prüfkörper

3.5.1 Extraktion und Vorbereitung der Rinderzähne

Grundlage für das orale Biofilmmodell war die Herstellung boviner Schmelz- und Dentinprüfkörper. Hierzu wurden die Labialflächen unterer Frontzähne der zweiten Dentition verwendet. Diese bieten ausreichend große Glattflächen zur Produktion planer und polierbarer Prüfkörper.

Die Zähne wurden vom Schlachthof Zweibrücken bezogen und nach Extraktion bei 4°C in 0,1%iger Thymollösung (Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg, Deutschland) gelagert. Mit Hilfe der Schleiftrennmaschine (WOCO 50p, Conrad GmbH, Clausthal, Deutschland) wurde zunächst der Wurzelanteil der Rinderzähne abgetrennt. Nach Abschleifen der Inzisalkante sowie der mesial und distalen Approximalflächen konnten aus einem Rinderzahn durch sagittale und transversale Spaltung 4 - 5 Prüfkörperrohlinge gewonnen werden.

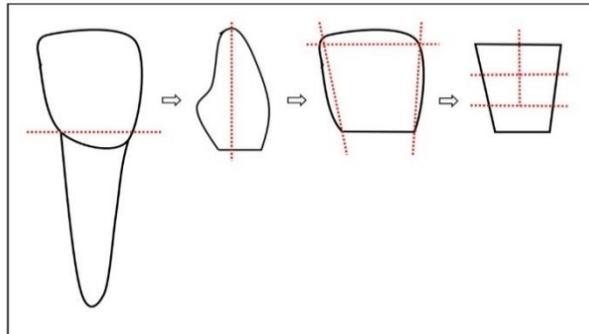


Abbildung 3: Schemazeichnung der Sägeschnitte zur Herstellung der Prüfkörperrohlinge aus bovinen Unterkieferschneidezähnen.

3.5.2 Politur und Reinigung der Prüfkörper

Ausgehend von den Prüfkörperrohlingen wurden unter Verwendung einer Nassschleifmaschine (Gripo 2V, Metkon Instruments Ltd, Bursa, Türkei) und Schleifpapier aufsteigender Körnung (wasserfestes Silikon-Carbid-Schleifpapier 240 Grit – 2500 Grit, Buehler, Düsseldorf, Deutschland) Prüfkörper mit einer einheitlichen Dimension von 4 x 5 x 1 mm hergestellt und die entsprechenden Oberflächen bis 2500 Grit poliert. Die Gegenseite wurde zur besseren Unterscheidung mit Schleifpapier der Körnung 240 Grit angeraut. Zur abschließenden Beurteilung der Dentin- und Schmelzoberfläche wurde ein Auflichtmikroskop (Zoom-Stereomikroskope SMZ 140, Motic GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit 10-facher Vergrößerung herangezogen. Prüfkörper mit mikroskopisch sichtbaren Verfärbungen, Demineralisation oder Inhomogenitäten der Oberfläche wurden aussortiert.

Zur Reinigung und Desinfektion wurden die Schmelzprüfkörper für 3 min und die Dentinprüfkörper für 30 s in 3%-iger Natriumhypochlorid-Lösung (Hedinger, Stuttgart, Deutschland) gelagert. Nach gründlichem Abspülen der Prüfkörper unter fließendem Wasser folgte die Reinigung im Ultraschallbad (Sonorex RK 100 H, Bandelin, Berlin, Deutschland). Schmelzprüfkörper wurden für 5 min, Dentinprüfkörper für 2 min gereinigt. Zuletzt erfolgte eine 15-minütige Desinfektion in 70%igem Isopropylalkohol (Hedinger, Stuttgart, Deutschland) mit

anschließendem zweimaligem Waschen in sterilem Wasser (Ecotainer, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany).

3.6 Montage der Prüfkörper

Zur Fixierung der Prüfkörper auf den Miniplast-Schienen diente ein zähfließendes A-Silikon (President light body, Coltène/Whaledent GmbH und Co. KG, Langenau, Deutschland). Insgesamt wurden auf jede Schiene eines Quadranten je zwei Schmelz- und Dentinprüfkörper in abwechselnder Reihenfolge montiert. Die beiden distalen Prüfkörper wurden zur Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie herangezogen. Die beiden mesial platzierten Prüfkörper dienten Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop. Um eine Nischenbildung auf den Prüfkörpern zu vermeiden, ist auf eine sorgfältige Platzierung und eine gleichmäßige Fassung durch das Silikon zu achten.



Abbildung 4: Miniplast-Schiene des 1. Quadranten auf einem Superhartgipsmodell mit 4 montierten Prüfkörpern aus bovinem Zahnmaterial, die abwechselnd von distal beginnend mit der Schmelz- oder Dentinoberfläche nach bukkal ausgerichtet sind.

3.7 Versuchsaufbau

Zu Versuchsbeginn bekamen alle Probanden zur Durchführung einer Versuchsreihe eine Zahnbürste (Sensodyne Complete Protection, GlaxoSmithKline Consumer Healthcare GmbH & Co. KG, Brühl, Deutschland) ausgehändigt. Im gesamten Studienverlauf wurden je 288 Schmelz- und Dentinprüfkörper für 24 h *in situ* zur Biofilmbildung herangezogen. Hierzu wurden zwei Durchgänge des gesamten Studienmodells durchgeführt. Ein Durchgang erstreckte sich über einen Zeitraum von 11 Tagen. Innerhalb dieses Zeitfensters wurden 6 Bedingungen *in situ* geschaffen, repräsentiert durch fünf unterschiedliche Zahnpastaformulierungen und eine Kontrolle mit Wasser. Am ersten Tag putzten die Probanden nach dem im Folgenden erläuterten Putzprotokoll mit der Kontrolle Wasser, am dritten Tag mit der Basispaste (B-P), am fünften Tag mit der Aluminium-Paste (Al1-P), am siebten Tag mit der Basispaste + Chlorhexidin (B-

CHX-P), am neunten Tag mit der Aluminium-Chlorhexidin-Paste (A11-CHX-P) und abschließend am elften Tag mit der Aluminium-Lactat-Aluminium-Fluorid-Aluminium-Hydroxid-Chlorhexidin-Paste (A13-CHX-P). Pro Paste bekamen die Probanden jeweils zwei neue mit je 4 Prüfkörpern bestückte Schienen ausgehändigt. Während einer Expositionszeit von 24 h *in situ* wurde dreimal mit der entsprechenden Paste geputzt. Nach 30-minütigem Tragen der Prüfkörper wurde die linke Schiene des Oberkiefers entnommen und der 2. Quadrant mit der entsprechenden Paste für 30 s geputzt. Danach wurde die Schiene durch den Probanden wiedereingesetzt und es folgte das Putzen des 1. Quadranten für weitere 30 s. Dabei wurden die Prüfkörper auf der rechten Seite zusätzlich mechanisch gereinigt. Anschließend putzten die Probanden für je 30 s die verbleibenden Quadranten im Unterkiefer. Die Prüfkörper der linken Seite wurden somit nicht aktiv gereinigt, sondern nur mit einem Speichel-Pasten-Gemisch umspült. Das gleiche Prozedere wurde nach 12 h und nach 23,5 h wiederholt. Die Probanden wurden darauf hingewiesen, während der Tragezeit nur stilles Wasser zu trinken und möglichst wenige Zwischenmahlzeiten zu konsumieren. Während der Mahlzeiten wurden die Schienen in einer Feuchtkammer gelagert und 30 min nach Nahrungsaufnahme wiedereingesetzt. Nach 24 h wurden die Schienen aus der Mundhöhle entnommen, die Prüfkörper vorsichtig von der Schiene abgelöst und für 5 s in Natrium-Chlorid-Lösung (0,9% B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gewaschen. Dies diente dem Ablösen des Speichelfilms und nicht-adhärenter Bakterien. Anschließend wurden jeweils ein Dentin und Schmelzprüfkörper jeder Seite zur Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie vorbereitet. Wie in [Tabelle 2](#) dargestellt, wurde den Biofilmen aller Prüfkörper nach Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie ein Score-Wert zur Beschreibung der Bedeckung und Vitalität zugeordnet. Die Bedeckung und Vitalität der Biofilme auf ungeputzten Schmelzprüfkörpern wurden zusätzlich gemessen. Ergänzend wurden alle Prüfkörper mit einem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Während der eintägigen Pause kehrten die Probanden zu ihrer gewohnten Zahnpflege zurück. Mundspüllösungen wurden während der Untersuchung nicht verwendet.



Abbildung 5: Intraoral eingesetzte Miniplast-Schiene mit 4 montierten Prüfkörpern im 1. Quadranten. Die Prüfkörper der rechten Miniplast-Schiene wurden aktiv mechanisch gereinigt.

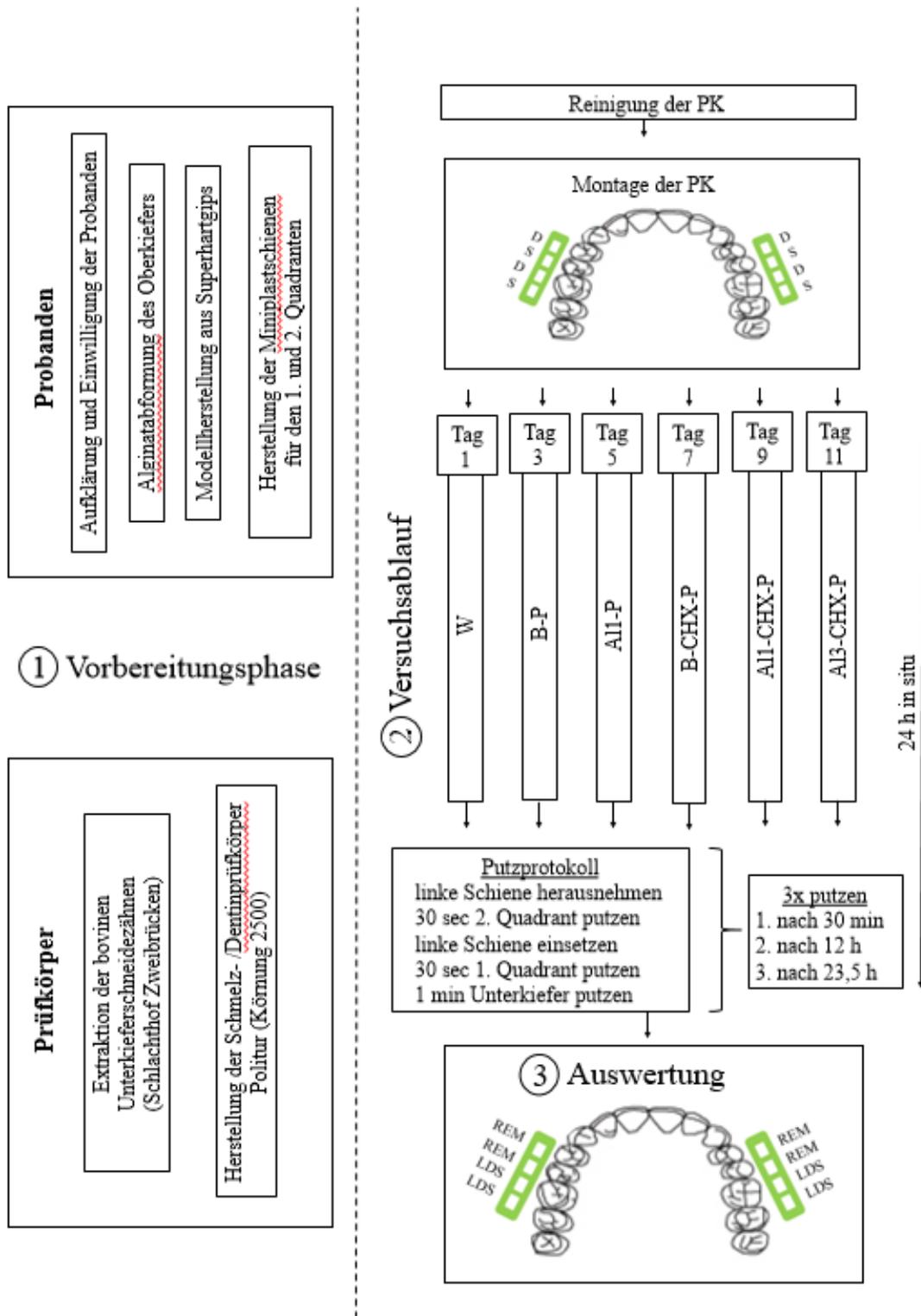


Abbildung 6: Versuchsaufbau – schematische Darstellung. Abkürzungen: PK=Prüfkörper; S=Schmelz; D=Dentin; W=Wasser; B-P=Basispaste; Al1-P=Aluminium-Lactat-Paste; B-CHX-P=Basispaste+Chlorhexidin; Al1-CHX-P=Aluminium-Lactat-Chlorhexidin-Paste; Al3-CHX-P= Aluminium-Lactat-Aluminium-Fluorid-Aluminium-Hydroxid-Chlorhexidin-Paste LDS=Life/Dead Staining; REM=Rasterelektronenmikroskopie.

Tabelle 2: Übersicht über die Prüfkörper und Auswertung der Biofilme

Prüfkörper	Auswertung der Biofilme
Schmelz geputzt	Life/Dead – Staining: Scoring der Bedeckung und Vitalität Rasterelektronenmikroskopie
Schmelz ungeputzt	Life/Dead – Staining: Scoring der Bedeckung und Vitalität Messung der Vitalität mit Image J Rasterelektronenmikroskopie
Dentin geputzt	Life/Dead – Staining: Scoring der Bedeckung und Vitalität Rasterelektronenmikroskopie
Dentin ungeputzt	Life/Dead – Staining: Scoring der Bedeckung und Vitalität Rasterelektronenmikroskopie

3.8 Fluoreszenzmikroskopie

3.8.1 Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie

Zur Darstellung der Bedeckung und Vitalität des auf den Prüfkörpern befindlichen Biofilms wurde die Fluoreszenzmikroskopie herangezogen. Die Proben wurden mit dem Axio Imager M2 Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberhausen, Deutschland) untersucht. Die Färbung erfolgte mit Hilfe des BacLight™ bacterial viability kit (Artikelnummer L7012, Molecular Probes, Eugene, USA), das aus zwei färbenden Nukleinsäuren besteht, Propidium Iodid und SYTO 9. Die Farblösungen unterscheiden sich in ihrem spezifischen Spektralcharakter und ihrer Fähigkeit, die Zellmembran zu durchdringen. SYTO 9 ist ein grün fluoreszierendes membrangängiges Molekül und färbt alle Zellen. Im Gegensatz dazu ist Propidium Iodid ein rot fluoreszierendes, nicht membrangängiges Molekül und somit nicht in der Lage, in gesunde Zellen mit intakter Membran einzudringen (Netuschil et al., 2014). Der Hersteller gibt an, dass Propidium Iodid eine höhere Affinität zu Nukleinsäuren aufweist als SYTO 9. In einem geeigneten Verhältnis von SYTO 9 und Propidium Iodid werden Bakterien mit einer intakten Zellmembran folglich grün fluoreszierend und Bakterien mit einer zerstörten oder aufgelösten Zellmembran rot fluoreszierend dargestellt (Molecular probes, 2001).

3.8.2 Herstellung der Färbelösung

Die Fluoreszenzfarbstoffe SYTO9 und Propidium Iodid wurden in Aliquots lichtgeschützt bei -20 °C gelagert. Zur Herstellung der Farblösungen wurden 1 µl SYTO 9 und 1 µl Propidium Iodid des BacLight™ bacterial viability kit (Artikelnummer L17012, Molecular Probes,

Eugene, USA) mit 1000 µl Natrium-Chlorid-Lösung (0,9% B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verdünnt und durchmischt.

3.8.3 Färben und Fixieren der Prüfkörper

Nach dem Waschen der Prüfkörper in Kochsalz-Lösung (0,9% B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurden die Prüfkörper mit 50 µl der Färbelösung bedeckt und für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Farblösung wurde danach durch Schwenken der Prüfkörper in Kochsalz-Lösung abgespült. Die Fixierung der Prüfkörper erfolgte zur besseren Lagestabilisierung auf dem Objektträger mit einem weichen Silikon (Gammasil Tec A 85 base, Müller-Omicron GmbH & Co. KG, Lindlar, Deutschland). Auf die Oberfläche des Prüfkörpers wurde 5 µl Mounting Öl des BacLight™ bacterial viability kit (Artikelnummer L17012, Molecular Probes, Eugene, USA) aufgetragen.

3.8.4 Durchführung der Mikroskopie

Nach dem Färbeprozess erfolgte direkt die fluoreszenzmikroskopische Analyse mit dem Axio Imager M2 Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland). Es wurden bei 1000-facher Vergrößerung jeweils 6 Bilder entsprechend eines Rasterfeldes des Okulars (0,0156 cm²) pro Prüfkörper aufgenommen. Zwei verschiedene Lichtfilter wurden zur Visualisierung der toten und lebenden Zellen verwendet. (Etr Filter für die Visualisierung der toten Zellen: BP 546/12, FT 580 und LP 590, FDA Filter für die lebenden Zellen: BP 450-490, FT 50 und LP 515). Die Bilder wurden mit der Software Axiovision 4.8 (AxioCam, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) gespeichert.

3.8.5 Quantifizierung der Biofilme

Bedeckung

Zur Quantifizierung der Biofilmbedeckung eines Prüfkörpers wurde eine Klassifizierung mit 6 Kategorien angewandt, die sich an den Phasen der Biofilmbildung orientiert. Pro Prüfkörper wurde den 6 repräsentativen Aufnahmen je ein Score-Wert, entsprechend der folgenden [Abbildung 10](#) zugeordnet (Rupf et al. 2012).

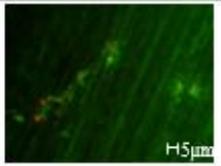
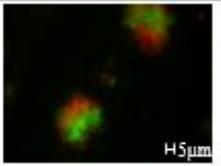
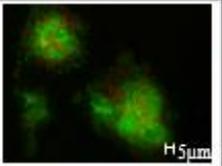
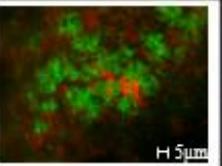
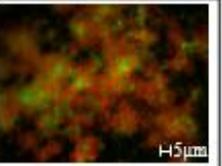
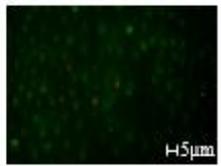
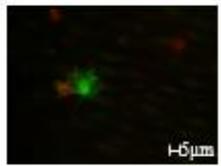
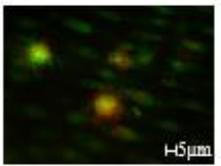
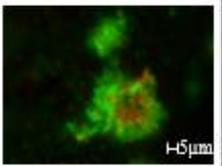
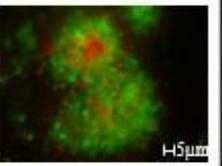
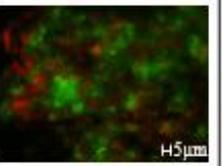
	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4	Score 5	Score 6
	separat verteilte, einzelne Bakterien	einschichtige Reihung der Bakterien oder isolierte Bakterien-agglomerate (n<100 Bakterien)	inselförmige Bakterien-agglomerate (n<1.000 Bakterien)	einschichtige Bakterienkolonien, die annähernd 50% der Oberfläche bedecken oder große mehrschichtige Agglomerate	Bakterienkolonien, die mehr als 50% der Oberfläche bedecken	mehrschichtiger bakterieller <u>Biofilm</u> , der mind. 90% der gesamten Oberfläche bedeckt
Schmelz poliert P 2500						
Dentin poliert P 2500						

Abbildung 7: Klassifizierung zur Beurteilung der Biofilmbedeckung.

Vitalität

Zur Quantifizierung der Vitalität der adhärennten Bakterien auf einem Prüfkörper wurde eine Klassifizierung mit 5 Kategorien angewandt, basierend auf dem Anteil der roten bzw. grünen Fluoreszenzen. Pro Prüfkörper wurden den 6 repräsentativen Aufnahmen je zwei Score-Werte durch Einschätzung zweier unabhängiger Begutachter zugeordnet. Große Abweichungen wurden nachträglich besprochen und gegebenenfalls neu evaluiert. Waren keine Bakterien auf der Aufnahme zusehen und entsprechend keine Fluoreszenzen sichtbar, wurde die Aufnahme mit „nicht bestimmbar“ gekennzeichnet (Rupf et al., 2012).

Tabelle 3: Klassifizierung zur Beurteilung der Vitalität des Biofilms

Score	Beschreibung
1	hauptsächlich rote Fluoreszenz; Verhältnis roter zu grüner Fluoreszenz 90:10 oder höher
2	mehr rote Fluoreszenz, Verhältnis zwischen roter und grüner Fluoreszenz 75:25 oder höher
3	Verhältnis zwischen roter und grüner Fluoreszenz 50:50
4	mehr grüne Fluoreszenz, Verhältnis zwischen roter und grüner Fluoreszenz 25:75 oder weniger
5	hauptsächlich grüne Fluoreszenz Verhältnis zwischen roter und grüner Fluoreszenz 90:10 oder weniger

Messung der Biofilmvitalität auf ungeputzten Schmelzprüfkörpern

Zusätzlich wurde die Vitalität des Biofilms mit Hilfe eines Java Bildbearbeitungs- und Analyseprogramms Image J für die ungeputzte Schmelzprüfkörper bestimmt (Hibbs, 2004). Nach dem Öffnen der Aufnahme im Programm wurde das Tool „Histogramm“ ausgewählt und der *Mean*-Wert für das Histogramm des roten und grünen Kanals notiert. Anschließend wurde der Quotient aus den *Mean*-Werten des grünen und roten Kanals gebildet.

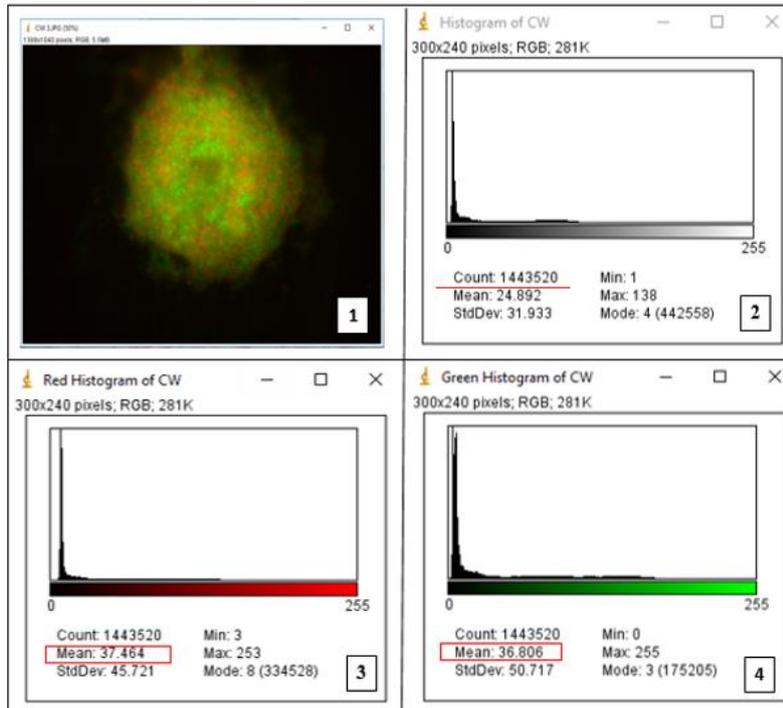


Abbildung 8: Image J – 1: importierte Aufnahme (Fluoreszenzmikroskopie, BacLight™ bacterial viability kit); 2: Histogramm der Aufnahme; 3: Histogramm der Aufnahme im roten Kanal; 4: Histogramm der Aufnahme im grünen Kanal. Die rot markierten Werte wurden zur Auswertung notiert.

3.9 Rasterelektronenmikroskopie

3.9.1 Fixierung des Biofilms

Die Prüfkörper wurden für 1 Stunde in 2,5%iger Glutaraldehyd-Lösung (Glutaraldehyd Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) in 0,01M Cacodylat-Puffer (pH 7) bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Prüfkörper fünfmal in dem genannten Cacodylat-Puffer für jeweils 10 min gewaschen. Die Prüfkörper können bei 4 °C in dem letzten Phosphatpuffer bis zur Trocknung gelagert werden. Zur Dehydratation des Biofilms wurde eine ansteigende Alkoholreihe von 50% - 100% Ethanol entsprechend des in der Tabelle 4 aufgeführten Protokolls angewandt. Die Prüfkörper wurden über Nacht in 1,1,1,3,3,3 - Hexymethyldisilazan-Lösung (HMDS, $[(CH_3)_3SI]_2NH$, 98,5%, ABCR GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) getrocknet. Nach Fixation der Prüfkörper auf den Aluminiumtellern (Specimen Stubs, Agar Scientific Ltd, Essex, England) mit einer leitfähigen Klebefolie (Leit-Tabs, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden die Oberflächen der Prüfkörper mit einer dünnen Schicht aus Gold-Palladium-Partikeln beschichtet (Sputter Coater SC 7640, Polaron Equipment Ltd-Quorum technologies, Newhaven, England).

Tabelle 4: Fixierung der Prüfkörper für die Rasterelektronenmikroskopie

Glutaldehyd-Lösung (2,5%)	Cacodylat-Puffer	Alkoholreihe						HMDS
		50%	60%	70%	80%	90%	100%	
1h	5 x 10 min	3 x 10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	3 x 10 min	12 h

3.9.2 Durchführung der Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie dient dem Beschreiben der Schmelz- und Dentinoberflächen und der Morphologie des adhärenen Biofilms. Alle Aufnahmen wurden mit dem Mikroskop XL 30 ESEM FEG (FEI, Eindhoven, Niederlande) unter Vakuum bei 5kV durchgeführt. Dabei wurde auf konstante Einstellungen bezüglich Neigungswinkel, Scanmodus und Spotgröße geachtet. Zur Bildgebung wurde der reflektierte Strahl der Sekundärelektronen genutzt. Aufgrund ihrer niedrigen Energie werden diese Elektronen nur von dem obersten Nanometer der Prüfkörperoberfläche reflektiert und bilden so hochauflösend die Topografie des Prüfkörpers ab (Neunzehn et al., 2014). Zunächst wurde pro Prüfkörper eine Übersichtsaufnahme bei 13-facher Vergrößerung aufgenommen. Anschließend wurde eine repräsentative Stelle herausgesucht und fünf Aufnahmen mit steigendem Vergrößerungsfaktor bei 500-, 1.000-, 5.000-, 10.000-, 20.000-facher Vergrößerung angefertigt.

3.9.3 Energiedispersive Röntgenspektroskopie

Zur detaillierten Analyse der Oberflächenmaterialien wurde an ausgewählten Prüfkörpern zusätzlich eine kontrastreiche Aufnahme mit dem Rückstreudetektor angefertigt, die anschließend einer energiedispersiven Röntgenspektroskopie (EDX Phoenix, EDAX Inc., Mahwah, USA) diente. Hierbei wurden Messungen an Schmelz- und Dentinoberflächen und an Zahnpastentrückständen durchgeführt.

3.10 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Programmpakets SPSS (PASW Statistics 18, IBM, USA). Zu Vergleich der Median-Scorewerte für die Biofilmbedeckung und -vitalität wurden der Kruskal-Wallis Test und der Mann-Whitney U Test verwendet. Die Pasten B-CHX-P, A11-P, A11-CHX-P und A13-CHX-P wurden zunächst gegen die Negativkontrollen Wasser und B-P mit dem Mann-Whitney U Test untersucht. Bei einem p-Wert < 0,05 wurden die Unterschiede als signifikant bewertet. Der Kruskal-Wallis Test diente der Überprüfung, ob

signifikante Unterschiede innerhalb der Aluminiumgruppe (A11-P, A11-CHX-P und A13-CHX-P) und innerhalb der Chlorhexidingruppe (CHX-P, A11-CHX-P und A13-CHX-P) vorlagen. Bei positivem Ergebnis wurden die jeweiligen Pasten mit dem Mann-Whitney U Test verglichen. Auch hier wurden die Unterschiede ab einem p-Wert $< 0,05$ als signifikant bewertet.

4 Ergebnisse

Alle Probanden beendeten die Studie ohne Komplikationen. Die Anwendung der Vitalfluoreszenzmikroskopie ermöglicht eine Untersuchung der Biofilmbedeckung und -vitalität. Die Rasterelektronenmikroskopie dient zusätzlich der morphologischen Beschreibung des Biofilms unter dem Einfluss verschiedener Zahnpastaformulierungen.

4.1 Fluoreszenzmikroskopie

4.1.1 Visualisierung des *In-situ*-Biofilms

Die Anwendung des BacLight™ bacterial viability kit ermöglicht eine unterscheidbare Kennzeichnung vitaler und toter Bakterien. Vitale Bakterien zeigten eine grüne Fluoreszenz, tote Bakterien eine rote Fluoreszenz (Abb.9). Die Bakterien des *in situ* Biofilms auf den Prüfkörpern entsprachen morphologisch zumeist Kokken. Auf geputzten Prüfkörpern und Prüfkörpern, die mit A11-P, B-CHX-P, A11-CHX-P und A13-CHX-P umspült wurden und eine geringe Biofilmbedeckung aufwiesen, waren auch einzelne stäbchenförmige Bakterien zu erkennen (Abb. 10). Neben adhärennten Bakterien auf der Prüfkörperoberfläche erschienen durch Anwendung des BacLight™ bacterial viability kit Schmelzprismen und Dentintubuli grün-fluoreszierend (Abb. 11). Die Eigenfluoreszenz der Prüfkörperoberflächen wurde bei der Auswertung vernachlässigt. Auf manchen Prüfkörperoberflächen waren Epithelzellen mit einer deutlichen roten Fluoreszenz des Zellkerns sichtbar (Abb. 12). Sie lagerten sich durch ein Reiben der Prüfkörper an der Schleimhaut der Wangeninnenseiten ab und die Häufigkeit zeigte sich probandenabhängig. Die Epithelzellen wurden bei der Bestimmung der Biofilmbedeckung und – vitalität nicht berücksichtigt.

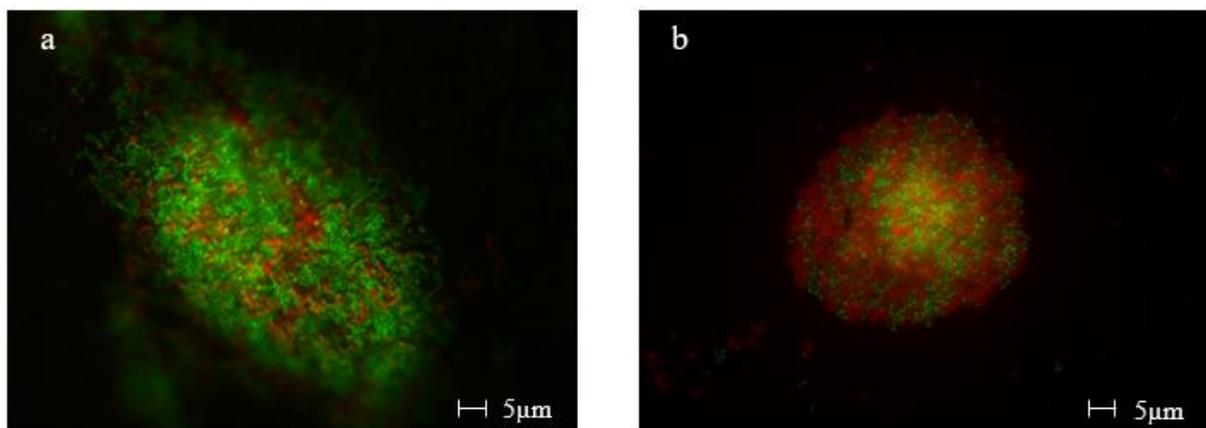


Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (BacLight™ bacterial viability kit): Darstellung eines 24 h *In-situ*-Biofilms auf Schmelzprüfkörpern. Vitale (grün) und tote (rot) Bakterien sind deutlich zu unterscheiden.

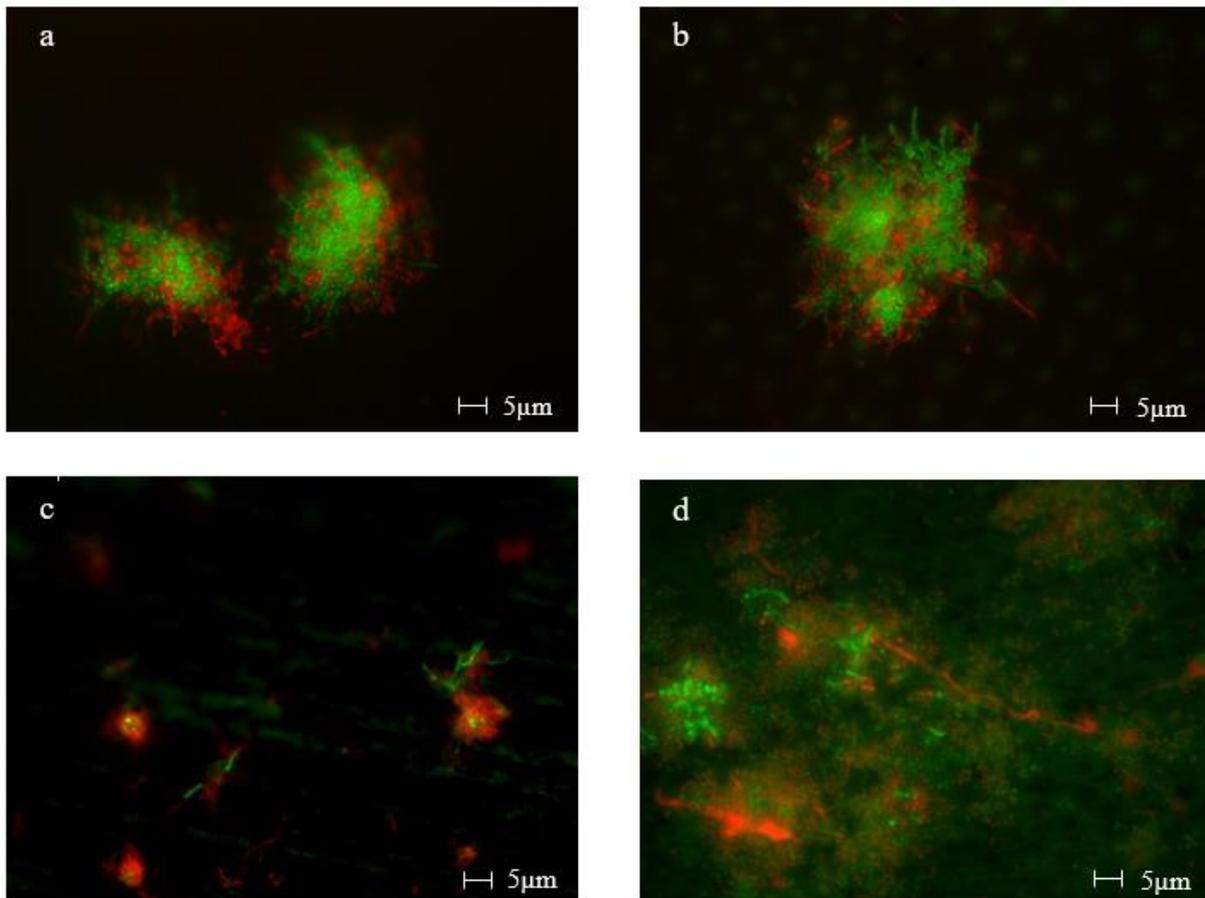


Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines 24 h *In-situ*-Biofilms (BacLight™ bacterial viability kit): a) + b) B-P: Bakterienkolonie besteht hauptsächlich aus Kokken. c) A11-CHX-P; d) B-CHX-P; c) + d) einzelne stäbchenförmige Bakterien sichtbar. grün: vitale Bakterien; rot: tote Bakterien.

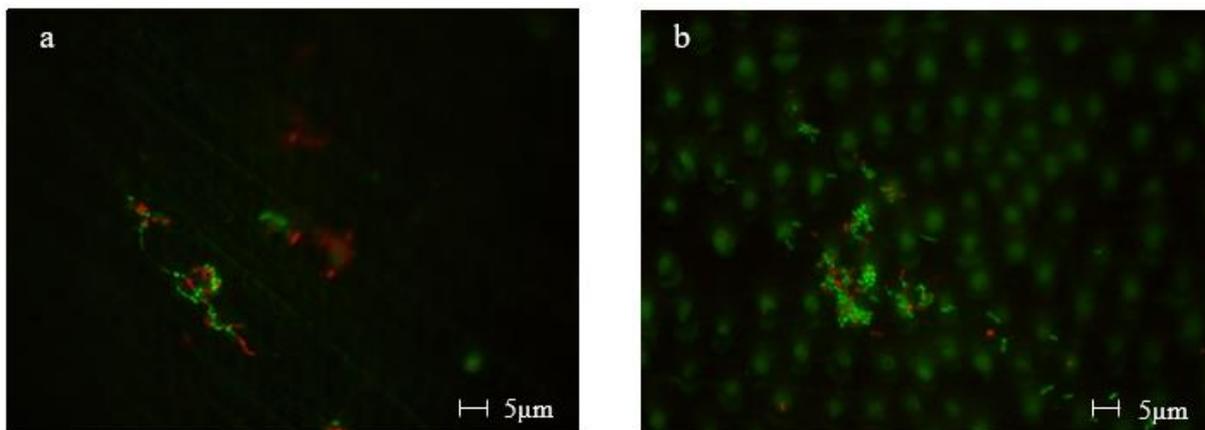


Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines 24 h *In-situ*-Biofilms (BacLight™ bacterial viability kit): a) Schmelz-PK poliert 2500 grit. b) Dentin-PK poliert 2500 grit. Die Schmelzprismen und Dentintubuli erscheinen grünfluoreszierend. grün: vitale Bakterien; rot: tote Bakterien.

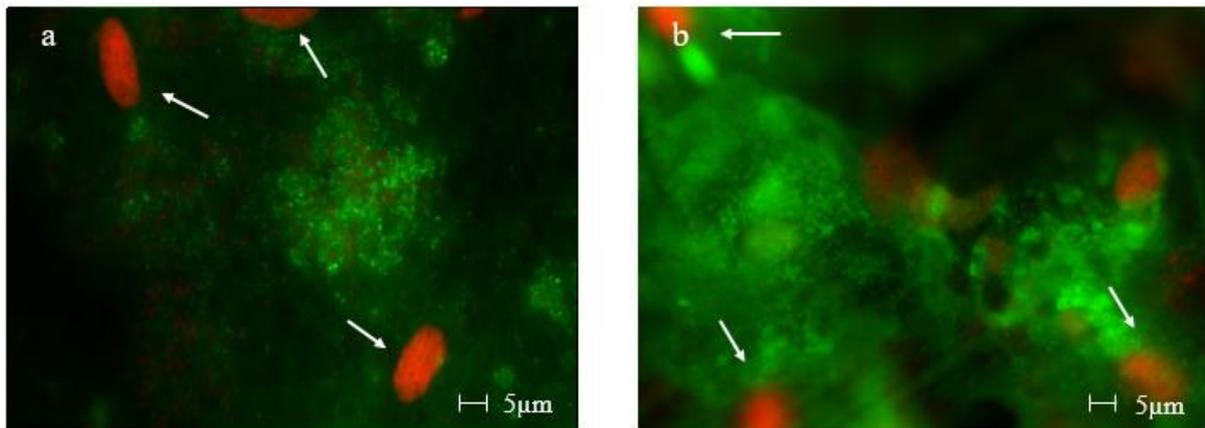


Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (BacLight™ bacterial viability kit): Epithelzellen auf der 24 h *in situ* befindlichen Prüfkörperoberfläche. Der rot fluoreszierende Zellkern ist mit einem Pfeil markiert. Epithelzellen wurden in der Auswertung der Fluoreszenzen nicht berücksichtigt. grün: vitale Bakterien; rot: tote Bakterien.

4.1.2 Schmelzprüfkörper

Bedeckung

Jedem Prüfkörper wurden nach Färbung mit dem BacLight™ bacterial viability kit sechs Scorewerte zur Beschreibung der Biofilmbedeckung zugeordnet. Diese sind in [Abbildungen 13](#) und [14](#) als Boxplot-Diagramme für geputzte und ungeputzte Schmelzprüfkörper veranschaulicht dargestellt. Mediane, Minima und Maxima, sowie die erste und dritte Quantile sind zu sehen. Repräsentative Aufnahmen sowohl für geputzte als auch ungeputzte polierte Schmelzprüfkörper sind ergänzend in [Abbildung 17](#) und [18](#) hinzugefügt.

Auf geputzten Schmelzprüfkörpern waren kleine Kolonien sowie einzelne Bakterien erkennbar. Die Biofilmneubildung war auf Prüfkörpern, die mit A11-P, A11-CHX-P und A13-CHX-P geputzt wurden, vermindert. Auf mit A13-CHX-P geputzte Prüfkörpern befanden sich nur verteilte einzelne Bakterien oder kleine einschichtige Bakterienreihungen ([Abb. 17f](#)). Die geputzten Prüfkörper wiesen eine geringere Biofilmbedeckung gegenüber den ungeputzten Prüfkörpern auf.

Ungeputzte Schmelzprüfkörper, die mit Wasser oder B-P umspült wurden, zeigten nach 24h mehrschichtige Biofilme, die nahezu die gesamte Prüfkörperoberfläche bedeckten ([Abb. 18](#)). Die Biofilmneubildung war auf ungeputzten Prüfkörper, die mit A11-P und A13-CHX-P in Berührung kamen, vermindert. Umspülte PK mit B-CHX-P, A11-P und A11-CHX-P wiesen dennoch größere Bakterienkolonien >1000 Bakterien auf. Die Anwendung von A13-CHX-P führte zu einer signifikanten Hemmung der Biofilmneubildung ($p < 0,001$). Neben einzelnen, separaten Bakterien kam es aber auch hier vereinzelt zur Ausbildung strukturierter Kolonien.

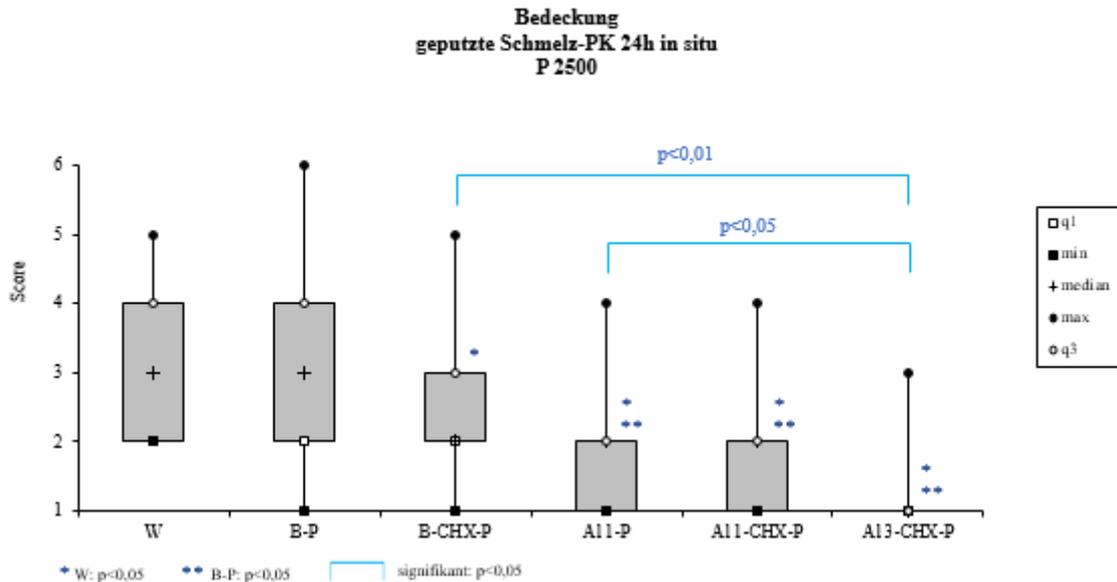


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Biofilmbedeckung 24 h *in situ* getragener Schmelz-PK (nach Abb. 7). Die Prüfkörper wurden nach 30 min, 12 h und 23,5 h für 30 s mit der entsprechenden Zahnpaste geputzt. Auf den mit W, B-P und B-CHX-P geputzten PK waren kleinere Bakterienkolonien erkennbar. PK, die mit A11-P, A11-CHX-P und A13-CHX-P geputzt wurden, zeigten eine verminderte Biofilmbildung (Mann Whitney U-Test, $p < 0,05$). PK, die mit A13-CHX-P geputzt wurden, zeigten nur noch vereinzelte Bakterien.

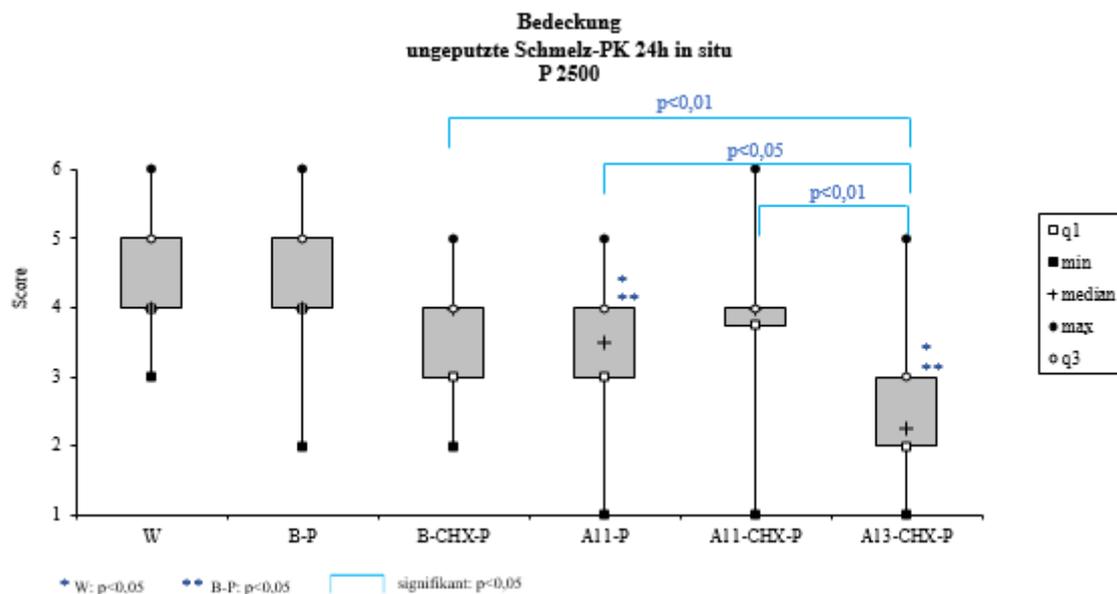


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Biofilmbedeckung 24 h *in situ* getragener-Schmelz-PK (nach Abb. 7). Die Prüfkörper wurden nach 30 min, 12 h und 23,5 h für 30 s mit der entsprechenden Zahnpaste umspült. PK, die mit W und B-P umspült wurden, waren von großen mehrschichtigen Bakterienkolonien bedeckt. Die Biofilme waren auf PK, die mit A11-P und A13-CHX-P umspült wurden, vermindert (Mann-Whitney U Test $p < 0,001$). Ein signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen den Al-haltigen Pasten und den CHX-haltigen Pasten (Kruskal-Wallis Test: Al-Gruppe $p = 0,005$; CHX-Gruppe $p = 0,002$). Die Anwendung der A11-CHX-P zeigte keine signifikante Hemmung der Biofilmneubildung.

Vitalität

Die Vitalität der Biofilme auf den Schmelzprüfkörpern zeigte große interindividuelle Unterschiede. Prüfkörper, die mit Wasser geputzt wurden, zeigten zumeist Kolonien, die sich größtenteils aus vitalen Bakterien zusammensetzten (Abb. 17a). Das Putzen mit B-CHX-P und A13-CHX-P führte zu einer signifikanten Abnahme des grünfluoreszierenden Anteils und somit der vitalen Bakterien (Abb. 15). Auf Prüfkörpern, die mit A13-CHX-P geputzt wurden, befanden sich häufig nur vereinzelte tote Bakterien (Abb. 17f).

Das Umspülen mit B-P führte zu einer signifikanten Zunahme der Biofilmvitalität gegenüber der Kontrolle Wasser. Ein Kontakt mit den Pasten B-CHX-P, A11-P, A11-CHX-P und A13-CHX-P hemmt die Biofilmvitalität gegenüber der Basispaste (Mann-Whitney U Test $p < 0,05$). Der Kruskal-Wallis Test ermittelt Unterschiede innerhalb der Zahnpasten. Hier konnten weder für Pasten mit CHX noch für Pasten mit Aluminium-Bestandteilen Signifikanzen festgestellt werden (Abb. 16).

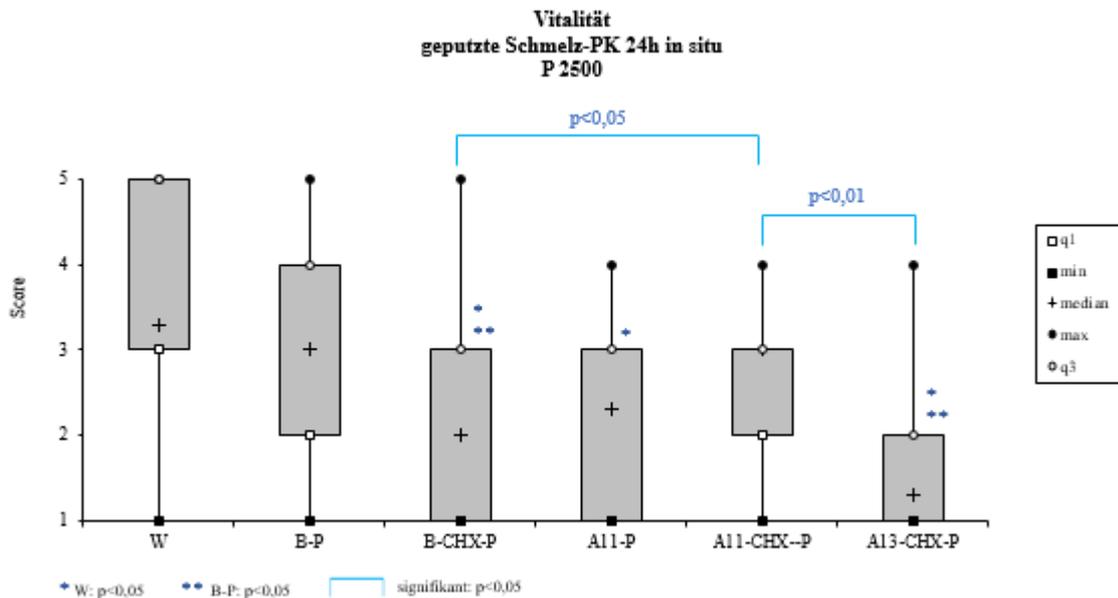


Abbildung 15: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Biofilmvitalität 24 h *in situ* getragener Schmelz-PK (nach Tabelle 3). Die Prüfkörper wurden nach 30 min, 12 h und 23,5 h für 30 s mit der entsprechenden Zahnpaste geputzt. Der Anteil der rot-fluoreszierenden Bakterien stieg signifikant unter der Anwendung von B-CHX-P und A13-CHX-P. Putzen mit A11-CHX-P hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Biofilmvitalität im Vergleich zu den Kontrollen Wasser und B-P. Der Kruskal-Wallis Test ermittelt Unterschiede innerhalb der Zahnpasten ($p < 0,006$). Prüfkörper, die mit A13-CHX-P geputzt wurden, wiesen zumeist nur vereinzelte tote Bakterien auf (Mann-Whitney U Test $p < 0,001$).

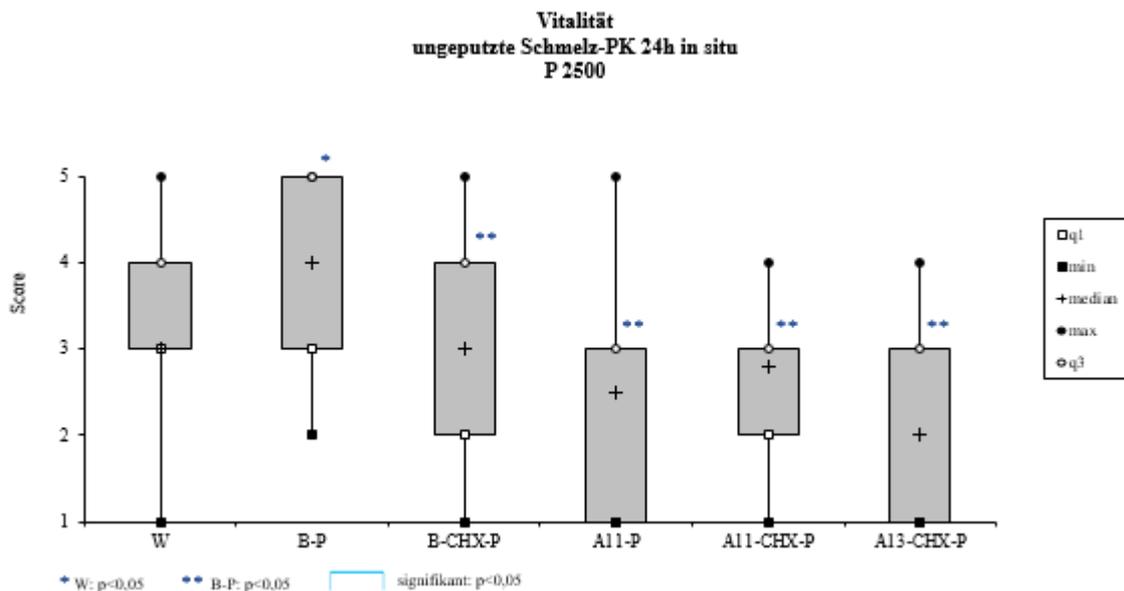


Abbildung 16: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Biofilmvitalität 24 h *in situ* getragener Schmelz-PK (nach Tabelle 3). Die Prüfkörper wurden nach 30 min, 12 h und 23,5 h für 30 s mit der entsprechenden Zahnpaste umspült, aber nicht aktiv mechanisch gereinigt. Kontakt mit B-P hat einen negativen Einfluss auf die Biofilmvitalität und erhöht den Anteil grün-fluoreszierender, vitaler Bakterien gegenüber der Kontrolle W. Alle anderen Pasten führen zu einer Zunahme des avitalen Anteils im bakteriellen Biofilm (Mann-Whitney U Test $p < 0,01$). Es konnten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Zahnpasten festgestellt werden (Kruskal-Wallis Test $> 0,05$).

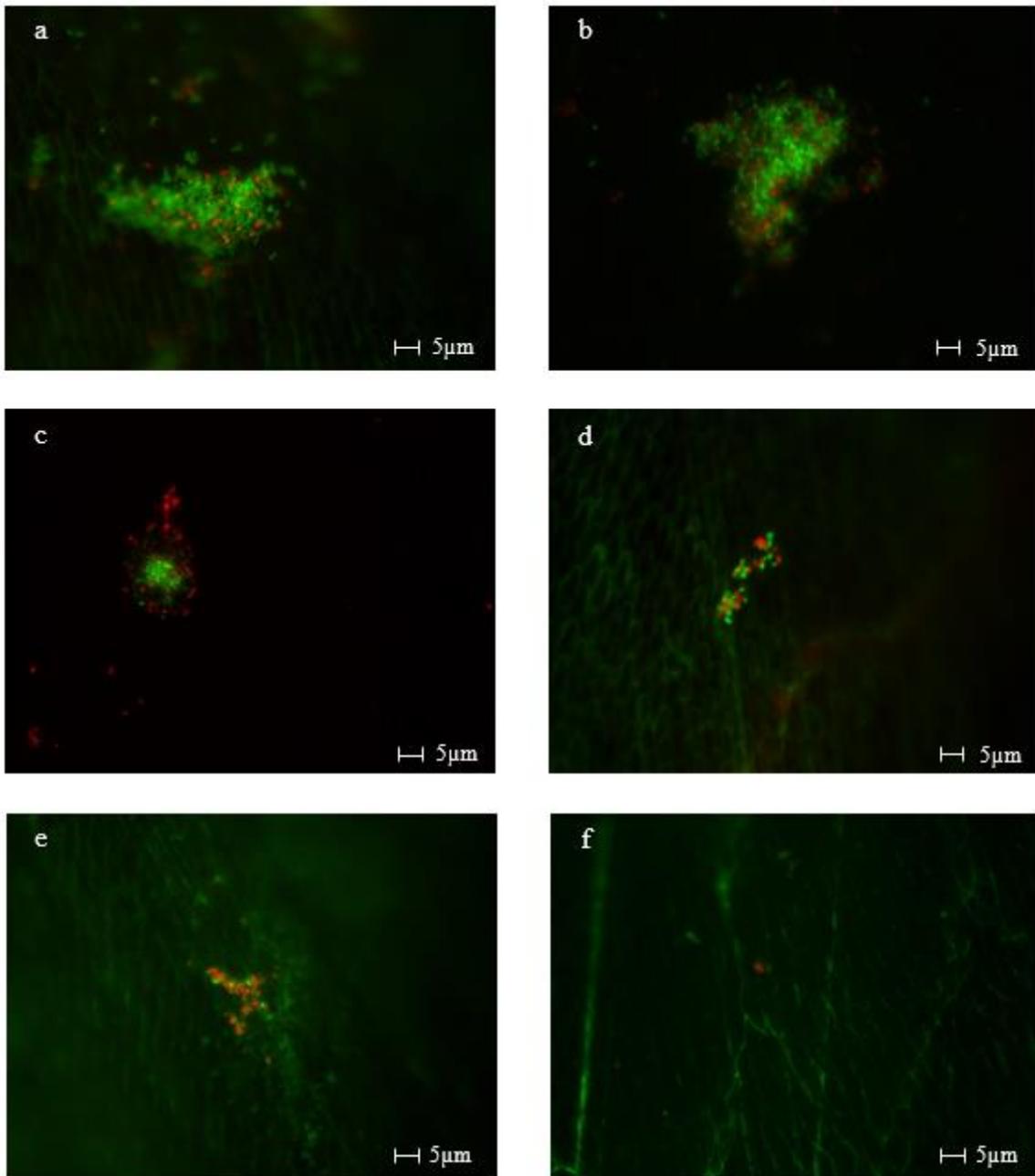
repräsentative FM-Aufnahmen

Abbildung 17: Repräsentative FM-Aufnahmen von polierten 24 h *in situ* getragener Schmelz-PK. Die Prüfkörper wurden nach 30 min, 12 h und 23,5 h für 30 s mit a) W b) B-P c) B-CHX-P d) A11-P e) A11-CHX-P f) A13-CHX-P geputzt. a) + b) kleinere Kolonien mit überwiegend grün fluoreszierenden Bakterien. c) avitale Bakterien befinden sich am Rand der kleinen Bakterienkolonie. d) + e) Bakterienagglomerate mit < 100 Bakterien mit ausgeglichenem rot-grün-Verhältnis. f) einzelnes avitales Bakterium. grün: vitale Bakterien; rot: tote Bakterien.

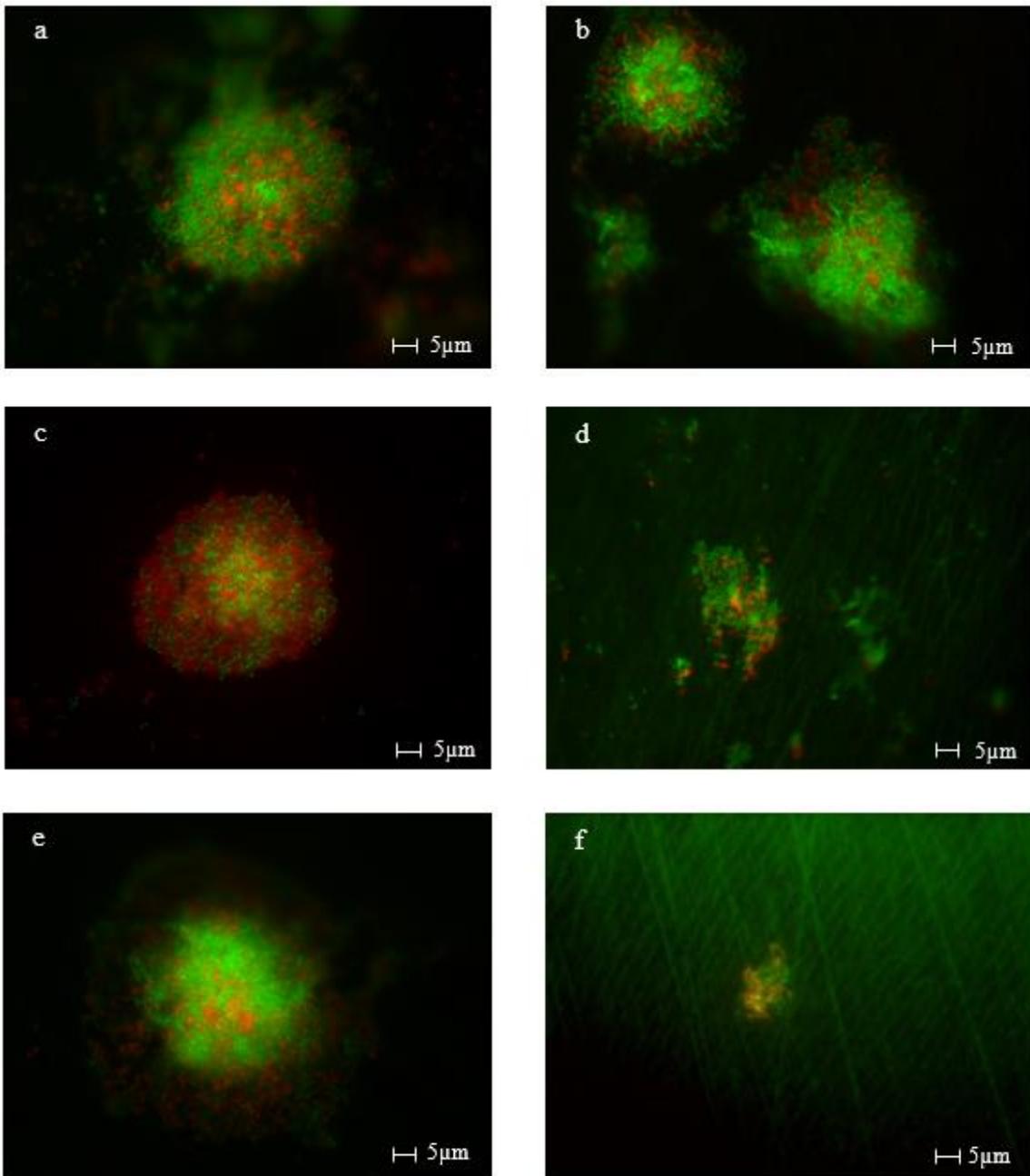


Abbildung 18: Repräsentative FM Aufnahmen von polierten 24 h *in situ* getragener Schmelz-PK. Die Prüfkörper wurden nach 30 min, 12 h und 23,5 h für 30 s mit a) W b) B-P c) B-CHX-P d) A11-P e) A11-CHX-P f) A13-CHX-P umspült, aber nicht mechanisch gereinigt. a) + b) +e) Bakterienkolonien >1000 Bakterien, mit überwiegendem Anteil grünfluoreszierender Bakterien. c) große Bakterienkolonie mit größerem Anteil avitaler Bakterien. d) kleinere Kolonie < 1000 Bakterien. f) kleine avitale Bakterienansammlung. grün: vitale Bakterien; rot: tote Bakterien.

Messung der Biofilmvitalität für ungeputzte Schmelzprüfkörper

Für ungeputzte Schmelzprüfkörpern wurde zusätzlich eine Messung der Biofilmvitalität mit Hilfe des Programms Image J durchgeführt. [Abbildung 19](#) zeigt die graphische Darstellung der Pixelwerte im Median für die roten und grünen Fluoreszenzen. PK, die mit der Kontrolle W, B-CHX-P oder A11-CHX-P umspült wurden, weisen ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis roter und grüner Fluoreszenz auf. Überwiegend vitale (grüne) Mikroorganismen finden sich in Kolonien auf PK, die mit B-P in Kontakt kamen. Die Anwendung von A11-P und A13-CHX-P führt zu einer Zunahme des Anteils roter Fluoreszenzen, d.h. die Biofilme bestehen aus einer Mehrzahl toter Bakterien. Die Länge der Balken korreliert indirekt mit der Biofilmbedeckung der Prüfkörper.

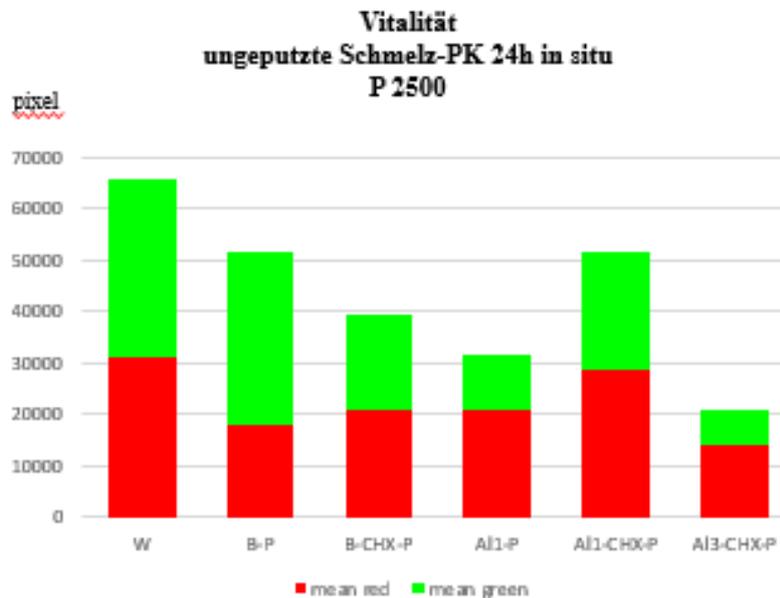


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Biofilmvitalität 24 h *in situ* getragener polierter Schmelz-PK (nach Auswertung mit Image J). Die Prüfkörper wurden nach 30 min, 12 h und 23,5 h für 30 s mit der entsprechenden Zahnpaste umspült, aber nicht aktiv mechanisch gereinigt. PK, die mit W, B-CHX-P, A11-CHX-P in Kontakt kamen, zeigen ein ausgeglichenes Verhältnis roter und grüner Fluoreszenzen. Bei PK, die mit B-P umspült wurden, überwiegt der Anteil grüner Fluoreszenzen. Für A11-P und A13-CHX-P zeigt sich eine Tendenz zu einem erhöhten Anteil roter Fluoreszenz. Biofilme auf diesen PK bestehen somit aus einem überwiegenden Anteil toter Bakterien. Die Länge der Balken korreliert indirekt mit der Biofilmbedeckung.

4.1.3 Dentinprüfkörper

Bedeckung

Jedem Prüfkörper wurden nach Färbung mit dem BacLight™ bacterial viability kit sechs Scorewerte zur Beschreibung der Biofilmbedeckung zugeordnet. Diese sind in [Abbildungen 20](#) und [21](#) als Boxplot-Diagramme für geputzte und ungeputzte Dentinprüfkörper veranschaulicht dargestellt. Mediane, Minima und Maxima, sowie die erste und dritte Quantile sind zu sehen. Repräsentative Aufnahmen sowohl für geputzte als auch ungeputzte polierte Dentinprüfkörper sind ergänzend in [Abbildung 24](#) und [25](#) hinzugefügt.

Auf geputzten Dentinprüfkörpern sind kleine Kolonien sowie einzelne Bakterien erkennbar. Die Biofilmneubildung war auf Prüfkörpern, die mit A11-P und A13-CHX-P geputzt wurden, vermindert (Mann-Whitney U Test $p < 0,01$). Auf mit A13-CHX-P geputzte Prüfkörper befanden sich nur einzelne Bakterien oder kleine einschichtige Bakterienreihungen ([Abb. 24f](#)). Eine statistische Analyse zum Vergleich der Pasten (Kruskal-Wallis Test $p < 0,01$) verdeutlicht die Wirkung von A13-CHX-P, die sowohl im Vergleich mit A11-P als auch mit A11-CHX-P zu einer signifikanten Hemmung der Biofilmneubildung führt ([Abb. 20](#)).

Die Biofilmbildung auf ungeputzten Dentinprüfkörper ist im Vergleich zu mechanisch gereinigten PK erhöht. PK, die mit W umspült wurden, zeigen große Bakterienkolonien bis hin zu mehrschichtig organisierten Biofilmen ([Abb. 25a](#)). Eine signifikante Hemmung der Biofilmbildung im Vergleich zur B-P erfolgte nur durch die Pasten A11-P und A13-CHX-P (Mann-Whitney U Test $p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich innerhalb der Pasten bestätigt die antibakterielle Wirkung von A13-CHX-P (Kruskal-Wallis Test $p < 0,01$). Auf den mit A13-CHX-P geputzten PK sind nur kleinere und meist einschichtige Bakterienagglomerate zu sehen ([Abb. 21](#)).

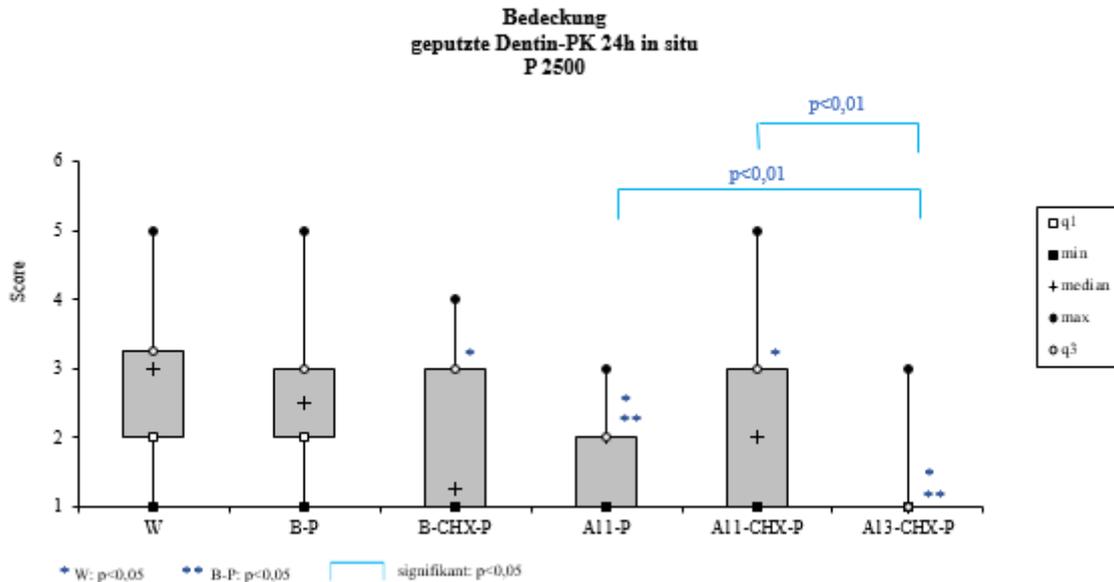


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Biofilmbedeckung 24 h *in situ* getragener Dentin-PK (nach Abb. 7). Die Prüfkörper wurden nach 30 min, 12 h und 23,5 h für 30 s mit der entsprechenden Zahnpaste geputzt. Auf den mit W, B-P geputzten PK waren Bakterienkolonien zu sehen. Die Biofilmbildung wurde durch Putzen mit den Paste B-CHX-P und A11-CHX-P nicht signifikant gehemmt. PK, die mit AL1-P geputzt wurden, zeigten kleinere Bakterienkolonien. PK, die mit A13-CHX-P geputzt wurden, zeigten zumeist nur noch einzelne Bakterien und eine statistisch signifikante Hemmung im Vergleich zu A11-P und A11-CHX-P (Kruskal-Wallis Test $p < 0,01$).

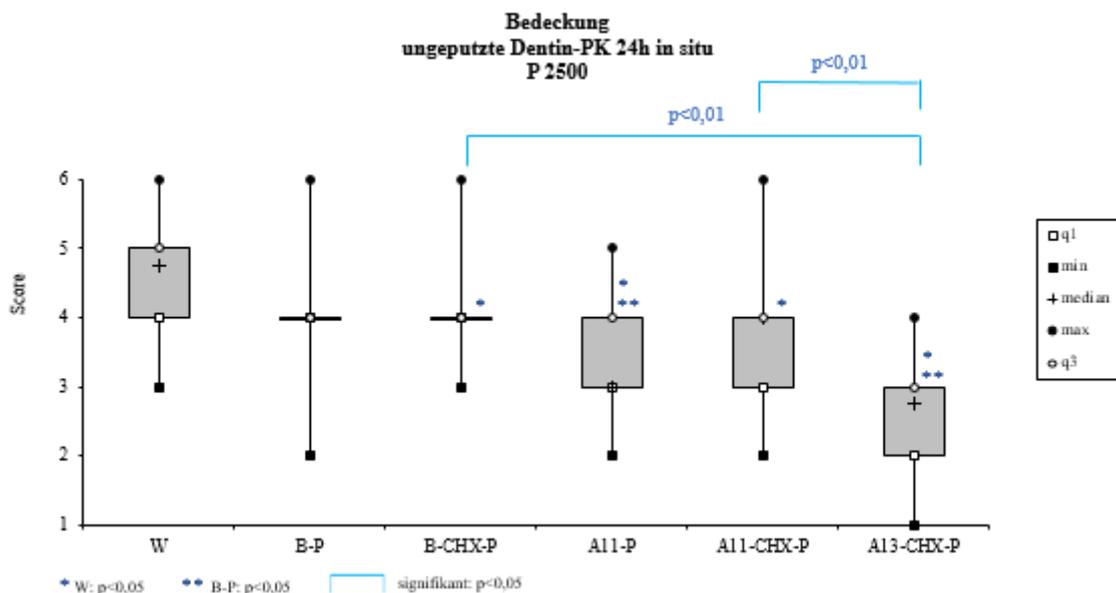


Abbildung 21: Graphische Darstellung der Ergebnisse für die Biofilmbedeckung 24 h *in situ* getragener Dentin-PK (nach Abb. 7). Die Prüfkörper wurden nach 30 min, 12 h und 23,5 h für 30 s mit der entsprechenden Zahnpaste umspült. Eine statistisch signifikante Hemmung der Biofilmneubildung erfolgte mit den Pasten A11-P und A13-CHX-P (Mann-Whitney U Test $p < 0,01$) im Vergleich zu den Kontrollen Wasser und B-P. PK, die mit A13-CHX-P in Kontakt traten, zeigen nur einzelne Bakterien bis hin zu kleinen Bakterienagglomeraten. A13-CHX-P zeigt ebenso einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu B-CHX-P und A11-CHX-P (Kruskal Wallis Test $p = 0,003$).

Vitalität

Die Vitalität der Biofilme auf den Dentinprüfkörpern zeigte große interindividuelle Unterschiede. Während PK, die mit Wasser und B-P geputzt wurden überwiegend lebende Mikroorganismen aufweisen, wird die Vitalität durch Putzen mit den Zahnpasten B-CHX-P, A11-P, A11-CHX-P und A13-CHX-P signifikant reduziert und der Anteil rotfluoreszierender Bakterien steigt ([Abb. 22](#)). Es zeigt sich ein deutlicher Einfluss der Paste A13-CHX-P, die im statischen Vergleich mit Pasten der Al-Gruppe (Kruskal-Wallis $p < 0,000001$) und mit Pasten der CHX-Gruppe (Kruskal-Wallis $p < 0,000001$) einen signifikanten Unterschied aufweist.

Ein Kontakt mit den Pasten B-CHX-P, A11-P, A11-CHX-P und A13-CHX-P hemmt die Biofilmvitalität gegenüber der Basispaste (Mann-Whitney U Test $p < 0,05$). Der Kruskal-Wallis Test ermittelt Unterschiede innerhalb der Zahnpasten. Hier konnten weder für Pasten mit CHX noch für Pasten mit Aluminium-Bestandteilen Signifikanzen festgestellt werden ([Abb. 23](#)).

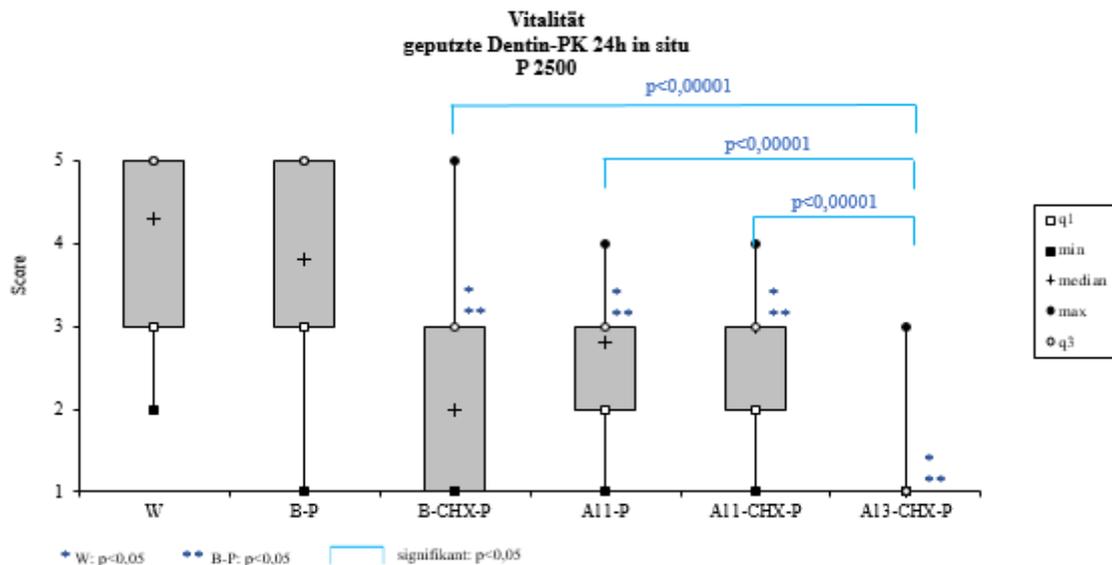


Abbildung 22: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Biofilmvitalität 24 h *in situ* getragener Dentin-PK (nach Tabelle 3). Die Prüfkörper wurden nach 30 min, 12 h und 23,5 h für 30 s mit der entsprechenden Zahnpaste geputzt. Biofilme auf Prüfkörpern, die mit W und B-P geputzt wurden, zeigen überwiegend grünfluoreszierende Mikroorganismen. Durch Putzen mit den Pasten B-CHX-P, A11-P, A11-CHX-P und A13-CHX-P wird die Vitalität der Biofilme signifikant gehemmt. PK, die mit A13-CHX-P geputzt wurden, weisen meist nur noch avitale Bakterien auf. Es zeigt sich ein deutlicher Einfluss der Paste A13-CHX-P auf die Biofilmvitalität auch im Vergleich mit den Pasten der Al- und CHX-Gruppe (Mann-Whitney U Test $p < 0,00001$).

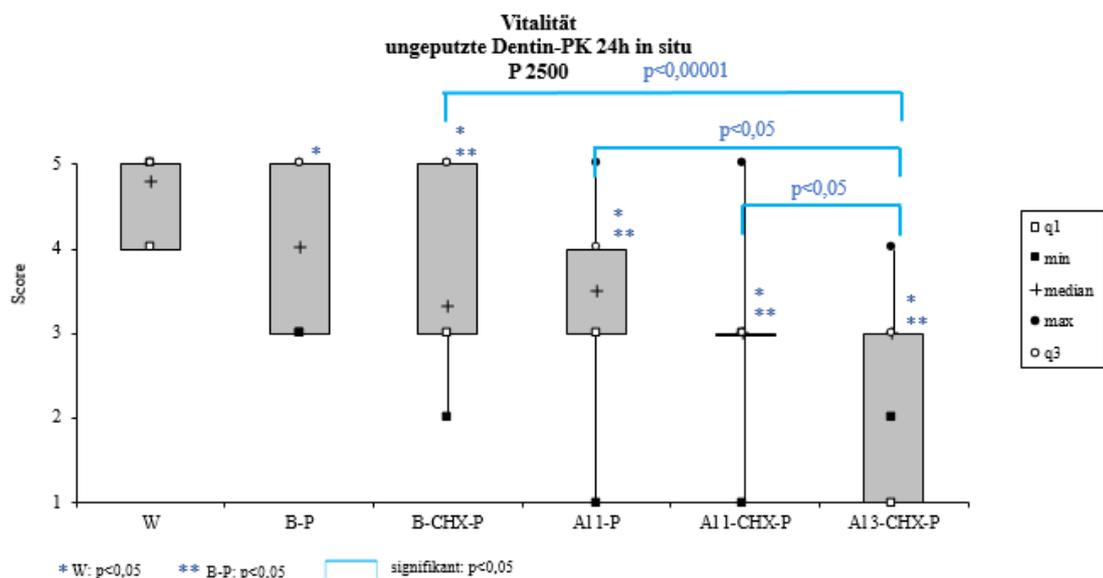


Abbildung 23: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Biofilmvitalität 24 h *in situ* getragener Dentin-PK (nach Tabelle 3). Die Prüfkörper wurden nach 30 min, 12 h und 23,5 h für 30 s mit der entsprechenden Zahnpaste umspült, aber nicht aktiv mechanisch gereinigt. Alle Pasten zeigen einen signifikanten Einfluss auf die Biofilmvitalität und führen zu einer Erhöhung des Anteils roter Fluoreszenzen (Mann-Whitney U Test $p < 0,001$). Pasten der CHX- und Al-Gruppe weisen signifikante Unterschiede auf (Kruskal-Wallis Test $p = 0,022$ und $p = 0,008$). PK, die mit A13-CHX-P geputzt wurden, zeigen zumeist Biofilme mit mindestens 50% rotfluoreszierender Bakterien.

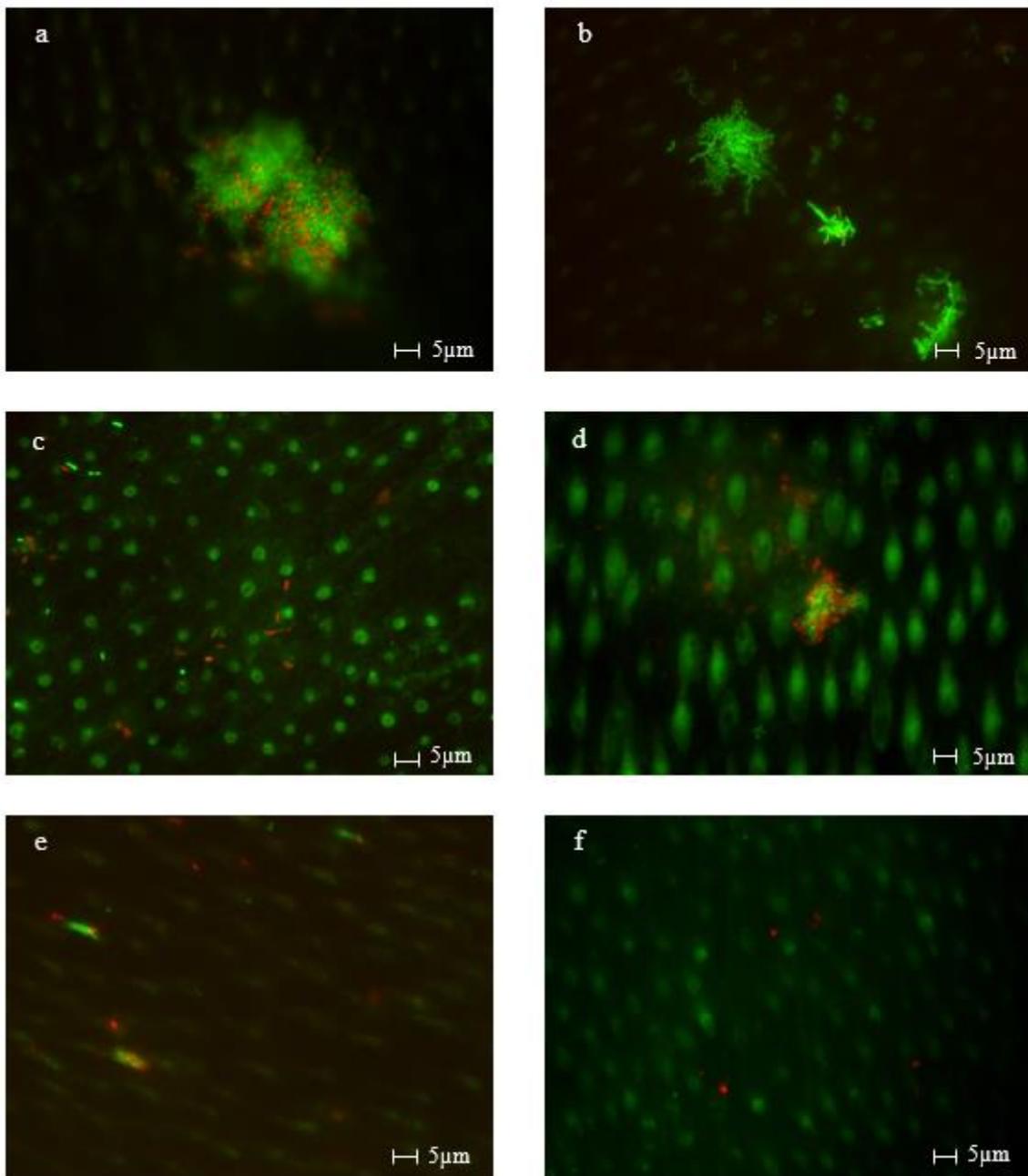
repräsentative FM-Aufnahmen

Abbildung 24: Repräsentative FM-Aufnahmen von polierten 24 h *in situ* getragener Dentin-PK. Die Prüfkörper wurden nach 30 min, 12 h und 23,5 h für 30 s mit a) W b) B-P c) B-CHX-P d) A11-P e) A11-CHX-P f) A13-CHX-P geputzt. a) + b) Bakterienkolonie mit vorwiegend grünen Fluoreszenzen. c) einzelne Bakterien. d) + e) kleine einschichtige Bakterienagglomerate mit vitalen und avitalen Bakterien f) einzelne rot fluoreszierende Bakterien. grün: vitale Bakterien; rot: tote Bakterien.

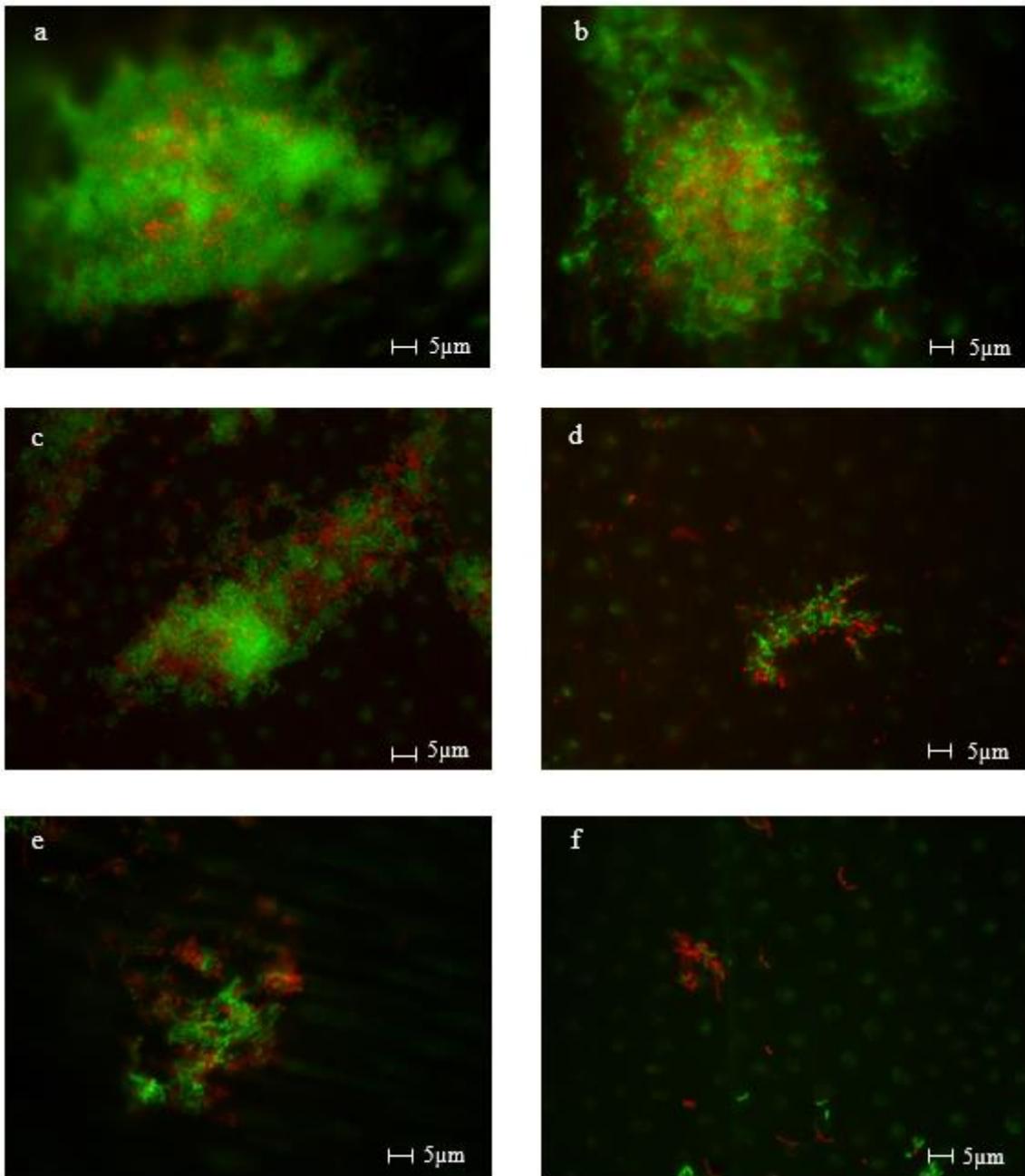


Abbildung 25: Repräsentative FM-Aufnahmen von polierten 24 h *in situ* getragener Dentin-PK. Die Prüfkörper wurden nach 30 min, 12 h und 23,5 h für 30 s mit a) W b) B-P c) B-CHX-P d) Al-P e) Al-CHX-P umspült, aber nicht mechanisch gereinigt. a) mehrschichtiger Biofilm, der nahezu die gesamte Prüfkörperoberfläche bedeckt. b) + c) größere Bakterienkolonien >1000 Bakterien d) + e) kleine Bakterienkolonie e) kleine einschichtige Agglomerate der Bakterien und vereinzelte Bakterien. grün: vitale Bakterien; rot: tote Bakterien.

4.2 Rasterelektronenmikroskopie

4.2.1 Visualisierung des *In-situ*-Biofilms

Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop dienten unterstützend zur Fluoreszenzmikroskopie der Visualisierung der 24 h *in situ* Biofilme auf den Dentin- und Schmelzprüfkörpern. Zwischen den Probanden waren bezüglich der Biofilmmenge und -struktur interindividuelle Unterschiede zu verzeichnen. Dennoch waren die im folgenden erläuterten Sachverhalte zur Wirkung der Zahnpastaformulierungen auf die initiale Biofilmbildung festzustellen und werden anhand repräsentativer Bilder verdeutlicht (Abb. 26-31).

Eine morphologische Untersuchung adhärenter Bakterien zeigte, dass unabhängig von allen Pasten zumeist Kokken und nur vereinzelt stäbchenförmige Bakterien zu finden waren (vgl. Abb. 26-31). Geputzte Prüfkörper wiesen zumeist eine geringe Biofilmbedeckung auf. Die Anzahl der Bakterien eines Biofilms war zudem vermindert. Im Vergleich zu umspülten Prüfkörpern waren vermehrt Zahnpastarückstände auf den Prüfkörperoberflächen zu finden (Abb. 26-31 a + c). Mit Hilfe repräsentativer Bilder der Rasterelektronenmikroskopie konnte kein Einfluss des Prüfkörpermaterials, Schmelz oder Dentin, auf die initiale Biofilmbedeckung festgestellt werden. Schmelz- und Dentinprüfkörper unterschieden sich nicht auffällig in der Menge und Struktur der adhärenen Bakterien und des Biofilms.

Ungeputzte Prüfkörper, die nur von Wasser umspült wurden, zeigten mehrschichtige Biofilme. Hier war eine strukturierte Matrix erkennbar, in die einzelne Bakterien eingebettet sind (Abb. 26 b + d). Auf mit Wasser geputzten Prüfkörpern waren einzelne adhärenente Bakterien und eine Pellikel überzogene Prüfkörperoberfläche sichtbar (Abb. 26 a + c). Prüfkörper, die mit Basispaste umspült wurden, zeigten große mehrschichtige Kolonien bis hin zu vollständig mit Biofilm bedeckte Oberflächen (Abb. 27).

Das Putzen mit A11-P führte zu nahezu bakterienfreien Prüfkörpern. Zahnpastarückstände lagerten sich in den Dentintubuli und auf den Schmelzprismen ab (Abb. 28 a + c). Umspülte Prüfkörper wiesen zumeist einzelne adhärenente Bakterien auf. Diese waren von Biofilmmatrix und Pastenrückständen umgeben (Abb. 28 b + d). Charakteristisch für die Paste A11-CHX-P waren große organische Putzkörper, die sich auf den Prüfkörperoberflächen oder an adhärenentem Biofilm ablagerten (Abb. 29). Darüber hinaus boten diese Putzkörper eine Anhaftungsstelle für Matrix- und Pellikelbestandteile (Abb. 29d). Prüfkörper, die mit A13-CHX-P umspült oder geputzt wurden, wiesen eine nahezu bakterienfreie Oberfläche auf. Auf der Prüfkörperoberfläche waren Pellikel bedeckte Zahnpastarückstände mit anorganischen Putzkörpern sichtbar (Abb. 30).

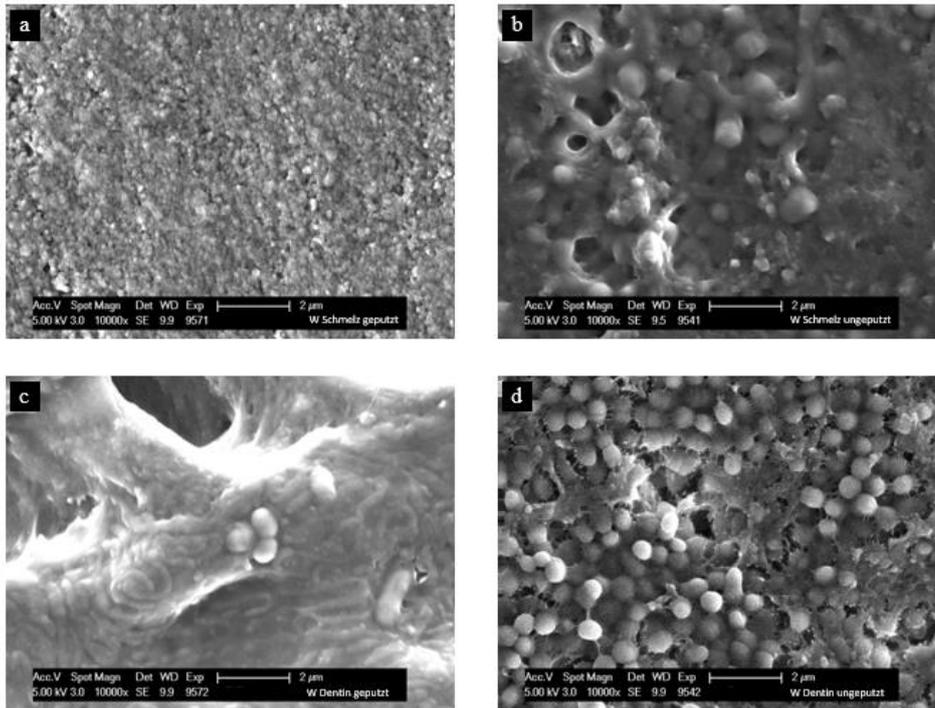


Abbildung 26: Repräsentative REM-Aufnahmen: 24h *In-situ*-Biofilm. Paste: Wasser. a) geputzter Schmelz-PK mit mehrschichtigem Biofilm bedeckt. b) ungeputzter Schmelz-PK, auf dem adhärente Bakterien in strukturierter Matrix erkennbar sind. c) geputzter Dentin-PK, auf dem sowohl Kokken auch als stäbchenförmige Bakterien zu finden sind. d) ungeputzter Dentin-PK mit zahlreichen Kokken und sichtbarer Biofilmmatrix. Originalvergrößerung 10.000-fach.

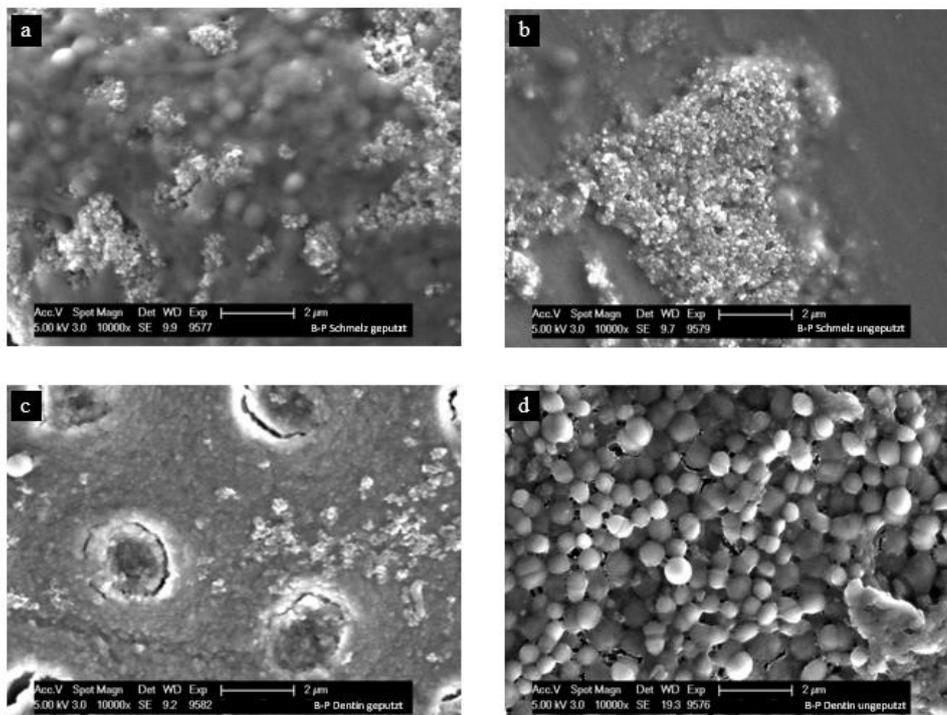


Abbildung 27: Repräsentative REM-Aufnahmen: 24h *In-situ*-Biofilm. Paste: B-P. a) geputzter Schmelz-PK mit strukturiertem Biofilm und aufgelagerten Pastenrückständen. b) ungeputzter Schmelz-PK mit adhärenter Bakterienmatrix. c) geputzter Dentin-PK, mit sichtbaren verschlossenen Tubuli und Biofilmmatrix. d) ungeputzter Dentin-PK mit mehrschichtigem aus Kokken bestehendem Biofilm. Originalvergrößerung 10.000-fach.

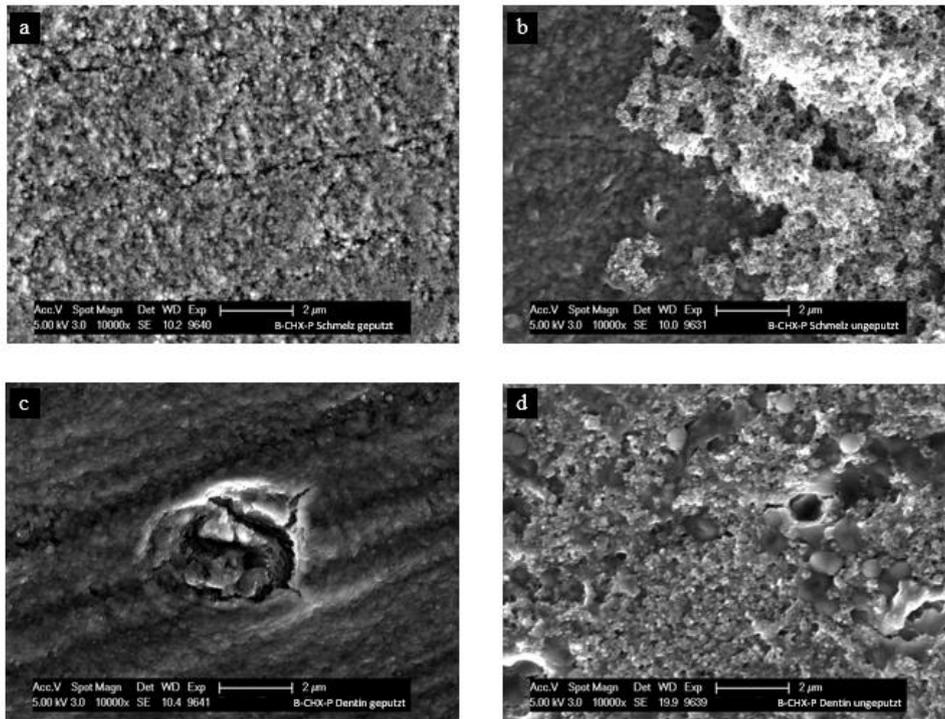


Abbildung 28: Repräsentative REM-Aufnahmen: 24h *In-situ*-Biofilm. Paste: B-CHX-P. a) geputzter Schmelz-PK mit Pellikel bedeckter Oberfläche. b) ungeputzter Schmelz-PK mit Zahnpastarückständen. c) geputzter Dentin-PK mit sichtbarem Dentintubuli. d) ungeputzter Dentin-PK, auf dem sich einzelne Bakterien in strukturierter Matrix und Pastenrückständen befinden. Originalvergrößerung 10.000-fach.

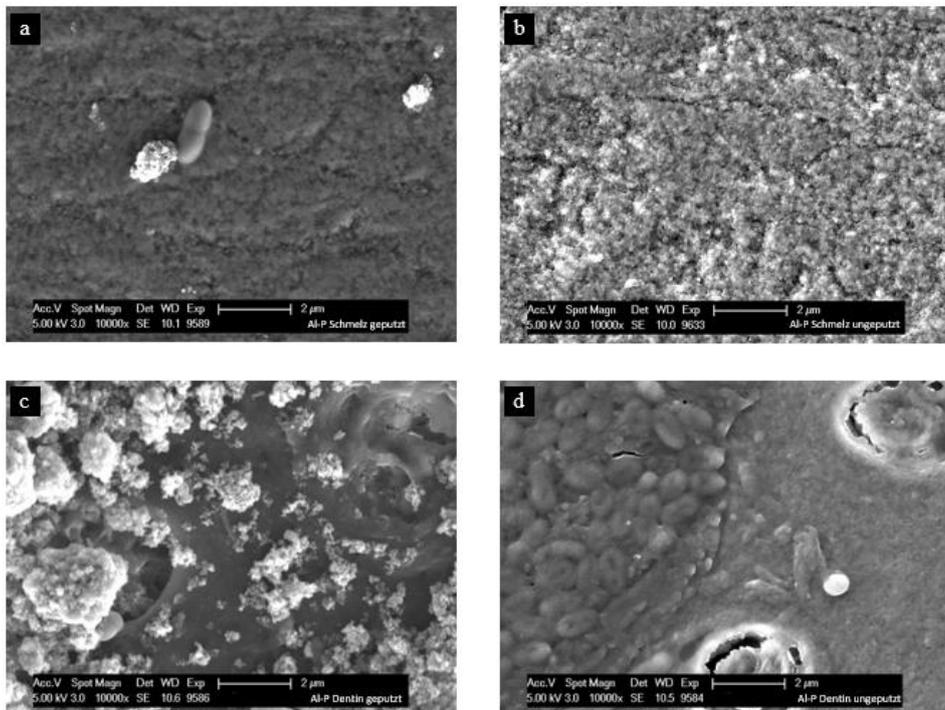


Abbildung 29: Repräsentative REM-Bilder: 24h *In-situ*-Biofilm. Paste: Al1-P. a) geputzter Schmelz-PK mit Pellikel bedeckter Oberfläche und sich teilweisem adhärentem Bakterium. b) ungeputzter Schmelz-PK mit bakterienfreier Oberfläche. c) geputzter Dentin-PK. Biofilmmatrix und Pastenrückstände lagern sich in den Dentintubuli an. d) ungeputzter Dentin-PK, der einen adhärennten Biofilm aufweist. Originalvergrößerung 10.000-fach.

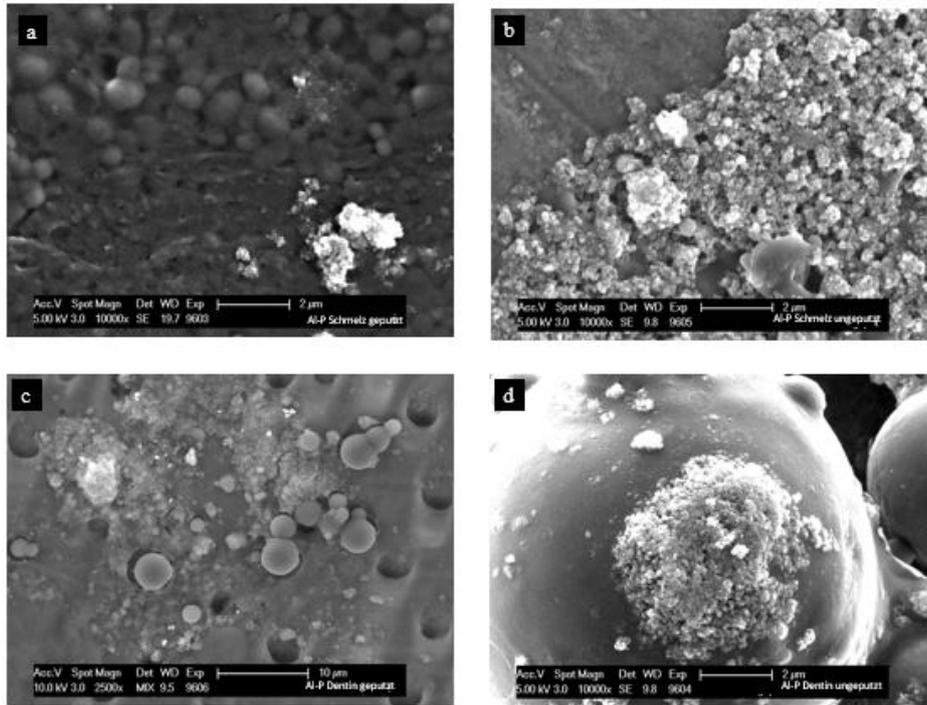


Abbildung 30: Repräsentative REM-Bilder: 24h *In-situ*-Biofilm. Paste: A11-CHX-P. a) geputzter Schmelz-PK mit zahlreichen Kokken und Pastenrückstand. b) ungeputzter Schmelz-PK mit großen Putzkörpern. c) geputzter Dentin-PK mit großen kugelförmigen Putzkörpern auf der Oberfläche. d) ungeputzter Dentin-PK. Auf den organischen Putzkörpern lagern sich weitere Pastenrückstände und Biofilmmatrix an. Originalvergrößerung 10.000-fach.

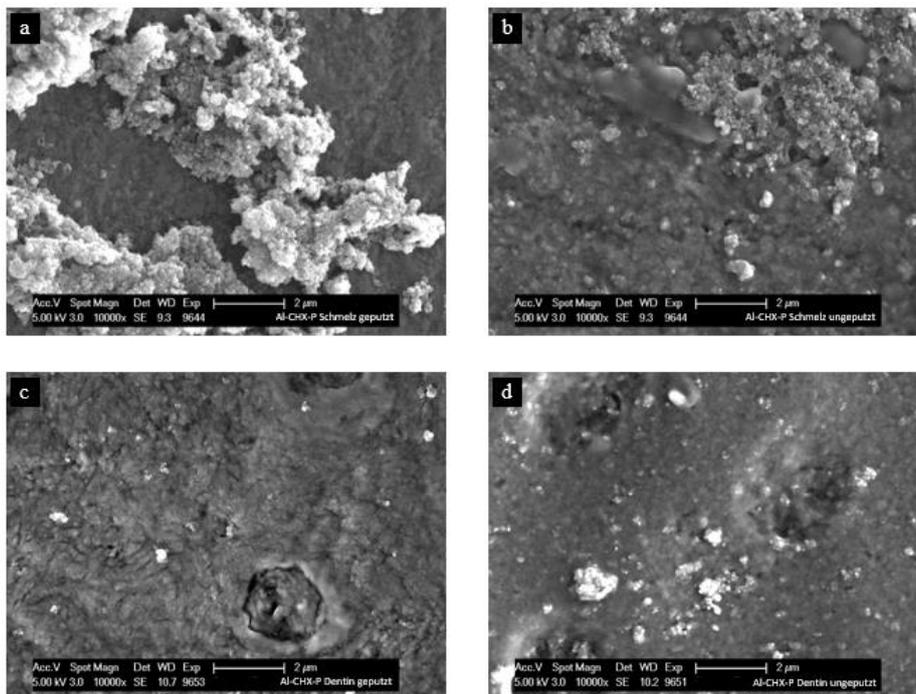


Abbildung 31: Repräsentative REM-Bilder: 24h *In-situ*-Biofilm. Paste: A13-CHX-P. a) geputzter Schmelz-PK. Zahnpastarückstände enthalten viele Putzkörper. b) ungeputzter Schmelz-PK mit einzelnen adhärenen Bakterien, die in Biofilmmatrix eingebettet sind. c) geputzter Dentin-PK mit bakterienfreier Oberfläche. d) ungeputzter Dentin-PK, auf dem sich nur Putzkörper der Zahnpasta befinden. Originalvergrößerung 10.000-fach.

4.2.2 Energiedispersive Röntgenspektroskopie

Mit Hilfe der Energiedispersiven Röntgenspektroskopie können unterstützend zur morphologischen Untersuchung repräsentative Elementanalysen durchgeführt werden. Dies dient der Identifizierung von Zahnpastarückständen und Biofilmbestandteilen sowie zur Untersuchung veränderter Prüfkörperoberflächen. Im Folgenden sind beispielhaft EDX-Messungen hinzugefügt, die Putzkörper (Abb. 32), Titanoxid-Pigmente (Abb. 33) und Aluminium-Verbindungen nachweisen (Abb. 34).

Putzkörper – Siliziumdioxid

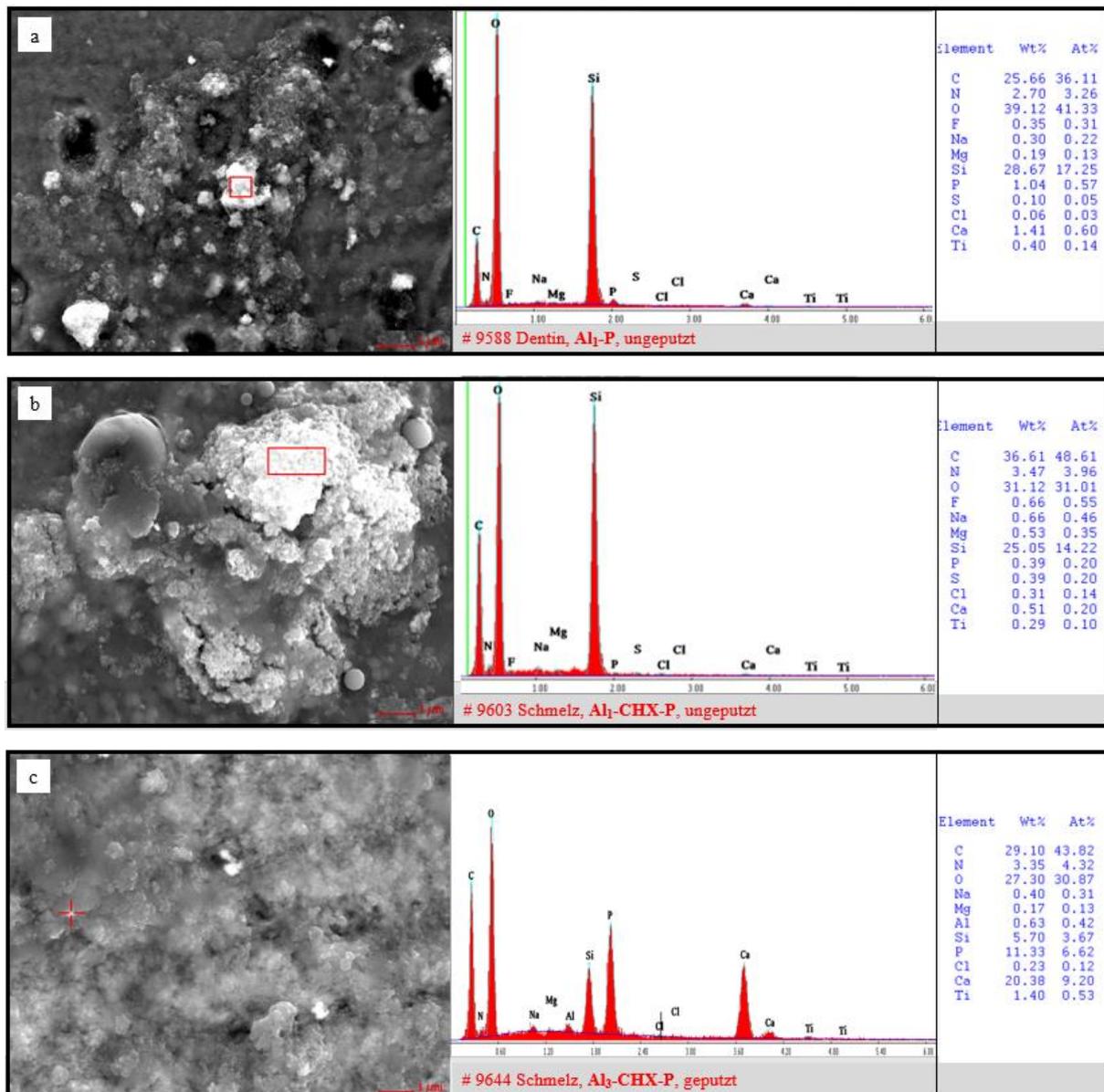


Abbildung 32: EDX- Aufnahmen von Schmelz- und Dentin-PK. a) Al₁-P. b) Al₁-CHX-P. c) Al₃-CHX-P. In allen drei Pasten konnten Siliziumdioxid-Putzkörper nachgewiesen werden. Diese lagern sich auf der Prüfkörperoberfläche oder in dem Biofilm als Zahnpastarückstand ab.

weiße Pigmente – Titandioxid

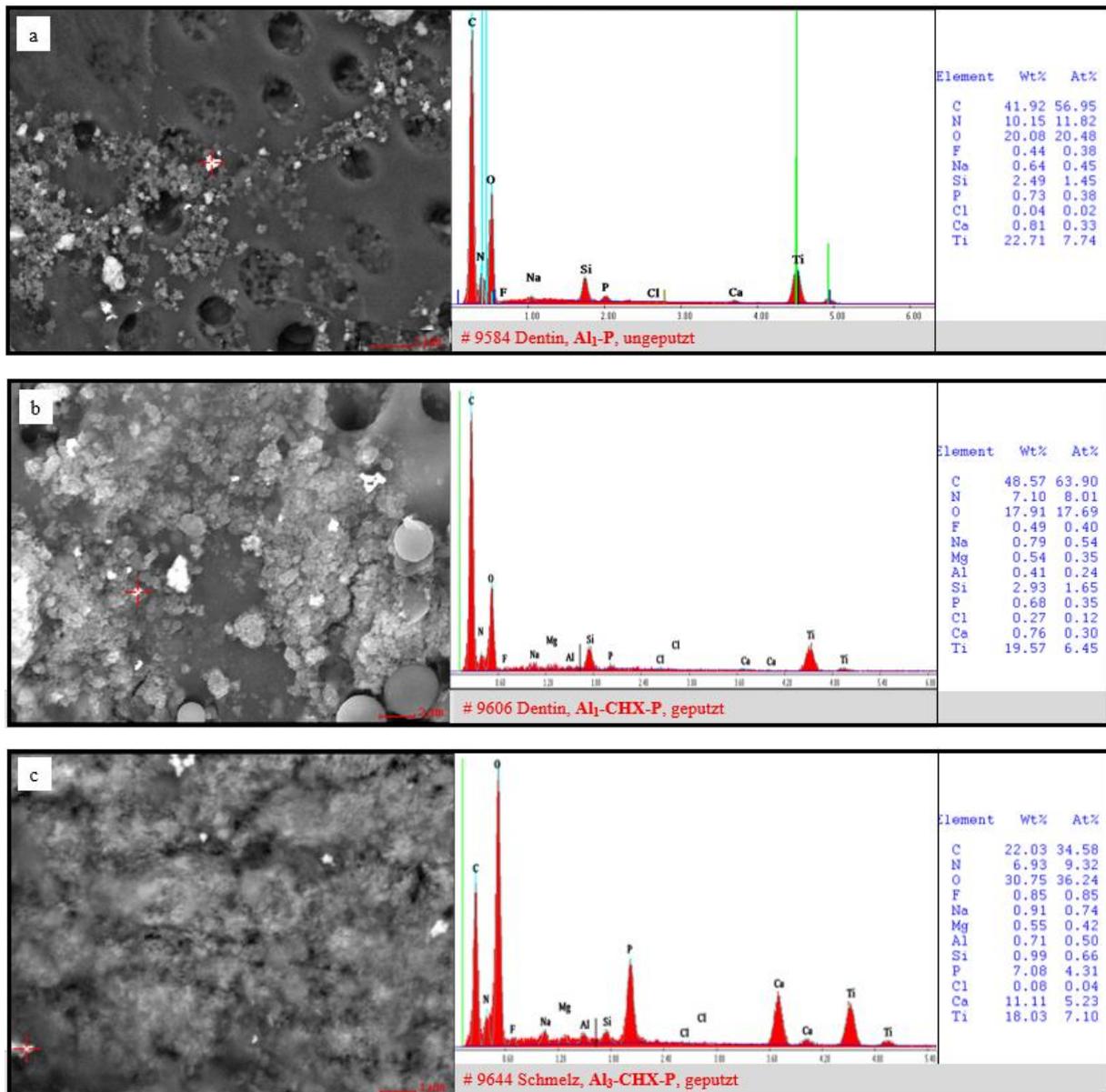


Abbildung 33: EDX- Aufnahmen von Schmelz- und Dentin-PK. a) Al₁-P. b) Al₁-CHX-P. c) Al₃-CHX-P. In allen drei Pasten konnten Titandioxid-Putzkörper nachgewiesen werden. Diese sind in Zahnpaste zur weißlichen Pigmentierung enthalten.

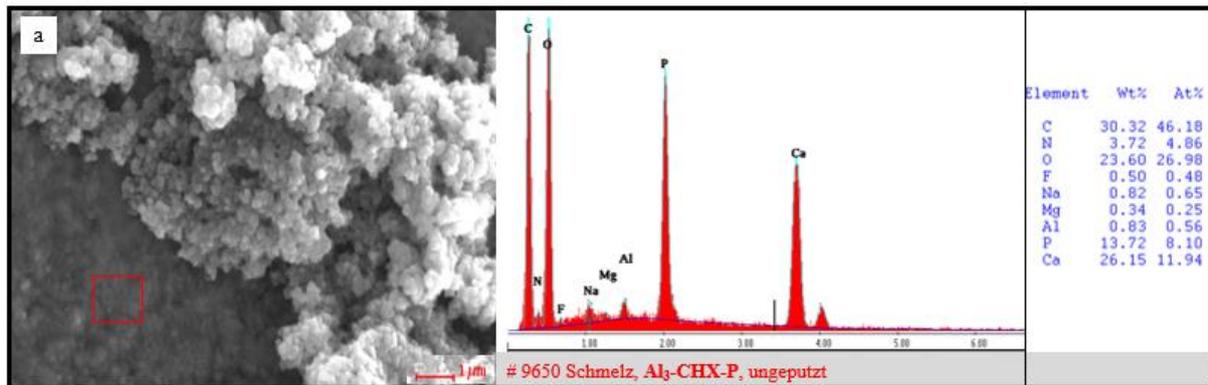
Aluminiumverbindungen

Abbildung 34: EDX- Aufnahmen eines Schmelz-PK, der mit Al₃-CHX-P umspült wurde. Die Nachweisgrenze liegt für die meisten Elemente mit einer Ordnungszahl > 10 bei 0,1 Gewichtsprozent. Aluminiumbestandteile wurden nur auf Prüfkörper, die mit Al₃-CHX-P geputzt oder umspült wurden, nachgewiesen (hier 0,83 Gew.-%). In allen drei Pasten konnten Titandioxid- Putzkörper nachgewiesen werden. Aluminium war nicht nur in Pastenrückständen, sondern auch auf Pellicel bedeckter Oberfläche nachweisbar.

5 Diskussion

5.1 Diskussion von Material und Methode

5.1.1 Fragestellung

Viele Studien beschreiben mit Hilfe klinischer Parameter wie dem Plaqueindex (PI), dem Gingivaindex (GI) oder dem Erfassen von Zahnverfärbungen und Zahnsteinbildung die Wirkung von antimikrobiellen Wirkstoffen wie Chlorhexidin. Nach einer Publikation von Barkvoll et al. 1989, in der eine *In-vivo*-Studie zeigt, dass die Wirkung von CHX durch Interaktionen mit anionischen Bestandteilen in Zahnpastaformulierungen wie Natriumlaurylsulfat signifikant gehemmt wird, sank das Interesse an der Integration von CHX in Zahnpasten. Heutzutage wird das Postulat und Studiendesign der Forschungsgruppe um Barkvoll et al. (1989) kritisch betrachtet und eine geringe Evidenz zugeschrieben, untersuchte man doch nur die Inkompatibilität von CHX-haltigen Mundspüllösungen nach der Anwendung von SLS-haltigen Zahnpasten, nicht aber beider Komponenten in einer einzigen Zahnpastaformulierung (Rathe et al., 2007; Slot et al., 2014; Elkerbout et al., 2016).

Klinische Studien belegen die Wirksamkeit von Chlorhexidin in Zahnpasten (Jenkins et al., 1993; Sanz et al., 1994; Slot et al., 2007) Yates et al. (1993) zeigte beispielsweise, dass eine CHX-haltige Zahnpaste effektiv zur Reduktion des Biofilms und der Gingivitis führte. In einer nachfolgenden Studie wurde nachgewiesen, dass CHX, als Bestandteil einer Zahnpaste, in der Lage ist, die Zahl der Anaerobier der subgingivalen Plaque zu hemmen (Maynard et al., 1993). Als Nebeneffekt der Langzeitanwendung von Chlorhexidin treten Verfärbungen an Zahnoberflächen und der Zunge auf, die zwar reversibel sind, aber zu einer verminderten Compliance der Patienten führen können. Obwohl die Zahnfärbung eine unerwünschte Wirkung des CHX ist, besteht eine vermutete Korrelation zwischen dem Verfärbungsgrad und der Effektivität (Addy et al. 1989; Addy et al., 2005; Slot et al., 2014). Forschungsgegenstand ist daher seit Jahrzehnten die orale Anwendung von Chlorhexidin als wirkungsvollste antibakterielle Substanz, für den alltäglichen Gebrauch zu ermöglichen. Rathe et al. publizierten 2007 eine Studie, die über einen Zeitraum von sechs Monaten einer mit Chlorhexidin und Aluminium-Lactat versetzten Zahnpaste (*Lacalut aktiv*, hier Al₃-CHX-P) einen Plaque und Gingivitis reduzierenden Effekt nachwies. Hier zeigten sich bei keinem Probanden Verfärbungen. Ursächlich vermuten die Autoren entweder eine eingeschränkte Wirkung des Chlorhexidins durch anionische Tenside wie SLS oder eine zu geringe Konzentration von 0,05%. Dennoch bleibt ein signifikanter antibakterieller Effekt im Vergleich zu Testpaste bestehen. Es bleibt folglich die Frage

bestehen, ob Aluminium-Ionen einen summativen Effekt zur antibakteriellen Wirkung von Chlorhexidin in Zahnpasteformulierungen ausüben können.

Zurzeit gibt es noch keine systematische Untersuchung zur Wirkungsweise von Chlorhexidin und Aluminium-Ionen in Zahnpasteformulierungen auf die initiale Biofilmbildung. Hierfür wurde ein Studienmodell entwickelt, das fünf verschiedene Zahnpasteformulierungen enthielt, die dank einer systematischen Konzeption ihrer Inhaltsstoffe einen statischen Vergleich der Wirkung von Aluminium und Chlorhexidin einzeln sowie in Kombination erlauben.

5.1.2 Kommerzielle und experimentelle Zahnpasten

Durch die Gestaltung eines *In-situ*-Modells ist ein Einfluss der Speichelproteine auf die initiale Biofilmbildung erfasst und in der Negativkontrolle Wasser repräsentiert. Neben Wasser diente eine Basispaste (B-P) ohne antimikrobielle Wirkstoffe als zweite Negativkontrolle. So können Einflüsse von universellen Zahnpastenbestandteilen wie Bindemitteln (Hydroxyethylzellulose), Lösungsmitteln (PEG-32), Tensiden (hier SLS) oder Putzkörpern (SiO_2 ; TiO_2) registriert werden.

Eine systematische Studie zur Untersuchung des Einflusses von Aluminium-Ionen und Chlorhexidin auf die initiale Biofilmbildung liegt zurzeit noch nicht vor. Um eine Aussage bezüglich der Biofilmhemmung zu treffen, ist es sinnvoll die Wirkstoffe einzeln als auch in Kombination zu untersuchen. Dabei erfordert es zunächst zwei Pasten, die neben den Bestandteilen der Basispaste nur Aluminium-Ionen (Al-P) oder Chlorhexidin 0,05% (B-CHX-P) enthalten. Repräsentativ für die Aluminiumpaste (Al-P) wurde eine kommerzielle Zahnpaste, *Lacalut white* (Dr. Theis Naturwaren, Homburg/Saar, Deutschland), verwendet. Diese basierte auf den Bestandteilen der Basispaste mit einem Zusatz von 0,8% Al-Lactat und 1360 ppm NaF. In Voruntersuchungen wurde ein möglicher Einfluss von NaF auf die initiale Biofilmbildung untersucht und negiert. Die Chlorhexidinpaste (B-CHX-P) diente als experimentelle Paste im Vergleich mit der Basispaste dem Nachweis der Wirkung von 0,05% Chlorhexidin.

Zur Überprüfung eines suggerierten additiven Effektes der Aluminium-Ionen und des Chlorhexidins auf die initiale Biofilmbildung und -vitalität wurden zwei kommerzielle Zahnpasten ausgewählt: *Lacalut extra sensitiv* (Al1-CHX-P) und *Lacalut aktiv* (Al3-CHX-P). Al1-CHX-P enthält 0,05% Chlorhexidin und 0,8% Aluminium-Lactat. Besonderheit der Al1-CHX-P ist die Verwendung eines anderen Tensides, Cocamidopropyl (CADP). Zurzeit gibt es keine Studien, die einen Einfluss des Cocamidopropyls und Chlorhexidin näher untersuchen. Chemisch ähnelt Cocamidopropyl der Struktur von SLS, das viel häufiger Anwendung in der

Zahnmedizin findet. Darüber hinaus enthält A11-CHX-P, neben NaF, Olaflur. Olaflur gehört zur Stoffgruppe der Aminfluoride und wird zur Kariesprophylaxe eingesetzt. A13-CHX-P enthält drei Aluminium-Moleküle: Aluminium-Lactat, Aluminiumfluorid und Aluminiumhydroxid und 0,05% Chlorhexidin.

5.1.3 Verwendung und Herstellung boviner Prüfkörper

Zur Untersuchung des Biofilms im Rahmen von *In-situ*-Studien gibt es verschiedene Möglichkeiten der Prüfkörper für die intraorale Exposition. Sowohl die Verwendung humaner als auch boviner Zähne ist im Forschungsgebiet der Biofilmstudien etabliert (Jung et al., 2010; Wegehaupt et al., 2010; Wang et al., 2012). Studien haben gezeigt, dass bovines und humanes Zahnmaterial eine nahezu gleiche chemische Zusammensetzung aufweisen (Esser et al., 1998). Folglich können Untersuchungen auf bovinen Prüfkörpern der Praktikabilität wegen durchgeführt werden und es sind keine Unterschiede in der Biofilmbildung auf humanem Zahnmaterial zu erwarten (Hannig et al., 2007). Die Verwendung von bovinen Unterkieferzähnen ermöglicht die einfache Herstellung standardisierter Prüfkörper mit einer homogenen Oberfläche. Die Größe der Zähne erleichtert den Herstellungsprozess enorm. (Nakamichi et al., 1983; Hannig et al., 2005; Hannig et al., 2007). Des Weiteren ist es einfacher, eine ausreichende Zahl vergleichbarer Zähne zu erhalten. Die Rinderzähne entstammen alle dem gleichen Schlachthof, was darauf schließen lässt, dass die Rinder aus der gleichen Region auch ähnlichen Umweltfaktoren ausgesetzt sind (Wegehaupt et al., 2010). Es wurden nur Zähne von zweijährigen Rindern verwendet, die nahezu kariesfrei sind und eine gleiche Mineralisation aufweisen. Eine Prüfkörperanzahl von $n = 576$ wäre mit vergleichbarem humanem Zahnmaterial nur schwer realisierbar.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die initiale Biofilmbildung durch Nischen und Oberflächenunebenheiten begünstigt wird. Hier finden Bakterien Schutz vor Scherkräften (Quirynen & Bollen, 1995). Um eine plane, uniforme Prüfkörperoberfläche für die Versuchsdurchführung zu erhalten, wurden die Prüfkörper mit einer Nassschleifmaschine und Schleifpapier der Körnung 2500 beschliffen. Durch die Politur werden größere Kristalle an der Schmelzoberfläche eliminiert und es entsteht eine homogene Zusammensetzung der Mineralien. Dies schafft eine ideale Voraussetzung, um die Biofilmbildung auf den Prüfkörpern zu vergleichen.

Obwohl die anfängliche bakterielle Adhäsion auf gesunden Zähnen vorwiegend auf der anorganischen Schmelzoberfläche stattfindet, ist es zunehmend auch von großer Relevanz, die

initiale Biofilmbildung auf den Dentinoberflächen zu studieren (Jung et al., 2010). Dentin kann durch parodontale Erkrankungen oder größere kariogene, erosive oder abrasive Zahnhartsubstanzdefekte freiliegen und so eine adhärenente Basis für Proteine und Mikroorganismen darstellen. Die Struktur und Zusammensetzung des Dentins lässt eine unterschiedliche Ausprägung der Biofilmbesiedlung und Wirksamkeit antibakterieller Substanzen erwarten. Jung et al. zeigte 2010 ähnlich zu früheren Studien in einer *In-vivo*-Studie, dass die Zahl der Mikroorganismen auf Dentinprüfkörpern mit der oralen Expositionszeit signifikant anstieg, wohingegen sich auf den Schmelzprüfkörpern eine Konstanz zeigte (Hannig et al., 2007; Al-Ahmad et al., 2009; Jung et al., 2010). Darüber hinaus wurde eine generell größere bakterielle Besiedlung auf dem Dentin im Vergleich mit Schmelzoberflächen beobachtet (Nyvad & Fejerskov, 1987; Jung et al., 2010). Dies basiert vermutlich auf einer Interaktion der Bakterien mit organischen Strukturkomponenten der Kollagenmatrix. Die Besiedlung oraler Streptokokken beruht auf der spezifischen Adhäsion an Typ I Kollagen, dem vorherrschenden Kollagentyp im Dentin (Love, 2002). Darüber hinaus gilt es nicht außer Acht zu lassen, dass die Dentintubuli eine Nische für die Bakterienadhäsion bieten können, in denen sie geringeren Scherkräften ausgesetzt sind.

Ein Problem bei der Analyse der Biofilme auf Schmelz- und Dentinprüfkörpern stellt die Eigenfluoreszenz im Zusammenhang mit fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen dar (vgl. [Abb. 12](#)). Eine computergestützte Auswertung ist aufgrund dieser Interferenz zur Bestimmung des Anteils vitaler und toter Bakterien nur eingeschränkt möglich. Netuschil et al. (1998) verwendete daher für *In-situ*-Studien Prüfkörper aus Glas. Dies verhindere zwar die beschriebenen Interferenzen, wäre aber in Bezug auf die physiologischen Bioadhäsionsprozesse bovinen Prüfkörper unterlegen.

5.1.4 *In-situ*-Biofilmmodell

Zur Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung von Zahnpastaformulierungen oder Mundspüllösungen muss zunächst ein geeignetes Biofilmmodell gewählt werden. Hierzu wurden in der Vergangenheit verschiedene Studien anhand von *In-vitro*- und *In-situ*-Modellen durchgeführt (vgl. Kapitel 2.1.2). *In-vitro*-Studien finden in experimenteller Umgebung statt und können so die Eigenschaften desinfizierender Substanzen in der Mundhöhle nur eingeschränkt wiedergeben (Cummins & Creeth, 1992). Die Organisation der Mikroorganismen in strukturierten Biofilmen hat einen erheblichen Einfluss auf die Resistenzentwicklung gegenüber antimikrobieller Substanzen (Anwar et al., 1992; Costerton, 1995). Speichelproteine sind im natürlichen Prozess der Pellikel- und initialen Biofilmbildung beteiligt (Hannig, 2002). Einige Speichelkomponenten (wie Glykoproteine, Statherine, Fibronectin oder Amylase) fördern die Haftung

der Bakterienzellen an pellicelbedeckten Oberflächen. Histatine, Cystatine, Peroxidasen oder Antikörper des IgA-Typs wiederum spielen aufgrund ihrer antimikrobiellen Eigenschaften oder ihrer Fähigkeit, die Bakterienkolonisation zu stören, eine defensive Rolle (Williams & Gibbons, 1972; Scannapieco, 1994). Chlorhexidin zeichnet sich durch seine hohe Substantivität aus, d.h. es verbleiben durchschnittliche 30% des Wirkstoffes an der Zahnoberfläche und den Schleimhäuten (Bonesvoll, 1977; Greenstein et al., 1986). Allerdings sollte nicht unerwähnt bleiben, dass die Bedeutung des oralen Reservoirs antimikrobieller Substanzen mit hoher Substantivität von mehreren Autoren in Frage gestellt wird (Giertsen et al., 2000). In einer früheren Studie wurde kein signifikanter Unterschied im Plaquewachstum beobachtet, abhängig davon, ob eine Spülung mit CHX intraoral stattfand oder die Kontamination der Prüfkörper mit CHX extraoral durchgeführt wurde und die Prüfkörper anschließend wieder in die Mundhöhle eingesetzt wurden (Jenkins et al., 1988). Dennoch sind *In-vitro*-Modelle aufgrund der beschriebenen Fakten nur unzureichend in der Lage, den Einfluss oraler Chemotherapeutika auf die initiale Biofilmbildung zu beschreiben.

Optimal wäre es, den Biofilm direkt am natürlichen Ort auf der Zahnoberfläche zu entnehmen. Das Lösen der dünnen Plaqueschicht erwies sich aber als schwierig (Robinson et al., 1997).

Zur Studie der Wirkung oraler Chemotherapeutika auf die initiale Biofilmbildung haben sich heutzutage *In-situ*-Biofilmmodelle etabliert (Auschill et al., 2005). In Anlehnung an bereits publizierte Studien wurde eine Tragedauer von 24 h ausgewählt, um einen möglichen Vergleich der Ergebnisse und eine gute Compliance der Probanden zu gewährleisten. *In-situ*-Modelle ermöglichen eine Biofilmbildung unter oralen Bedingungen und gleichzeitig eine erleichterte Entnahmemöglichkeit des Biofilms. In der vorliegenden Studie wurden weiche Miniplast-Schienen zur Montage boviner Prüfkörper verwendet. Durch Aussparung des Frontzahnbereichs bieten diese den Probanden einen hohen Tragekomfort und keine ästhetischen Nachteile. Die Schienen konnten zur Nahrungsaufnahme entfernt werden und in einem feuchten Milieu gelagert werden. Das weiche A-Silikon ermöglicht die einfache und vorsichtige Entfernung der Prüfkörper ohne Zerstörung des Biofilms nach der Tragezeit. Durch eine definierte Anordnung der Prüfkörper werden lokale Einflüsse wie Speichelfluss oder Nischenbildung möglichst geringgehalten. Ein relativer Nachteil des *In-situ*-Biofilmmodells gegenüber *In-vitro*-Modellen ist die Reproduzierbarkeit. Zusätzlich muss auf eine genaue Ausführung des Putzprotokolls und Einhaltung der Tragezeit durch die Probanden vertraut werden.

5.1.5 Studienbedingungen

Zur Minimierung der interindividuellen Unterschiede wurden möglichst detaillierte Studienbedingungen aufgestellt: Voraussetzung für die Teilnahme war ein kariesinaktives, parodontal gesundes Gebiss und eine normale Salivation. Probanden mit Vorerkrankungen, Medikamenten oder Bestrahlungen, die einen verminderten Speichelfluss oder eine eingeschränkte Abwehrlage bedingen, wurden ausgeschlossen, da dies zu einer veränderten Pellikel- und Biofilmbildung führen kann. Die Probanden wurden angehalten, während der Tragedauer nur Wasser zu trinken, um durch säurehaltige Getränke erosive Prozesse an den Prüfkörpern zu verhindern. Jede Tragerunde wurde im Hinblick auf den zirkadianen Rhythmus der Speichelflussrate immer auf 8 Uhr am Morgen festgelegt. Für das dreimal tägliche Putzen nach 30 min, 12 h und 23,5 h wurde jedem Probanden eine einheitliche Zahnbürste ausgehändigt, um die mechanische Reinigung der Prüfkörper auf der rechten Seite möglichst ähnlich durchzuführen. Aufgrund der hohen Anzahl von sechs verschiedenen Bedingungen und der aufwändigen Analyseverfahren war nur eine kleine Anzahl von sechs Probanden im Rahmen dieser Studie realisierbar. Vergleichbare experimentelle Studien aus dem gleichen Forschungsgebiet arbeiten aus den beschriebenen Gründen zumeist auch nur mit einer ähnlich kleinen Probandenzahl (Arweiler et al., 2004)

5.1.6 Darstellung und Quantifizierung des Biofilms

Zur Detektion und Visualisierung einzelner adhärenter Bakterien oder Bakterienagglomerate auf den Prüfkörperoberflächen können unterschiedliche Methoden angewandt werden. Nach entsprechender Färbung dienen die Lichtmikroskopie oder Konfokale Laser Scanning Mikroskopie der Visualisierung vitaler und avitaler Mikroorganismen (Hannig et al., 2007). Zur morphologischen Beschreibung des Biofilms stehen die Rasterelektronenmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie zur Verfügung. Diese ermöglichen detaillierte Aufnahmen bis zu einer 200.000-fachen Vergrößerung, weisen allerdings den Nachteil eines aufwendigen Fixierungsprozesses und anschließender Einbettung auf (Hannig 1999a; Nyvad & Fejerskov, 1987). Eine Kultivierung ist nur für selektive Bakterienspezies möglich, so dass nicht das gesamte Spektrum der Mikroorganismen eines dentalen Biofilms erfasst werden kann. Letztlich ist die Anwendung einfacher Methoden zur direkten Visualisierung adhärenter Bakterien, ohne sie von ihrem natürlichen Medium zu entfernen, wünschenswert (Hannig et al., 2007).

Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie bietet die Möglichkeit zur Visualisierung adhärenter Bakterien auf der Prüfkörperoberfläche. Während fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wie *In-situ*-Hybridisierung (FISH) oder 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) die Möglichkeit bieten, selektive Bakterienspezies oder alle Zellen anzufärben, gibt es weitere Methoden, die die Differenzierung von lebenden oder toten Organismen ermöglichen (Tawakoli et al., 2013). Zur Studie der antimikrobiellen Wirksamkeit einer Substanz ist es von großem Interesse mit Hilfe von live/dead staining zu verifizieren, ob die adhärenenten Bakterien vital oder tot sind (Hannig et al., 2007; Al-Ahmad et al., 2009).

Einer der ersten Farbstoffe, die für den Nachweis von lebensfähigen Zellen verwendet wurden, war Fluoresceindiacetat (FDA). Dieser Farbstoff entwickelt seine Fluoreszenz nach intrazellulärem Metabolismus und emittiert grünes Licht (Netuschil, 1983). Andere Farbstoffe wie SYTO 17 oder Syto 9 grün basieren auf der Interkalation in die DNA (Desoxyribonukleinsäure) oder RNA (Ribonukleinsäure). Sie haben die Fähigkeit, intakte Membrane und Zellkerne für die lebende Zellfluoreszenzmikroskopie zu durchdringen (Tawakoli et al., 2013). Der erste fluoreszenzmikroskopische Nachweis toter Bakterien gelang mit Ethidiumbromid (Etbr). Nachdem die großen Etbr-Moleküle über die permeable Membran toter Zellen diffundiert sind, lagern sie sich in der DNA an und fluoreszieren orange. Aufgrund der potentiellen Mutagenität findet Etbr heute keine Anwendung mehr. Heutzutage finden verschiedene Färbemittel wie BacLight, FDA/Sytoxred, Calcein AM/Sytox red und CFDA/Sytox red Anwendung (Tawakoli et al., 2013).

In der vorliegenden Studie wurde zur Färbung das BacLight™ bacterial viability kit angewendet. Es besteht aus zwei Farblösungen, Propidiumiodid (PI) und SYTO 9, die beide Nukleinsäuren anfärben. SYTO 9 ist grün-fluoreszierend und membranpermeabel und färbt so alle Zellen an. Im Gegensatz dazu ist PI ein rotfluoreszierendes Molekül, das nicht in der Lage ist, die Zellmembran zu überwinden und so nicht in „gesunde“ Zellen eindringen kann. Der Hersteller gibt an, dass PI eine höhere Affinität zu Nukleinsäuren aufweist, sodass SYTO 9 verdrängt werden kann und die Zelle, wenn beide Farbstoffe inkorporiert sind, rot leuchtet (Netuschil et al., 2014). Folglich leuchten vitale Zellen mit einer intakten Membran grün und devitale Zellen rot. Allerdings sollten auch negative Konsequenzen des Färbeprozesses mit dem BacLight™ bacterial viability kit nicht unerwähnt bleiben. Giertsen et al. (2000) beschreibt, dass sich die grüne Fluoreszenz lebender Zellen als instabil erwies und der Anteil der roten Fluoreszenz sich mit der Dauer der Belichtungszeit durch das Mikroskop erhöhte. Dies könne zu einer Diskrepanz

der erwarteten Biofilmvitalität und dem Ergebnis der SYTO 9 / PI- Färbung führen (Netuschil et al., 2014). Tawakoli et al. (2013) postulieren, dass gefärbte Zellen kurz nach der Interkalation der Farbstoffe ihre Lebensfähigkeit verloren haben. Netuschil et al. (2014) bestätigten dies durch TEM-Analysen, die eine Lyse und Zerstörung adhärenter Zellen fanden. Daher ist eine schnelle Auswertung nach der Inkubationszeit von 10 min mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops nötig.

Scoring der Bedeckung und Vitalität

In Anlehnung an die Stadien der Biofilmbildung wurde ein Scoring-System zur Beschreibung der Biofilmbedeckung eines Prüfkörpers angewandt (Rupf et al., 2012). 24 h *in situ* getragene Prüfkörper, die nicht mechanisch gereinigt wurden, zeigen große dreidimensionale Bakterienkolonien bis hin zu mehrschichtigem Biofilm, der nahezu die gesamte Prüfkörperoberfläche bedeckt. Eine Auszählung einzelner Bakterien ist aufgrund der mehrdimensionalen Kolonien und der Überlagerungen nur schwer realisierbar. Des Weiteren ist eine Auszählung aufgrund der Eigenfluoreszenz der Prüfkörper unmöglich. Vor allem Dentinprüfkörper machen eine computergestützte Auswertung aufgrund ihrer fluoreszierenden Dentintubuli unmöglich. Zuletzt konnte mit Hilfe rasterelektronenmikroskopischer Untersuchungen beobachtet werden, dass sich einzelne Bakterienkolonien in den offenen Dentintubuli anlagern. Diese können auf fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nicht im Detail erfasst werden, was zu einer geringen Zahl der sichtbaren Bakterien führen würde.

Aus der bereits erläuterten Schwierigkeit der Eigenfluoreszenz der Prüfkörper wurde auch zur Bestimmung der Vitalität des Biofilms ein Scoring-System angewandt (Rupf et al., 2012). Lediglich für die Aufnahmen ungeputzter Schmelzprüfkörper konnten, über Regulierung des Kontrastes, die beschriebenen Interferenzen beglichen werden, sodass die Prüfkörper keine Eigenfluoreszenzen mehr zeigten und nur der Biofilm zu sehen war. Hier wurde unterstützend zu dem Scoring eine Auswertung mit Hilfe des Bildanalyseprogramms *Image J* durchgeführt.

Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie diente unterstützend zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der morphologischen Beschreibung adhärenter Bakterien sowie der Matrix des Biofilms dank einer detailreichen Darstellung mit bis zu 20.000 facher Vergrößerung. Des Weiteren sind mit Hilfe der energiedispersiven Röntgenspektroskopie Elementanalysen der Prüfkörperoberfläche, des Biofilms und adhärenter Zahnpastenbestandteilen möglich. Aufgrund des

aufwändigen Fixierungs- und Mikroskopierprozesses ist die systematische Untersuchung einer großen Prüfkörperanzahl nur eingeschränkt möglich.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Biofilmbildung unterlag unabhängig der Zahnpasten interindividuellen Unterschieden. Diese beruhen vermutlich auf den Ernährungsgewohnheiten, der Speichelflussrate und dem individuellen Mikrobiom eines jeden Probanden.

Bei 24 h *in situ* befindlichen Prüfkörpern sind zumeist kokkenförmige Bakterien im Biofilm zu identifizieren. Bei einer Prüfkörperpositionierung in der Molarenregion ohne Nischenbildung ist ein der supragingivalen Plaque ähnlicher Biofilm zu erwarten, der durch eine frühe Kolonisation der Bakterienspezies *S. oralis*, *S. mitis* und *S. gordonii* gekennzeichnet ist.

Wasser und Basispaste

Es ist bekannt, dass die mechanische Reinigung der Zahnoberflächen Voraussetzung für eine effektive Plaquereduktion ist (Paraskevas et al., 2006). Valkenburg et al. veröffentlichten 2016 ein Review zur Untersuchung der Wirksamkeit des Zähneputzens mit und ohne Zahnpaste. Im Durchschnitt wurden 49,2% der Plaque durch Putzen mit einer Zahnpaste und 50,3% der Plaque durch das alleinige mechanische Putzen entfernt. Es wurde demnach kein signifikanter Unterschied zwischen dem Zähneputzen mit und ohne Zahnpasta beobachtet. Dies spiegelt sich auch in der vorliegenden Studie wieder. Weder für Schmelz- noch für Dentinprüfkörper konnte eine signifikante Hemmung der initialen Biofilmbildung durch Anwendung der Basispaste im Vergleich zu Wasser festgestellt werden. Eine Erklärung für den negativen bzw. fehlenden Einfluss der Zahnpasta auf die Plaqueentfernung könnte die durch die Paste hervorgerufene Gleitwirkung sein (Valkenburg et al., 2016). Die Präsenz des Pastenschaums reduziert die Scherkräfte der Bürstenfilamente, die dann leichter über die Zahnoberfläche gleiten und weniger Plaque entfernen können (Paraskevas et al., 2006). Prüfkörper, die von Wasser oder Basispaste umspült wurden, zeigten große Bakterienagglomerate bis hin zu mehrschichtigem Biofilm, der nahezu die gesamte Bakterienoberfläche bedeckte (vgl. [Abb. 17](#) und [22](#)). Es liegt nahe, dass die Dentintubuli eine Nische für die Bakterienadhäsion bilden. Oberflächenunebenheiten begünstigen die Pellikelbildung und bakterielle Kolonisation (Hannig & Hannig, 2009). Dennoch konnten in der statischen Auswertung der Biofilmbedeckung keine Unterschiede der Biofilmbedeckung auf Dentin- und Schmelzprüfkörpern festgestellt werden. Das auf der Fluoreszenzmikroskopie basierende Scoring wurde durch rasterelektronische Aufnahmen unterstützt. Hier waren auf Prüfkörper, die mit Wasser oder Basispaste umspült wurden, große bakterielle Kolonien

sichtbar, die größtenteils aus Kokken bestanden und in einer strukturierten Biofilmmatrix eingebettet waren (vgl. Bilder b) + d) [Abb. 27](#) und [28](#)). Prüfkörper, die zusätzlich aktiv mechanisch gereinigt wurden, zeigten auch Areale geringer Biofilmbesiedlung. Eine ausreichende Hemmung der initialen Biofilmbildung konnte aber durch alleinige mechanische Reinigung mit Wasser oder Basispaste nicht erreicht werden.

Chlorhexidin

Chlorhexidin gilt als Goldstandard der chemischen Plaquekontrolle (Jones, 1997). Die Zugabe von 0,05% Chlorhexidin zur Basispaste zeigte einen signifikanten Einfluss auf die Biofilmbedeckung im Vergleich zu mit Wasser umspülten oder geputzten Prüfkörpern. Der Anteil der vitalen Bakterien im Biofilm nahm für alle Bedingungen im Vergleich zur Basispaste signifikant ab. Die initiale Biofilmbildung wurde signifikant im Vergleich zu mit Wasser geputzten oder umspülten Prüfkörpern gehemmt. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen weisen große Areale Pellikel-bedeckter Oberflächen auf. Einzelne Bakterienkolonien sind in einer Biofilmmatrix und Zahnpastarückständen eingebettet. Der antibakterielle Effekt beruht auf der Bindung des kationischen Moleküls an die negativ geladene Zellmembran der Bakterien. Dies führt zum Verlust der strukturellen Integrität der Zellmembran und so zur Lyse der Bakterien (Kaur et al., 2015). Es gibt nur wenige Publikationen, die die antibakterielle Wirkung von Chlorhexidin in Zahnpastaformulierungen untersuchen (Jenkins et al., 1993; Yates et al., 1993; Sanz et al., 1994; Rathe et al., 2007). Nach einem 2006 veröffentlichten Review galt es als Annahme, dass Chlorhexidin nicht in Zahnpasten inkorporiert werden sollte. Chlorhexidin wird eine Interaktion mit anionischen Tensiden wie Natriumlaurylsulfat nachgesagt. Es bilden sich Salze geringer Löslichkeit und Chlorhexidin ist in seiner antimikrobiellen Aktivität eingeschränkt (Kolahi & Soolari, 2006; Barkvoll et al., 1989). Allerdings ist die Evidenz dieser Studien gering und eine derartige Schlussfolgerung ist kritisch zu betrachten, da die Inkompatibilität nur für liquide Lösungen bekannt ist und alle involvierten Studien nur SLS-haltige Zahnpasten in Kombination mit CHX-haltigen Mundspüllösungen untersuchten. Studien, die die Interaktionen von Chlorhexidin in Zahnpastaformulierungen untersuchen fehlen (Rathe et al., 2007). Langzeitstudien zur Anwendung von Chlorhexidin-haltigen Mundspüllösungen oder Zahnpasten zeigten häufig das Problem der Zahn- und Zungenverfärbung (Flotra et al., 1971; Claydon et al., 2006; van Strydonck et al., 2012). Dies führt darüber hinaus zu einer verminderten Compliance der Patienten. Um eine Langzeitanwendung chlorhexidinhaltiger Zahnpasten zu ermöglichen, wurde in der vorliegenden Studie eine geringe Konzentration von 0,05% CHX verwendet. Rathe et al. publizierten 2007 eine klinische Studie zum Vergleich einer

0,05% CHX-haltige Zahnpasta (*Lacalut aktiv*) und einer Placebo-Paste. Bei einer täglichen Anwendung über 6 Monate blieben Verfärbungen aus. Im Gegensatz dazu, berichten Studien bei Verwendung 1%-igen Chlorhexidin-Paste über deutliche Verfärbungen der Zähne und Zunge im Vergleich zur Kontrollgruppe (Jenkins et al., 1993; Yates et al., 1993). Sanz et al. (1994) untersuchten eine 0,4%-ige CHX-Zahnpasta. Als Negativkontrolle diente eine Placebo-Mundspüllösung und als Positivkontrolle eine 0,12%-ige CHX-Spüllösung. Die Mundspüllösungen wurden nach dem Zähneputzen angewandt. Es wurden signifikant mehr Verfärbungen bei der chlorhexidinhaltigen Spüllösung registriert im Vergleich zur experimentellen 0,4%-igen CHX-Zahnpasta. Die Autoren vermuten in dieser Beobachtung einen Einfluss der abrasiven Bestandteile einer Zahnpasta. Es scheint, dass durch die abrasiven Prozesse die negativen Auswirkungen der Zahnverfärbungen ausbleiben (Rathe et al., 2007). Eine 0,05%-ige Chlorhexidin-Zahnpasta scheint einen reduzierenden Einfluss auf die Biofilmneubildung sowie auf die Biofilmvitalität zu besitzen.

Aluminium

Bereits 1980 wurde von einem antimikrobiellen Effekt von Aluminiumsalzen gegenüber kariogenen Mikroorganismen berichtet (Oppermann & Rolla, 1980). Unter dem Hintergrund das ionomere Füllungsmaterialien antikariogene und antimikrobielle Eigenschaften aufweisen, belegte die Arbeitsgruppe um Hayacibara et al. (2003) die antibakterielle Wirkung von Aluminium-Ionen, die neben Fluorid bei der Abbindeaktion der Glasionomermemente freigesetzt werden (Benelli et al., 1993; Hayacibara et al., 2003). Ebenso finden Aluminiumverbindungen in Sulkusfäden Anwendung. Durch ihre antimikrobielle Eigenschaften sollen sie akuten Gingiva-Entzündungen nach der Einlage der Verdrängungsfäden vorbeugen (Goutham et al., 2018). Eine vergleichende *In-situ*-Studie zur Wirkung von Aluminium in Zahnpastaformulierungen auf die initiale Biofilmbildung liegt zurzeit nicht vor. Rathe et al. schrieben in einer klinischen Studie Aluminium-Lactat vorwiegend einen positiven Effekt zur Rehabilitation des parodontalen Weichgewebes zu. Dies beruhe auf den adstringierenden und koagulativen Eigenschaften der Aluminium-Ionen. Die Probanden empfanden das Zahnfleisch nach 6-monatiger Anwendung als entzündungsfrei und gefestigt. Es zeigte sich eine Verbesserung des Gingiva-Index. Ein Plaque hemmender Effekt durch Aluminium-Ionen wurde hier widersagt und zur Erklärung des stagnierenden Plaque-Index über den Testzeitraum herangezogen (Rathe et al., 2007). Die Hypothese der antimikrobiellen Wirkung von Aluminium konnte in der vorliegenden Studie mit einer kommerziellen Aluminium-Lactat-Paste (*Lacalut white*, A11-P) bestätigt werden. Es zeigte sich eine deutliche Hemmung der initialen Biofilmbildung. Auf geputzte

Schmelz- und Dentinprüfkörper zeigten sich vorwiegend nur noch isolierte kleine Bakterienagglomerate. Ein Großteil der Prüfkörperoberfläche war frei von Biofilm. Das alleinige Umspülen mit einer Aluminium-Lactat-Paste wies ebenso einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu mit Wasser oder Basispaste umspülten Prüfkörper auf. Der Anteil der avitalen Bakterien stieg an.

Aluminium und Chlorhexidin in Kombination

Zur Überprüfung der Wirkungsweise von Aluminium und Chlorhexidin in Kombination wurden zwei kommerzielle Zahnpasten in die Studie eingeschlossen. Während *Lacalut extra sensitiv* (A11-CHX-P) Aluminium-Lactat und Chlorhexidin enthält, zählt *Lacalut aktiv* (A13-CHX-P) zusätzlich Aluminiumfluorid und Aluminiumhydroxid zu seinen Inhaltsstoffen. Im Gegensatz zu allen anderen verwendeten Zahnpasten dieser Studie beinhaltet *Lacalut extra sensitiv* das Tensid Cocamidopropyl. CAPB-haltige Zahnpasten gelten als weniger irritierend und entlasten Symptome des trockenen Mundes (Soderling et al., 1998; Rantanen et al., 2003). Die Arbeitsgruppe um Müller et al. untersuchte 12 Mundspüllösungen bezüglich deren Zelltoxizität und antimikrobiellen Aktivität *in vitro*. CAPB-haltige Mundspüllösungen zeigten einen hohen Wirkungsgrad. Cocamidopropyl ist in der Lage das Wachstum von Pro- und Eukaryoten zu unterdrücken (Müller et al., 2017). Darüber hinaus enthält *Lacalut extra sensitiv* Olafur, das zur Stoffgruppe der Aminfluoride zählt. Widererwarten zeigte sich kein summativer Effekt der Wirkstoffe Aluminium-Lactat und Chlorhexidin beim Putzen oder Umspülen mit *Lacalut extra sensitiv*. Es war zwar eine Hemmung der initialen Biofilmbildung im Vergleich zu Wasser und Basispaste sichtbar, eine Steigerung gegenüber der einzelnen Substanzen in der Chlorhexidin-Basispaste oder der Aluminium-Lactatpaste blieben allerdings aus. Wechselwirkung zwischen Chlorhexidin und CAPB in Zahnpastaformulierungen wurden in der Literatur nicht beschrieben. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten große organische Putzkörper auf den Prüfkörperoberflächen, die eine Retentionsfläche für Biofilm und Zahnpastarückstände zu bieten scheinen (vgl. [Abb. 31](#)). Weitere Untersuchungen bezüglich der Wechselwirkung zwischen Chlorhexidin, CAPB und Olafur könnten Aufschluss über die scheinbar hemmende Interaktion der Zahnpastenbestandteile geben. Die alleinige Kombination von Aluminium-Lactat und Chlorhexidin führt nicht zu einer gesteigerten Hemmung der initialen Biofilmbildung und Biofilmvitalität im Vergleich zu den Wirkstoffen alleine.

Bei Anwendung der Pasta *Lacalut aktiv* hingegen war eine deutliche Hemmung der initialen Biofilmbildung zu verzeichnen. Nahezu alle Schmelz- und Dentinprüfkörper, die aktiv mit dieser Paste geputzt wurden, zeigten eine bakterienfreie Oberfläche. Nur einzelne avitale Bakterien

waren zu finden. Auch das dreimalige Umspülen der Prüfkörper innerhalb 24 h, führte zu einer effektiven Hemmung der Biofilmneubildung. Die Zugabe von Aluminiumhydroxid und Aluminiumfluorid erhöht den quantitativen Anteil von Aluminium in der Paste und scheint einen entscheidenden Anteil zur Effektivität der Plaquehemmung zu haben. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten zwar großflächige Zahnpastarückstände aber keine Bakterienansiedlungen auf den Prüfkörperoberflächen. Nur auf mit *Lacalut aktiv* umspülten Prüfkörpern, konnte mit Hilfe der Energiedispersiven Röntgenspektroskopie Aluminium nachgewiesen werden. Auch auf der Pellikel-bedeckten Oberfläche schien sich Aluminium anzureichen. Somit wird die antibakterielle Wirkung durch die finale Konzentration der Metallionen am Ort der Wirkung, auf der Zahnoberfläche, beeinflusst. Die Kombination von Chlorhexidin und Aluminium-Lacat, Aluminium-Hydroxid, Aluminium-Fluorid und Chlorhexidin scheint eine effektive Hemmung der Biofilmneubildung zu bewirken und stellt eine gute Möglichkeit zur chemischen Plaquekontrolle dar.

5.3 Schlussfolgerung

Mit Hilfe der Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass alle wirkstoffhaltigen Pasten dieser Versuchsreihe einen Einfluss auf die initiale Biofilmbedeckung haben. Die alleinige Verwendung von 0,05% Chlorhexidin zeigt eine begrenzte antibakterielle Wirkung. Aluminiumlactat scheint auch eine antibakterielle Wirkung zu besitzen. Letztendlich kann die Kombination von Aluminium-Ionen und Chlorhexidin zu einer signifikanten Abnahme der Biofilmbedeckung und Vitalität führen. Der Einfluss von Tensiden und Zahnpastabestandteilen auf den Wirkmechanismus von Aluminium-Ionen und Chlorhexidin bleibt fraglich und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

6 Literaturverzeichnis

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE (2005) Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin microbiology* 43:5721–5732
2. Addy M, Jenkins S, Newcombe R (1989) Studies on the effect of toothpaste rinses on plaque regrowth. (I). Influence of surfactants on chlorhexidine efficacy. *J Clin Periodontol* 16:380–384
3. Addy M, Sharif N, Moran J (2005) A non-staining chlorhexidine mouthwash? Probably not: a study in vitro. *Int J Dent Hyg* 3:59–63
4. Al-Ahmad A, Follo M, Selzer A-C, Hellwig E, Hannig M, Hannig C (2009) Bacterial colonization of enamel in situ investigated using fluorescence in situ hybridization. *J Med Microbiol* 58:1359–1366
5. Anwar H, Strap JL, Costerton JW (1992) Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 36:1347–1351
6. Arweiler NB, Auschill TM, Reich E, Netuschill L (2002) Substantivity of toothpaste slurries and their effect on reestablishment of the dental biofilm. *J Clin Periodontol* 29:615–621
7. Arweiler NB, Hellwig E, Sculean A, Arweiler NB (2004) Individual vitality pattern of in situ dental biofilms at different locations in the oral cavity. *Caries Res* 38:442–447
8. Auschill TM, Hein N, Hellwig E, Follo, M; Sculean A, Arweiler NB (2005) Effect of two antimicrobial agents on early in situ biofilm formation. *J Clin Periodontol* 32:147–152
9. Barkvoll P, Rolla G, Svendsen K (1989) Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium lauryl sulfate in vivo. *J Clin Periodontol* 16:593–595
10. Barnett ML (2006) The rationale for the daily use of an antimicrobial mouthrinse. *J Am Dent Assoc* 137:16-21
11. Bellamy PG, Khera N, Day TN, Musset AJ, Barker ML (2009) A randomized clinical study comparing the plaque inhibition effect of a SnF2/SHMP dentifrice (blend-a-med EXPERT GUMS PROTECTION) and a chlorhexidine digluconate dentifrice (Lacalut Aktiv). *J Clin Dent* 20:33–38

12. Bellamy PG, Boulding A, Farmer S, Day TN, Mussett AJ, Barker ML (2011) Clinical comparison of plaque inhibition effects of a novel stabilized stannous fluoride dentifrice and a chlorhexidine digluconate dentifrice using digital plaque imaging. *J Clin Dent* 22:144–148
13. Benelli EM, Serra MC, Rodrigues AL, Cury JA (1993) In situ anticariogenic potential of glass ionomer cement. *Caries Res* 27:280–284
14. Bennick A, Cannon M, Madapallimattam G (1979) The nature of the hydroxyapatite-binding site in salivary acidic proline-rich proteins. *Biochem J* 183:115–126
15. Berchier CE, Slot DE, van der Weijden GA (2010) The efficacy of 0.12% chlorhexidine mouthrinse compared with 0.2% on plaque accumulation and periodontal parameters: a systematic review. *J Clin Periodontol* 37:829–839
16. Bonesvoll P (1977) Oral pharmacology of chlorhexidine. *J Clin Periodontol* 4:49–65
17. Bowen WH, Koo H (2011) Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res* 45:69–86
18. Brex M (1997) Strategies and agents in supragingival chemical plaque control. *Periodontology* 2000:100–108
19. Busscher HJ, White DJ, Kamminga-Rasker HJ, Poortinga AT, van der Mei HC (2003) Influence of oral detergents and chlorhexidine on soft-layer electrokinetic parameters of the acquired enamel pellicle. *Caries Res* 37:431–436
20. Busscher HJ, Norde W, van der Mei HC (2008) Specific molecular recognition and non-specific contributions to bacterial interaction forces. *Appl Environ Microbiol* 74:2559–2564
21. Cisar JO, Sandberg AL, Mergenhagen SE (1984) The function and distribution of different fimbriae on strains of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii*. *J Dent Res* 63:393–396
22. Claydon NCA, Addy M, Adams G, Smith SR, Bosman ML, North, Moran J (2006) A comparison of two chlorhexidine gel brushing regimens and a conventional toothpaste brushing regimen for the development of tooth staining over a 6-week period. *Int J Dent Hyg* 4:183-188

23. Costerton JW (1995) Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol Biotechnol* 15:137–140
24. Cummins D, Creeth JE (1992) Delivery of antiplaque agents from dentifrices, gels, and mouthwashes. *J Dent Res* 71:1439–1449
25. Davey ME, O'Toole GA (2000) Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:847–867
26. Do T, Devine D, Marsh PD (2013) Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. *Clin Cosmet Investig Dent* 5:11–19
27. Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167–193
28. Elkerbout TA, Slot DE, Bakker EWP, van der Weijden GA (2016) Chlorhexidine mouthwash and sodium lauryl sulphate dentifrice: do they mix effectively or interfere? *Int J Dent Hyg* 14:42–52
29. Emilson CG (1994) Potential efficacy of chlorhexidine against mutans streptococci and human dental caries. *J Dent Res* 73:682–691
30. Esser M, Tinschert J, Marx R (1998) Materialkennwerte der Zahnhartsubstanz des Rindes im Vergleich zur humanen Zahnhartsubstanz. *Dtsch Zahnärztl Z* 53:713–717
31. Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 14:563–575
32. Flotra L, Gjermo P, Rolla G, Waerhaug J (1971) Side effects of chlorhexidine mouth washes. *Scand J Dent Res* 79:119–125
33. Forng RY, Champagne C, Simpson W, Genco CA (2000) Oral Microbiology: Environmental cues and gene expression in *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Dis* 6:351–365
34. Franco Neto CA, Parolo CCF, Rosing CK, Maltz M (2008) Comparative analysis of the effect of two chlorhexidine mouthrinses on plaque accumulation and gingival bleeding. *Braz Oral Res* 22:139–144
35. Frandsen A (1985) Changing patterns of attitudes and oral health behavior. *Int Dent* 35:284–290

36. Ganss C, Lussi A, Grunau O (2011) Conventional and anti-erosion fluoride toothpastes: effect on enamel erosion and erosion-abrasion. *Caries Res* 45:581–589
37. Geurtsen W, Hellwig E, Klimek J (2016) Kariesprophylaxe bei bleibenden Zähnen - grundlegende Empfehlungen: S2k-Leitlinie. AWMF online - das Portal der wissenschaftlichen Medizin
38. Giertsen E, Guggenheim B, Thurnheer T, Gmur R (2000) Microbiological aspects of an in situ model to study effects of antimicrobial agents on dental plaque ecology. *Eur J Oral Sci* 108:403–411
39. Gjermo P, Bonesvoll P, Rolla G (1974) Relationship between plaque-inhibiting effect and retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *Arch Oral Biol* 19:1031–1034
40. Gong K, Mailloux L, Herzberg MC (2000) Salivary film expresses a complex, macromolecular binding site for *Streptococcus sanguis*. *J Biol Chem* 275:8970–8974
41. Goudouri O-M, Kontonasaki E, Lohbauer U, Boccaccini AR (2014) Antibacterial properties of metal and metalloid ions in chronic periodontitis and peri-implantitis therapy. *Acta Biomater* 10:3795–3810
42. Goutham GB, Jayanti I, Jalaluddin M, Avjeeta A, Ramanna PK, Joy J (2018) Clinical assessment of gingival sulcus width using various gingival displacement materials. *J Contemo Dent Pract* 19:502-506
43. Greenstein G, Berman C, Jaffin R (1986) Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol* 57:370–377
44. Hannig C, Hannig M, Attin T (2005) Enzymes in the acquired enamel pellicle - review. *Eur J Oral Sci* 113:2–13
45. Hannig C, Hannig M, Rehmer O, Braun G, Hellwig E, Al-Ahmad A (2007) Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. *Arch Oral Biol* 52:1048–1056
46. Hannig C, Hannig M (2009) The oral cavity-a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig* 12:123–139
47. Hannig M (1998) Elektronenmikroskopische Untersuchungen der initialen Bioadhäsionsprozesse an Festkörperoberflächen in der Mundhöhle: Eine klinisch-experimentelle

- Studie. Zugl.: Kiel, Univ., Habil.-Schr., 1994. Habilitationsschriften der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde. Quintessenz-Verl., Berlin
48. Hannig M (1999a) Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials in vivo. *Eur J Oral Sci* 107:55–64
 49. Hannig M (1999b) Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Investig* 3:88–95
 50. Hannig M (1999c) Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials in vivo. *Eur J Oral Sci* 107:55–64
 51. Hannig M (2002) The protective nature of the salivary pellicle. *Int Dent J* 52:417–423
 52. Hannig M, Dobert A, Stigler R, Müller U, Prokhorova SA (2004) Initial salivary pellicle formation on solid substrates studied by AFM. *J Nanosci Nanotechnol* 4:532–538
 53. Hannig M, Joiner A (2006) The Structure, Function and Properties of the Acquired Pellicle. *Monogr Oral Sci* 19:29–64
 54. Harvey JD (2017) Periodontal Microbiology. *Dent Clin North Am* 61:253–269
 55. Hayacibara MF, Rosa OPS, Koo H (2003) Effects of fluoride and aluminum from ionomeric materials on *S. mutans* biofilm. *J Dent Res* 82: 267–271
 56. Hibbs AR (2004) Imaging Software. In: Hibbs AR (ed) *Confocal Microscopy for Biologists*. Springer US, Boston, pp 163–176
 57. Hoffmann T, Bruhn G, Richter S, Netuschil L, Brex M (2001) Clinical controlled study on plaque and gingivitis reduction under long-term use of low-dose chlorhexidine solutions in a population exhibiting good oral hygiene. *Clin Oral Investig* 5:89–95
 58. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N (2009) Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res* 88:982–990
 59. Hugoson A, Norderyd O (2008) Has the prevalence of periodontitis changed during the last 30 years?. *J Clin Periodontol* 35:338-345
 60. Iontcheva I, Oppenheim FG, Troxler RF (1997) Human salivary mucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatins. *J Dent Res* 76:734–743
 61. Jenkins S, Addy M, Wade W (1988) The mechanism of action of chlorhexidine. A study of plaque growth on enamel inserts in vivo. *J Clin Periodontol* 15:15–424

62. Jenkins S, Addy M, Newcombe R (1993) The effects of a chlorhexidine toothpaste on the development of plaque, gingivitis and tooth staining. *J Clin Periodontol* 20:59–62
63. Jenkins S, Addy M, Newcombe RG (1994) Dose response of chlorhexidine against plaque and comparison with triclosan. *J Clin Periodontol* 21:250–255
64. Jenkinson HF, Terry SD, McNab R, Tannock GW (1993) Inactivation of the gene encoding surface protein SspA in *Streptococcus gordonii* DL1 affects cell interactions with human salivary agglutinin and oral actinomyces. *Infect Immun* 61:3199–3208
65. Joiner A, Schwarz A, Philpotts CJ, Cox TF, Huber K, Hannig M (2008) The protective nature of pellicle towards toothpaste abrasion on enamel and dentine. *J Dent* 36:360–368
66. Jones CG (1997) Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol 2000* 15:55–62
67. Jung DJ, Al-Ahmad A, Follo M, Spitzmuller B, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C (2010) Visualization of initial bacterial colonization on dentine and enamel in situ. *J Microbiol Methods* 81:166–174
68. Kaur G, Archana S, Patil KP, Kaustubh P, Gopalakrishnan A, Nayyar AS (2015) Chlorhexidin: a cationic bisbiguanide, membrane active drug in periodontal medicine, structure-advantages and associated adverse effects, a brief communication. *J Pharm Sci Pharmacol* 7:370–392
69. Kleber CJ, Putt MS (1984) Aluminum and dental caries. A review of the literature. *Clin Prev Dent* 6:14–25
70. Kleber CJ, Putt MS (1992) Inhibitory effect of aluminum on fissure caries formation in rats (short communication). *Caries Res* 26:53–55
71. Kleist S, Callaway A (2013) Von Generalisten und Spezialisten: die Rolle der Bakterien in der ökologischen Plaquehypothese. *ZMK* 9:548–559
72. Klug B, Santigli E, Westendorf C, Tangl S, Wimmer G, Grube M (2016) From Mouth to Model: Combining in vivo and in vitro Oral Biofilm Growth. *Front Microbiol* 7:1448
73. Kolahi J, Soolari A (2006) Rinsing with chlorhexidine gluconate solution after brushing and flossing teeth: a systematic review of effectiveness. *Quintessence Int* 37:605–612
74. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ (2002) Communication among Oral Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:486–505

75. Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Melvin L, Leys EJ (2005) Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J Clin Microbiol* 48:3944–3955
76. Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W (2007) Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:653-670
77. Lang NP, Catalanotto FA, Knopfli RU, Antczak AA (1988) Quality-specific taste impairment following the application of chlorhexidine digluconate mouthrinses. *J Clin Periodontol* 15:43–48
78. Larsen T, Fiehn N-E (2017) Dental biofilm infections - an update. *APMIS* 125:376–384
79. Loe H, Schiott CR (1970) The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res* 5:79–83
80. Loe H, Fehr FR von der, Schiott CR (1972) Inhibition of experimental caries by plaque prevention. The effect of chlorhexidine mouthrinses. *Scand J Dent Res* 80:1–9
81. Longbottom C, Ekstrand K, Zero D (2009) Traditional preventive treatment options. *Monogr Oral Sci* 21:149–155
82. Love RM (2002) The effect of tissue molecules on bacterial invasion of dentine. *Oral Microbiol Immunol* 17:32–37
83. Maeda K, Nagata H, Nonaka A, Kataoka K, Tanaka M, Shizukuishi S (2004) Oral streptococcal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mediates interaction with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Microbes Infect* 6:1163–1170
84. Marsh PD, Bradshaw DJ (1995) Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* 15:69–175
85. Marsh PD (2005) Dental plaque: biological significance of a biofilm and community lifestyle. *J Clin Periodontol* 32:7–15
86. Marsh PD (2006) Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health* 6:14-16
87. Marsh PD (2010) Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *J Dent* 38:11-15
88. Marsh PD, Moter A, Deirdre A et al. (2011) Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol 2000* 55:16–35
89. Martin MV, Marsh PD (eds) (2003) *Orale Mikrobiologie*, 1. Auflage. Thieme, Stuttgart.

90. Maynard JH, Jenkins SM, Moran J, Addy M, Newcombe RG, Wade WG (1993) A 6-month home usage trial of a 1% chlorhexidine toothpaste (II). Effects on the oral microflora. *J Clin Periodontol* 20:207–211
91. Meyer-Lueckel H, Wierichs RJ, Gninka B, Heldmann P, Dorfer CE, Paris S (2015) The effect of various model parameters on enamel caries lesions in a dose-response model in situ. *J Dent* 43:1261–1267
92. Molecular probes (2001) Product information BacLight™ bacterial viability kit 2001
93. Moreno EC, Kresak M, Hay DI (1982) Adsorption thermodynamics of acidic proline-rich human salivary proteins onto calcium apatites. *J Biol Chem* 257:2981–2989
94. Müller H-D, Eick S, Moritz A, Lussi A, Gruber R (2017) Cytotoxicity and antimicrobial activity of oral rinses in vitro. *Biomed Res Int* 2017:1-9
95. Nakamichi I, Iwaku M, Fusayama T (1983) Bovine teeth as possible substitutes in the adhesion test. *J Dent Res* 62:1076–1081
96. Netuschil L (1983) Vital staining of plaque microorganisms using fluorescein diacetate and ethidium bromide (Vitalfärbung von Plaque-Mikroorganismen mit Fluoresceindi-acetat und Ethidiumbromid). *Dtsch Zahnärztl Z* 38:914–917
97. Netuschil L, Ausschil TM, Sculean A, Arweiler NB (2014) Confusion over live/dead stainings for the detection of vital microorganisms in oral biofilms-which stain is suitable? *BMC Oral Health* 14:2-6
98. Neunzehn J, Weber M-T, Wittenburg G, Lauer G, Hannig C, Wiesmann H-P (2014) Dentin-like tissue formation and biomineralization by multicellular human pulp cell spheres in vitro. *Head Face Med* 10:25
99. Nyvad B, Fejerskov O (1987) Transmission electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 95:297–307
100. Nyvad B, Kilian M (1987) Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 95:369–380
101. Olympio KPK, Bardal PAP, M Bastos JR, Buzalaf MAR (2006) Effectiveness of a chlorhexidine dentifrice in orthodontic patients: a randomized-controlled trial. *J Clin Periodontol* 33:421–426

102. Oppermann RV (1979) Effect of chlorhexidine on acidogenicity of dental plaque in vivo. *Scand J Dent Res* 87:302–308
103. Oppermann RV, Rolla G, Johansen JR, Assev S (1980) Thiol groups and reduced acidogenicity of dental plaque in the presence of metal ions in vivo. *Scand J Dent Res* 88:389–396
104. Palmer RJ, Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE (2003) Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. *J Bacteriol* 185:3400–3409
105. Paraskevas S, Timmerman MF, van der Velden U (2006) Additional effect of dentifrices on the instant efficacy of toothbrushing. *J Periodontol* 77:1522–1527
106. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE (2006) The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol* 2000 42:80–87
107. Peterson PE, Burgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C (2005) The global burden of oral disease and risks to oral health. *Bull World Health Organ* 83:661–669
108. Putt MS, van der Weijden GA, Kleber CJ, Saxton CA (1993) Validation of a 21-day, partial-mouth gingivitis model for evaluating chemotherapeutic dentifrices. *J Periodontol* 28:301–307
109. Quirynen M, Bollen CM (1995) The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol* 22:1–14
110. Rantanen I, Tenovuori J, Pienihakkinen K (2003) Effects of a betaine-containing toothpaste on subjective symptoms of dry mouth: a randomized clinical trial. *J Contemp Dent Pract* 4:11–23
111. Rathe F, Auschill TM, Sculean, Gudsuhn C, Arweiler NB (2007) The plaque and gingivitis reducing effect of a chlorhexidine and aluminium lactate containing dentifrice (Lacalut aktiv) over a period of 6 months. *J Clin Periodontol* 34:646–651
112. Rittman BE (1982) The effect of shear stress on biofilm loss rate. *Biotechnol Bioeng* 24:501–506

113. Robinson C, Kirkham J, Percival R, Shore RC, Bonass WA, Brookes SJ (1997) A Method for the Quantitative Site-Specific Study of the Biochemistry within Dental Plaque Biofilms Formed in vivo. *Caries Res* 31:194–200
114. Rogers JD, Palmer RJ, Kolenbrander PE, Scannapieco FA (2001) Role of *Streptococcus gordonii* amylase-binding protein A in adhesion to hydroxyapatite, starch metabolism, and biofilm formation. *Infect Immun* 69:7046–7056
115. Rolla G, Melsen B (1975) On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res* 54:57-62
116. Rupf S, Balkenhol M, Sahrhage TO, Baum A, Chromik JN, Ruppert K, Wissenbach DK, Maurer HH, Hannig M (2012) Biofilm inhibition by an experimental dental resin composite containing octenidine dihydrochloride. *Dent Mater* 28:974–984
117. Russell AD, Day MJ (1993) Antibacterial activity of chlorhexidin. *J Hosp Infect* 25:229–238
118. Sanz M, Vallcorba N, Fabregues S, Müller L, Herkstroter F (1994) The effect of a dentifrice containing chlorhexidine and zinc on plaque, gingivitis, calculus and tooth staining. *J Clin Periodontol* 21:431–437
119. Saunders KA, Greenman J (2000) The formation of mixed culture biofilms of oral species along a gradient of shear stress. *J Appl Microbiol* 89:564–572
120. Saxen L, Niemi ML, Ainamo J (1976) Intraoral spread of the antimicrobial effect of a chlorhexidine gel. *Scand J Dent Res* 84:304–307
121. Scannapieco FA (1994) Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit Rev Oral Biol Med* 5:203–248
122. Schiffner U (1995) Mechanische und chemische Plaquereduktion: wissenschaftliche Stellungnahme. *Dtsche Zahnärztl Z* 50:863–864
123. Sheiham A (1991) Public health aspects of periodontal diseases in Europe. *J Clin Periodontol* 18:362–369
124. Shibata S, Nakamura R, Tsunemitsu A, Misaki A (1979) Strain differences in binding of parotid saliva basic glycoprotein by oral streptococci. *J Dent Res* 58:2006–2007
125. Silverman S, Wilder R (2006) Antimicrobial mouthrinse as part of a comprehensive oral care regimen. Safety and compliance factors. *J Am Dent Assoc* 137:22-26

126. Sissons CH (1997) Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res* 11:110–126
127. Skjorland K, Gjermo P, Rolla G (1978) Effect of some polyvalent cations on plaque formation in vivo. *Scand J Dent Res* 86:103–107
128. Slot DE, Lindeboom R, Rosema NAM, Timmerman MF, van der Weijden GA (2007) The effect of 0.12% chlorhexidine dentifrice gel on plaque accumulation: a 3-day non-brushing model. *Int J Dent Hyg* 5:45–52
129. Slot DE, Berchier CE, Addy M, van der Velden U, van der Weijden GA (2014) The efficacy of chlorhexidine dentifrice or gel on plaque, clinical parameters of gingival inflammation and tooth discoloration: a systematic review. *Int J Dent Hyg* 12:25–35
130. Slot DE, Rosema NAM, Hennequin-Hoenderdos NL, Versteeg PA, van der Velden U, van der Weijden GA (2010) The effect of 1% chlorhexidine gel and 0.12% dentifrice gel on plaque accumulation: a 3-day non-brushing model. *Int J Dent Hyg* 8:294–300
131. Soderling E, Le Bell A, Kirstila V (1998) Betaine-containing toothpaste relieves subjective symptoms of dry mouth. *Acta Odontol Scand* 56:65–69
132. Sonju T, Rolla G (1973) Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. Rate of formation and amino acid analysis. *Caries Res* 7:30–38
133. Spacciapoli P, Buxton D, Rothstein D, Friden P (2001) Antimicrobial activity of silver nitrate against periodontal pathogens. *J Periodont Res* 36:108–113
134. Supranoto SC, Slot DE, Addy M, van der Weijden GA (2015) The effect of chlorhexidine dentifrice or gel versus chlorhexidine mouthwash on plaque, gingivitis, bleeding and tooth discoloration: a systematic review. *Int J Dent Hyg* 13:83–92
135. Takahashi N, Nyvad B (2008) Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res* 42:409–418
136. Tawakoli PN, Al-Ahmad A, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C (2013) Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clin Oral Investig* 17:841–850

137. ter Steeg PF, van der Hoeven JS, Jong MH, van Munster PJ, Jansen MJ (1987) Enrichment of subgingival microflora on human serum leading to accumulation of *Bacteroides* species, *Peptostreptococci* and *Fusobacteria*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 53:261–272
138. Vacca Smith A, Bowen W (2000) In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Arch Oral Biol* 45:277–291
139. Valkenburg C, Slot DE, Bakker EW, van der Weijden GA (2016) Does dentifrice use help to remove plaque? A systematic review. *J Clin Periodontol* 43:1050–1058
140. van der Weijden F, Slot DE (2011) Oral hygiene in the prevention of periodontal diseases: the evidence. *Periodontol 2000* 55:104–123
141. van Hoogmoed CG, Geertsema-Doornbusch GI, Teughels, Quirynen M, Busscher HJ, vander Mei HC (2008) Reduction of periodontal pathogens adhesion by antagonistic strains. *Oral Microbiol Immunol* 23:43–48
142. van Strydonck DAC, Slot DE, van der Velden U, van der Weijden F (2012) Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. *J Clin Periodontol* 39:1042–1055
143. Varoni E, Targe M, Lodi G, Carassi A (2012) CHX in dentistry-state of the art. *Minerva Stomatol* 61:339–419
144. Vassilakos N, Arnebrant T, Glantz PO (1993) An in vitro study of salivary film formation at solid/liquid interfaces. *Scand J Dent Res* 101:133–137
145. Vinholis AH, Figueiredo LC, Marcantonio Junior E, Marcantonio RA, Salvador S, Goisis G (2001) Subgingival utilization of a 1% chlorhexidine collagen gel for the treatment of periodontal pockets. A clinical and microbiological study. *Braz Dent J* 12:209–213
146. Vitkov L, Hannig M, Nekrashevych Y, Krautgartner WD (2004) Supramolecular pellicle precursors. *Eur J Oral Sci* 112:320–325
147. Waerhaug M, Gjermo P, Rolla G, Johansen JR (1984) Comparison of the effect of chlorhexidine and CuSO₄ on plaque formation and development of gingivitis. *J Clin Periodontol* 11:176–180
148. Wang C, Li Y, Wang X, Xiaomiao Z, Tiantang F, Fu B (2012) The enamel microstructures of bovine mandibular incisors. *Anat Rec* 295:1698–1706

149. Wegehaupt FJ, Widmer R, Attin T (2010) Is bovine dentine an appropriate substitute in abrasion studies? *Clin Oral Investig* 14:201–205
150. Wikipedia (2018) Chlorhexidin.
URL: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chlorhexidin.svg>
151. Williams RC, Gibbons RJ (1972) Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal. *Science* 177:697–699
152. Yates R, Jenkins S, Newcombe R, Wade W, Moran J, Addy M (1993) A 6-month home usage trial of a 1% chlorhexidine toothpaste (1). Effects on plaque, gingivitis, calculus and toothstaining. *J Clin Periodontol* 20:130–138
153. Young A, Rykke M, Rolla G (1999) Quantitative and qualitative analyses of human salivary micelle-like globules. *Acta Odontol Scand* 57:105–110
154. Zero DT, van Houte J, Russo J (1986) The intra-oral effect on enamel demineralization of extracellular matrix material synthesized from sucrose by *Streptococcus mutans*. *J Dent Res* 65:918–923
155. Zhang Q, van Palenstein Helderma WH, van't Hof MA, Truin G-J (2006) Chlorhexidine varnish for preventing dental caries in children, adolescents and young adults: a systematic review. *Eur J Oral Sci* 114:449–455
156. Zickert I, Emilson CG, Krasse B (1982) Effect of caries preventive measures in children highly infected with the bacterium *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 27:861–868

7 Publikation / Danksagung

7.1 Publikation

Die Ergebnisse der Studie wurden im Abstractband der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde anlässlich der 49. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Grundlagenforschung im Januar 2017 publiziert (Vortrag V29, Hemmung der Biofilmbildung durch chlorhexidinhaltige Zahnpastaformulierungen. Laura Fouquet, Matthias Hannig, Stefan Rupf, Universitätsklinikum des Saarlandes, Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde, Homburg/Saar, Deutschland).

Im Rahmen des Deutschen Zahnärztetages im November 2017 erfolgten die Teilnahme am Dentsply Nachwuchsförderpreis und eine Posterpräsentation.

7.2 Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Stefan Rupf, für das Überlassen des interessanten Themas und die fachliche Unterstützung bedanken. Dank seiner Ratschläge und wertvollen Diskussionen, hat er zur Fertigstellung dieser Dissertation beigetragen.

Auch Herrn Prof. Dr. Matthias Hannig, Direktor der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes, danke ich für seine Bereitschaft zur Diskussion der Studienmodelle und schwieriger Sachverhalte.

Dr. Natalia Umanskaya danke ich für die Hilfe während der Laborarbeit. Mit ihrer Erfahrung und ihrem Wissen unterstütze sie mich bei der praktischen Ausführung der Versuche und lehrte mich die Methodik der Prüfkörperherstellung und Analyseverfahren.

Herrn Norbert Pütz danke ich für die Unterstützung bei der Rasterelektronenmikroskopie.

Bei Frau Neissius-Paul möchte ich mich für die Herstellung der Miniplast-Schienen bedanken.

Ein großer Dank geht natürlich auch meinen Studienkollegen, die als Probanden mit ihrer Geduld und Zuverlässigkeit diese Studie erst ermöglichten.

Einen besonders liebevollen Dank widme ich meinem Mann Dennis Urgatz.

Zuletzt danke ich meiner Mutter und meinen Großeltern, die mit ihrer Liebe und Unterstützung immer für mich da sind.