

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde,

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. M. Hannig

Einfluss experimenteller Mundspüllösungen auf die bakterielle Biofilm-Bildung *in-situ*

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

vorgelegt von:

Anton Schestakow

geb. am: 05.10.1994 in Nowodwinsk (Russland)

Tag der Promotion: 25. Januar 2021

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Hannig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Karl

*Meinen Eltern und meinem Bruder
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet*

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1	Deutsche Zusammenfassung	1
1.2	Abstract.....	2
2	EINLEITUNG	3
2.1	Literaturübersicht.....	3
2.1.1	Epidemiologie oraler Erkrankungen	3
2.1.2	Einführung in die Prävention	3
2.1.3	Biofilm	4
2.1.4	Karies	5
2.1.5	Mundspülungen.....	6
2.1.6	Chlorhexidin	6
2.1.7	Tanninsäure.....	8
2.1.8	Hydroxylapatit	10
2.1.9	Chitosan	12
2.2	Ziel der Arbeit / Fragestellung.....	13
3	MATERIAL UND METHODE	15
3.1	Probanden	15
3.2	Prüfkörper	15
3.3	Prüfsubstanzen	16
3.4	Versuchsablauf	17
3.5	LIVE/DEAD® <i>BacLight</i> TM	18
3.6	Rasterelektronenmikroskopie	20

3.7	Statistik	21
4	ERGEBNISSE	23
4.1	LIVE/DEAD® <i>BacLight</i> TM - Bedeckung.....	23
4.2	LIVE/DEAD® <i>BacLight</i> TM - Vitalität.....	25
4.3	Rasterelektronenmikroskopie	26
5	DISKUSSION	34
5.1	Probanden	34
5.2	Prüfkörper	34
5.3	Studiendesign.....	35
5.4	Auswertungsverfahren	36
5.5	Spülung mit Wasser (Negativkontrolle)	39
5.6	Spülung mit Chlorhexidin (Positivkontrolle)	40
5.7	Spülung mit Tanninsäure (pH = 2,5)	41
5.8	Spülung mit Tanninsäure (pH = 7) und Salzsäure-Lösung	42
5.9	Spülung mit Hydroxylapatit	43
5.10	Spülung mit Chitosan	44
5.11	Ausblick.....	45
5.12	Schlussfolgerungen.....	46
6	LITERATURVERZEICHNIS	47
7	PUBLIKATION / DANKSAGUNG	60
7.1	Publikation.....	60

7.2	Danksagung	60
8	ANHANG	61
8.1	Materialliste	61
8.2	Datenblätter.....	64
8.2.1	Tanninsäure.....	64
8.2.2	Hydroxylapatit	65
8.2.3	Chitosan	66
8.3	Ergebnisse Datensatz.....	67
8.3.1	Bedeckung.....	67
8.3.2	Vitalität	68
9	LEBENS LAUF	69

Abkürzungsverzeichnis

CHX	Chlorhexidin
DD	Deacetylierungsgrad
FM	Fluoreszenzmikroskop
HAP	Hydroxylapatit
MW	Molekulargewicht
PK	Prüfkörper
REM	Rasterelektronenmikroskop
RT	Raumtemperatur

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Ziel: In dem vorliegenden *in-situ*-Versuch wird die antibakterielle und antiadhärente Wirkung von Tanninsäure, Hydroxylapatit und Chitosan auf die Biofilm-Bildung unter Mundhöhlenbedingungen untersucht.

Material und Methode: Sechs Probanden haben Oberkiefer-Schienen mit bovinen Schmelz-Prüfkörper getragen, um eine Biofilm-Bildung zu ermöglichen. Während des zweitägigen Versuchs haben die Probanden mit experimentellen Mundspüllösungen gespült, die entweder Salzsäure (pH = 2,5), Tanninsäure (5%; pH = 2,5), Tanninsäure (5%; pH = 7), Hydroxylapatit (5%) oder Chitosan (0,5%) enthalten haben. Wasser diente als Negativ- und Chlorhexidin (0,2%) als Positivkontrolle. Die Spülung erfolgte 4 oder 5 Mal nach zwei verschiedenen Spülprotokollen, dadurch konnte sowohl die sofortige als auch die langanhaltende Wirkung untersucht werden. Nach einer 48-stündigen intraoralen Exposition wurde der Biofilm mit LIVE/DEAD *BacLight* gefärbt, und die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit der Software ImageJ ausgewertet. Die Ergebnisse wurden mit der Rasterelektronenmikroskopie verifiziert.

Ergebnisse: In der Negativkontrolle Wasser waren die Prüfkörper zur Hälfte mit Biofilm bedeckt, der aus gleichen Anteilen lebender und toter Bakterien bestand. Mit der Positivkontrolle Chlorhexidin konnte die Bedeckung der Prüfkörper mit Biofilm und die Vitalität des Biofilms kurzfristig und langanhaltend am stärksten reduziert werden. Die Spülung mit Hydroxylapatit ergab einen geringfügigen antiadhärenten Effekt, wohingegen die Spülung mit Chitosan zusätzlich antibakteriell wirkte. Keines der beiden Mundspüllösungen zeigte eine langanhaltende Wirkung, während die Spülung mit Tanninsäure (pH = 2,5) eine langanhaltende Wirkung ergab. Mit Ausnahme der etwas geringeren antibakteriellen Wirkung war die Spülung mit der neutralen Lösung der Tanninsäure genau so gut wie mit der sauren Lösung. Die Salzsäure-Lösung zeigte weder einen antibakteriellen noch einen antiadhärenten Effekt auf die dentale Biofilm-Bildung.

Schlussfolgerung: Tanninsäure zeigt selbst bei neutralem pH-Wert vielversprechende antibakterielle und antiadhärente Effekte, während die Verwendung von Hydroxylapatit oder Chitosan unter den gewählten Versuchsbedingungen die Biofilm-Bildung nicht nachhaltig beeinflussen konnte.

1.2 Abstract

Title: Effects of experimental agents on the bacterial biofilm formation *in-situ*.

Objectives: In the present *in-situ* study the antibacterial and anti-adherent effect of tannic acid, hydroxyapatite and chitosan on biofilm formation on enamel was investigated.

Materials and methods: Six subjects carried upper jaw splints with bovine enamel specimens, allowing *in-situ* biofilm formation. During the two-day trial, subjects rinsed with experimental agents that contained either hydrochloric acid (pH = 2.5), tannic acid (5%, pH = 2.5), tannic acid (5%, pH = 7), hydroxyapatite (5%) or chitosan (0.5%). Water served as negative and chlorhexidine (0.2%) as positive control. Rinsing was performed 4 or 5 times following two different rinsing protocols to investigate both the immediate and long-lasting effect. After 48 h of intraoral exposure, dental plaque was stained with LIVE/DEAD *BacLight* and fluorescence micrographs were evaluated by using the software ImageJ. The results were verified by scanning electron microscopy.

Results: In the negative control water, specimens were half covered with biofilm consisting of equal amounts of living and dead bacteria. With the positive control chlorhexidine, the coverage of specimens with biofilm and the viability of the biofilm were reduced the most in the short and long term. Rinsing with hydroxyapatite or chitosan resulted in little anti-adherent effects, and with chitosan additionally in little antibacterial effects. Both agents failed to show any long-lasting effect, while rinsing with tannic acid (pH = 2.5) resulted in strong immediate and long-lasting effects. Except of a slightly lower antibacterial effect, the neutral solution of tannic acid was as effective as the acidic solution. Hydrochloric acid showed neither an antibacterial nor an anti-adherent effect on dental biofilm formation.

Conclusion: Experimental solutions containing tannic acid are promising anti-biofilm agents, irrespective of the pH value of the solutions. Hydroxyapatite and chitosan on the other hand were not able to prevent biofilm formation.

2 Einleitung

2.1 Literaturübersicht

2.1.1 Epidemiologie oraler Erkrankungen

Laut der Global Burden of Diseases Studie von 2015 haben orale Krankheitszustände nach wie vor eine hohe Prävalenz. 2015 war die unbehandelte Karies der bleibenden Dentition sogar weltweit die häufigste chronische Erkrankung. Sie betraf weltweit rund 2,5 Milliarden Menschen. Die Prävalenz von unbehandelter Karies in Milchzähnen, Parodontitis und Zahnverlust war ebenfalls hoch und betraf jeweils mehrere hundert Millionen Menschen [73]. Und obwohl die Karies selten lebensbedrohlich verläuft, ist die hohe Prävalenz zusammen mit den hohen Behandlungskosten eine finanzielle Belastung für die Krankenkassen [90]. Darüber hinaus kann sie zu Zahnverlust und anschließend zu kostenintensiver prothetischer Versorgung führen [101]. Die unbehandelte Karies kann bei Erwachsenen die Lebensqualität im Sinne von Zahnschmerzen oder erschwerter Nahrungsaufnahme negativ beeinflussen [8]. Bei Kindern kann sie zusätzlich zu verringerter Gewichtszunahme und zu Schlafstörungen führen [128].

2.1.2 Einführung in die Prävention

Die hohe Prävalenz suggeriert, dass präventive Maßnahmen nicht ausreichend durchgeführt werden. Während im letzten Jahrhundert invasive Eingriffe als Heilung für die Karies angesehen wurden, sind es heute zunehmend die präventiven Maßnahmen. Die Karies ist eine multifaktoriell bedingte Zerstörung der Zahnhartsubstanz. Sie beginnt mit einer bakteriellen Verschiebung im dentalen Biofilm, auch Plaque genannt, und wird von Faktoren wie Speichel, Zuckeraufnahme und Prävention beeinflusst. Der Krankheitsgrad reicht von subklinischen Veränderungen auf molekularer Ebene bis hin zu sichtbarer Kavitation [126]. Die entstehende Kavität kann zwar vom behandelnden Zahnarzt restauriert werden. Die Krankheit schreitet jedoch in der restlichen Mundhöhle weiter voran, da die Ursachen immer noch präsent sind [37]. Eine wichtige Bedingung für die Entstehung von Karies und einigen parodontalen Erkrankungen ist der Biofilm. Sowohl die Karieshäufigkeit als auch Zahnfleischentzündungen können durch die Entfernung des Biofilmes gesenkt werden [85]. Es stellt sich nun die Frage, was der Biofilm überhaupt ist, wie er entsteht und in der Folge Erkrankungen auslösen kann. Erst dann können präventive Maßnahmen nachvollzogen und entwickelt werden.

2.1.3 Biofilm

Der Biofilm ist eine komplexe Gemeinschaft verschiedener Bakterien, die in eine extrazelluläre Matrix eingebettet sind und über eine proteinreiche Schicht auf der Zahnoberfläche haften [91]. Das wird durch die besondere Eigenschaft dieser Oberfläche ermöglicht. Denn im Gegensatz zu anderen Oberflächen des menschlichen Körpers zeigt der Zahn keine Desquamation. Dadurch kann sich ein bakterieller Biofilm bilden. Dieses Phänomen wird beispielsweise auch bei Wasserleitungen und Kontaktlinsen beobachtet [53]. Die Bindung der Bakterien an den Zahn wird durch eine proteinreiche Schicht, die Pellikel, ermöglicht. Sie wird gebildet, indem Speichelproteine und Proteine bakterieller Natur wie Glycosyltransferasen elektrostatisch an der Zahnhartsubstanz haften [61]. Das ist möglich, da die Zahnhartsubstanz überwiegend aus der Calcium-Phosphat-Verbindung Hydroxylapatit (HAP) besteht [86]. Durch Umspülung des Zahnes mit dem Elektrolyten Speichel können Calcium- und Phosphat-Ionen aus dem HAP in Lösung gehen. Da sich tendenziell mehr Calcium-Ionen lösen, bildet sich eine positive Calciumschicht über der nun negativ geladenen Zahnoberfläche. An dieser Doppelschicht können dann Proteine elektrostatisch binden [61]. Für die Adsorption weiterer Proteine sind noch andere Wechselwirkungen verantwortlich, sodass sich innerhalb von drei Minuten durch Proteinanlagerungen eine bakterienarme proteinreiche Schicht entwickelt [19,51,53]. Die Pellikel selbst hat mehrere Funktionen. Sie bietet in gewissem Grade Schutz vor Erosion [59,60], also dem oberflächlichen Hartsubstanzverlust in Folge eines chemischen Prozesses, an dem keine Bakterien beteiligt sind [32]. Der abrasive Abtrag durch Zahnpasta wird ebenfalls reduziert [70]. Die in der Pellikel vorhandenen Carboanhydrasen können den pH-Wert aufrechterhalten [50]. Andere protektiven Proteine haben eine antibakterielle Wirkung [53]. Trotz der protektiven Eigenschaften der Pellikel vermittelt sie die Haftung von Bakterien an den Zahn. Bakterien aus der Mundhöhle können sich über schwache unspezifische Wechselwirkung, wie beispielsweise Van-der-Waals-Kräfte, elektrostatische Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen, an die Pellikel anlagern [19]. Diese werden anschließend durch stärkere spezifische Wechselwirkungen ergänzt. Dabei spielen bestimmte Polypeptide, die Adhäsine genannt werden, eine Rolle. Sie verteilen sich auf der Zelloberfläche und den Zellfortsätzen von Bakterien und ermöglichen die Bindung an eine Reihe von Molekülen in der Pellikel. Die Bakterien können auch untereinander und mit der extrazellulären Matrix eine Bindung eingehen [68]. Nach Anlagerung weiterer Bakterienspezies bildet sich so eine bakterielle Gemeinschaft. Die Bakterien sind zudem in eine extrazelluläre Matrix eingebettet, die zu 97% aus Wasser besteht [150]. Das Gerüst besteht aus Polysacchariden, die Bakterien selbst

aus Zucker mithilfe verschiedener Enzyme wie der Glycosyltransferase synthetisieren können. Sie können in Hungerphasen als Nahrungsquelle von Bakterien genutzt werden, indem sie die Polysaccharide wieder abbauen [2,133]. Die extrazelluläre Matrix ist nicht nur für die mechanische Stabilität des Biofilms verantwortlich, sondern ermöglicht auch durch vorhandene Wasserkanäle die Zirkulation von Nährstoffen und Abbauprodukten [76,143]. Das Leben in einem Biofilm bringt für die Bakterien viele Vorteile mit sich. Unter anderem erleichtert der enge interzelluläre Kontakt die Übertragung von Resistenzgenen gegenüber antibakteriellen Substanzen. Die extrazelluläre Matrix erschwert auch Diffusionsprozesse [66]. Dadurch ist der Biofilm im Gegensatz zu planktonischen Bakterien deutlich resistenter gegenüber antibakteriellen Substanzen [27,96,127]. Weiterhin wird das Überleben obligat anaerober Bakterien in der aeroben Mundhöhle ermöglicht, indem aerobe Bakterien lokal ein sauerstoffarmes Milieu erzeugen [14]. Zudem können Bakterienspezies Nährstoffe metabolisieren und sie für andere Spezies zur Verfügung stellen, die sie vorher nicht verdauen konnten [12]. Ein intakter Biofilm kann zwar einige parodontale Erkrankungen wie Zahnfleischentzündungen unterhalten, löst aber allein noch keine Karies aus [85].

2.1.4 Karies

Die Karies ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung und damit an spezielle Bedingungen geknüpft. Dazu gehören neben Bakterien noch Zähne, Zeit und Nährstoffe. Außerdem können Risikofaktoren die Erkrankung beeinflussen. Dabei spielen persönliche Faktoren wie Mundhygiene, Bildung, und sozialer Status, aber auch orale Milieufaktoren wie Speichel und antibakterielle Substanzen eine Rolle [126]. Nach der erweiterten ökologischen Karieshypothese ist die Karies Folge einer bakteriellen Verschiebung im Biofilm [135]. Schließlich sind Bakterien, die mit der Karies assoziiert sind, auch in der normalen dentalen Mikroflora vorhanden. Der Phänotyp entscheidet, ob die Bakterien kariogen sind oder nicht. Zwei wesentliche Eigenschaften sind dabei relevant. Kariogene Bakterien haben einerseits die Fähigkeit, Säuren zu produzieren (azidogen). Andererseits können sie einen niedrigen pH-Wert tolerieren (azidurisch). Durch Zufuhr von Zucker können Bakterien Säuren produzieren und den pH-Wert im Biofilm senken. Dies führt zwar zu einer Demineralisation der Zahnhartsubstanz. Der niedrige pH-Wert wird jedoch schnell durch den Speichel neutralisiert und die Zahnhartsubstanz wieder remineralisiert. Das Gleichgewicht aus De- und Remineralisation hält sich also die Waage. Sollte jedoch die Frequenz der Zuckerezufuhr steigen oder die Speichelsekretion für die Neutralisation nicht ausreichen, so fällt der pH-Wert weiter ab. In Folge kommt es zu einer bakteriellen Verschiebung und zu einer mehr azidogenen und dysbiotischen Mikroflora.

Dadurch wird auch das Gleichgewicht zugunsten der Demineralisation verschoben. Langfristig führen Störungen des Gleichgewichts zu Mineralverlust und Entwicklung einer Kavität [135]. Die Karies ist eine chronische Erkrankung, da sich eben genannte Vorgänge durchgehend im Biofilm abspielen. Deshalb sind eine lebenslange Therapie und vorrangig eine Prävention im Sinne einer rechtzeitigen Diagnose mit präventiven Eingriff erforderlich [126]. Nur so kann die Karies kontrolliert und die klinische Manifestation verhindert werden. Praktische Möglichkeiten sind beispielhaft das Zähneputzen, Zuckerreduktion und -ersatz sowie Speichelstimulation [79,135].

Das Zähneputzen kann Plaque reduzieren und wird unter den präventiven Maßnahmen am häufigsten genutzt. Allerdings variieren die Technik, Häufigkeit und Dauer. Die Aufrechterhaltung eines hohen Mundhygienestandards kann die Kapazitäten einer Person überschreiten. In der Interdentalhygiene gibt es zudem kein Mittel, das allen Situationen gerecht wird. Deshalb sind von zahnärztlicher Seite die Anweisung und Motivation wichtig. Für unmotivierte oder körperlich und geistig eingeschränkte Personen stehen Alternativen zur Verfügung [85]. Das Zähneputzen kann in solchen Fällen durch Mundspülungen ergänzt oder ersetzt werden [48].

2.1.5 Mundspülungen

Mundspülungen wurden früher schon genutzt, um etwa den Speichelfluss oder den Mundgeruch zu kontrollieren. Die verwendeten Stoffe waren eher ungewöhnlich. So wurde in Frankreich im 18. Jahrhundert frischer Urin als Mundspülung empfohlen [40]. Aber es kamen auch unbewusst antibakterielle Substanzen wie Kräuterextrakte zum Einsatz. Mundspülungen sind dem Zähneputzen in mancher Hinsicht überlegen. Sie erfordern weniger Compliance und Geschicklichkeit. Ihre Zusammensetzung ist nicht so komplex wie die einer Zahnpasta. Eine einfache wässrige Lösung würde ausreichen. Jedoch macht die Nachfrage nach gutem Geschmack und Aussehen zusätzliche Inhaltsstoffe notwendig. Für eine längere Haltbarkeit oder bessere Löslichkeit werden viele Substanzen derzeit in Ethylalkohol gelöst [83,129]. Schon seit mehreren Jahrzehnten ist Chlorhexidin (CHX) der Goldstandard für die Mundspülungen [77].

2.1.6 Chlorhexidin

CHX gehört zur Gruppe der Polybiguanide, die auf der Suche neuer Antimalaria-Mittel formuliert wurden. 1940 wurde CHX von den Imperial Chemical Industries in England entwickelt und 1954 als Antiseptikum vermarktet. Die Verwendung in der Zahnmedizin beschränk-

te sich zunächst auf die Chirurgie und Endodontie [83]. Erst 1970 wurde die entscheidende Studie über die Wirkung von CHX auf den Biofilm veröffentlicht. Es wurde gezeigt, dass eine Spülung mit 0,2%igem CHX die Biofilm-Bildung effektiv verhindern konnte [84]. Rølla *et Melsen* (1975) haben herausgefunden, dass positive Gruppen im CHX für die Bindung an negativ geladene Substanzen verantwortlich sind [117]. Dadurch ist CHX imstande, an die negativ geladene Oberfläche von Bakterien zu binden und in der Folge die Membranintegrität zu stören. Außerdem kann CHX nach Eindringen in die Zelle den bakteriellen Metabolismus stören, wie etwa den Zuckertransport, die Säureproduktion und die Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes. Dadurch kommt ein bakteriostatischer Effekt bei bereits niedrigen Konzentrationen zustande. Bei Einsatz höherer Konzentrationen wirkt CHX sogar bakterizid. Da CHX bei einer stärker gestörten Membranintegrität in die Zelle eindringen kann, bildet es dort mit zellulären Bestandteilen Phosphatkomplexe. Diese koagulieren und fallen aus [18,71,92].

Die Studie von Løe *et Rindom Schiott* (1970) basierte auf der Annahme, dass CHX durch Bekämpfung oraler Bakterien die Besiedlung der Zahnoberfläche verhindert [84]. In einer weiteren Studie war es deshalb überraschend, dass obwohl einige Bakterien die Spülung überlebt hatten, diese dennoch die Zahnoberfläche nicht besiedeln konnten [116]. Die antibakterielle Wirkung reicht allein nicht aus, um den Effekt auf die Biofilm-Bildung zu erklären. CHX kann nämlich noch mit anderen negativ geladenen Substanzen wechselwirken. Es kann unter anderem an negativ geladene Gruppen der Speichelproteine binden. Dadurch wird deren Anhaftung an die Zahnhartsubstanz verhindert und die Bildung der Pellikel gestört. Außerdem bindet CHX an extrazelluläre Polysaccharide in der Kapsel oder Glykokalyx von Bakterien. Damit wird die Anhaftung der Bakterien an den Zahn erschwert. CHX kann auch an Proteine in der bereits vorhandenen Pellikel oder an das Hart- und Weichgewebe binden [94]. Infolgedessen überdauert seine Wirkung die Spüldauer um bis zu 12 Stunden [112]. Diese Eigenschaft wird Substantivität genannt und wird von effektiven Mundspüllösungen gefordert [11]. Jenkins *et al.* (1988) haben die Langzeitwirkung von CHX wie folgt erklärt. Die Hemmung der Biofilm-Bildung ist Folge einer unmittelbar bakteriziden Wirkung und einer länger andauernden bakteriostatischen Wirkung, die sich aus der Bindung an die Pellikel ergibt [67]. Obwohl CHX in seiner Wirksamkeit gegen den Biofilm heraussticht und als Goldstandard bekannt ist, suchen Wissenschaftler nach Alternativen. CHX wird nämlich aufgrund verschiedener Nebenwirkungen, die v.a. bei Langzeitanwendung auftreten, nur für eine kurze Anwendungsdauer empfohlen. Die häufigste Nebenwirkung ist die extrinsische Zahnverfärbung, die

bereits nach wenigen Tagen der Anwendung auftreten kann. Es werden mehrere Ursachen diskutiert. CHX kann die Polymerisation von Kohlenwasserstoffen und Aminosäuren in der Pellikel zu farbigen Substanzen katalysieren. Es kann Disulfidbrücken von Proteinen spalten. Die entstehenden Thiol-Gruppen können danach mit Metallionen wie Eisen zu farbigen Produkten reagieren. Außerdem kann CHX mit Aldehyden und Ketonen unter Bildung unlöslicher farbiger Substanzen reagieren. Die extrinsischen Verfärbungen können aber mechanisch im Rahmen einer professionellen Zahnreinigung entfernt werden. Zu den weiteren Nebenwirkungen zählen temporäre Geschmacksirritationen, gelegentliches Mundbrennen, Schleimhauterosionen und vermehrte Zahnsteinbildung [41,94]. Im Zuge der vorliegenden Arbeit werden potentiell alternative Substanzen zu CHX untersucht, und zwar Tanninsäure, HAP und Chitosan.

2.1.7 Tanninsäure

Die Tanninsäure gehört zur Gruppe der Tannine. Bei den Tanninen handelt es sich um wasserlösliche Polyphenole mit einem Molekulargewicht (MW) zwischen 500 und 3000 Da, die typischerweise Alkaloide, Gelatine und andere Proteine ausfällen können [64]. Aufgrund dieser Eigenschaft haben sie als pflanzliche Gerbstoffe Verwendung gefunden. Sie sind in Pflanzen vorhanden und schützen diese vor Schädlingen und vor dem Zerfall. So haben Hölzer von Eichen oder Kastanienbäumen, die für ihre hohe Haltbarkeit bekannt sind, einen hohen Gehalt an Tanninen [120]. Weiterhin sind Tannine für ihre antimikrobielle Wirkung bekannt. Sie beruht u.a. auf der Fähigkeit mancher Tannine, mit Metallionen Chelatkomplexe bilden zu können. Diese Eigenschaft wurde erstmals im 1. Jahrhundert beschrieben. Damals hat Plinius der Jüngere Versuche mit Lösungen aus Galläpfeln durchgeführt. Sie sind für ihren hohen Gehalt an Tanninen bekannt. Plinius hat festgestellt, dass sich die Lösungen mit Eisensalzen schwarz färben. Da Metallionen wie Eisen essenziell für Mikroorganismen sind, kann der Entzug dieser Ionen mit Polyphenolen die biologische Aktivität von Mikroorganismen beeinträchtigen [22,64]. Pflanzen können sich durch diesen Mechanismus vor Pathogenen schützen [95]. Andererseits können sie durch ihre eiweißfällende bzw. adstringierende Wirkung viele mikrobielle Enzyme hemmen, darunter auch Glycosyltransferasen [120]. Da Bakterien unter anderem Glycosyltransferasen in der Pellikel als Rezeptor nutzen, können Tannine somit die Adhärenz von Bakterien verringern [146]. Darüber hinaus verändert Tanninsäure die Ultrastruktur der Pellikel und erhöht damit den Widerstand gegenüber Erosion und bakterieller Adhärenz [65,113]. Bei hohen Konzentrationen können Polyphenole mit Proteinen, Enzymen und Lipiden in der Zellmembran wechselwirken und die Membranpermeabilität verändern

[108]. Insgesamt könnten Polyphenole also vielfach in die Kariesätiologie eingreifen. Der Nachteil ist, dass Tanninsäure ebenfalls extrinsische Verfärbungen der Zähne auslöst [104]. Davon abgesehen sind Tannine auch von allgemeinmedizinischem Interesse. Sie sind starke Antioxidantien und können Radikale auffangen. Eine hohe Aufnahme soll mit einer Reduktion von Krankheiten wie Krebs, kardiovaskuläre Erkrankungen und neurodegenerativen Störungen einhergehen [23,108]. Die Tanninsäure ist ein allgemein als sicherer Lebensmittelzusatzstoff anerkannt (GRAS) [22]. Auf die Mundschleimhaut sind keine zytotoxischen Effekte bekannt. In der Dermatologie wird Tanninsäure zur lokalen Behandlung von Verbrennungen, Hautinfektionen und Ekzemen verwendet [1,87,98].

Es wurden bereits mehrere *in-situ*-Studien zur Wirkung polyphenolhaltiger Mittel auf die Biofilm-Bildung veröffentlicht. Hannig *et al.* (2008) haben Versuche mit einem Tee der Pflanze *Cistus incanus* vorgenommen, die reich an Polyphenolen ist. Die Probanden haben nach dem Einsetzen einer Schiene, die mit bovinen Schmelzprüfkörper bedeckt war, 10 min lang mit dem Tee gespült. Nach 2 h Tragedauer wurde eine Reduktion der Bakterienanzahl festgestellt, was auf eine antiadhärente Wirkung hinweist [52]. Die Spülung mit 200 ml schwarzem und grünem Tee, Rotwein, Traubensaft und Tee aus *Cistus incanus* hatte unter gleichen Versuchsbedingungen dieselbe Wirkung [54]. Polyphenolhaltige Öle wie Distelöl, Olivenöl und Leinöl konnten dagegen die Anzahl adhärenter Bakterien nicht reduzieren. Das lag vermutlich daran, dass Lipide die Bildung von Mizellen induzieren und damit die Wirkung der Polyphenole aufheben [56]. Wittpahl *et al.* (2015) haben auch Versuche mit Tee aus *Cistus incanus* durchgeführt. Zu Beginn wurde 10 min lang gespült und die Schiene diesmal nach 8 h aus der Mundhöhle entfernt. Selbst unter diesen Bedingungen war noch eine antiadhärente Wirkung nachweisbar [144]. Schött *et al.* (2017) sind mit Tee verschiedener Thymiane zu den gleichen Ergebnissen gekommen. Nach 8 h Tragedauer wurde eine Reduktion adhärenter Bakterien nachgewiesen. Das Verhältnis von lebenden zu toten Bakterien blieb jedoch unverändert [125]. Hertel *et al.* (2017) haben die Wirkung der Tanninsäure untersucht. Dieses Mal wurde nur eine Minute lang gespült. Nach 8-stündiger Tragedauer über Nacht konnte eine antiadhärente Wirkung gezeigt werden [65]. Laut den genannten Studien hemmen Polyphenole die Biofilm-Bildung, indem sie die Adhärenz von Bakterien verhindern. Die Spüldauer betrug dabei eine oder 10 min und die Tragedauer höchstens 8 h. Manche Versuche liefen nur über Nacht. Die Speichelsekretion ist nachts jedoch verringert und hat einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Biofilm-Bildung [78,124]. Außerdem fehlen in der Literatur *in-situ*-Studien, die die Wirkung auf den Biofilm bei mehrtägiger Anwendung kurz nach der Spülung unter-

sucht haben. Da die Spülung in der Regel zwei Mal täglich erfolgt, wie es von vielen Herstellern empfohlen wird, wäre es auch noch interessant zu wissen, ob die Wirkung einen halben Tag, also bis zur nächsten Spülung, anhält [105]. Diese Lücke wird mit dem vorliegenden Versuch, zumindest für die getesteten Substanzen, geschlossen.

Im vorliegenden Versuch wird eine 5%ige Tanninsäure-Lösung verwendet. Der pH-Wert beträgt $\text{pH} = 2,5$. Ein saures Milieu hat aber ungünstige Auswirkungen auf den Biofilm. Die häufige Aufnahme von Kohlenhydraten führt nämlich nicht direkt zu einer bakteriellen Verschiebung im Biofilm. Die Bakterien metabolisieren die Kohlenhydrate und bilden Säuren. Erst der sinkende pH-Wert führt durch Selektionsdruck zu einer relativen Zunahme kariogener Keime. Wenn der pH-Wert im Biofilm neutral gehalten wird, tritt trotz häufiger Zuckerzufuhr diese ökologische Veränderung nicht auf [13]. Des Weiteren können Bakterien, die in einem sauren Milieu gewachsen sind, niedrige pH-Werte besser tolerieren als solche, die unter neutralem pH-Wert gewachsen sind. Sie sind dann auch noch in der Lage, den pH-Wert stärker zu senken [134]. Deshalb kommt zusätzlich eine Tanninsäure-Lösung zum Einsatz, die auf $\text{pH} = 7$ titriert wurde. Einerseits könnte die Wirkung der Tanninsäure abhängig vom pH-Wert sein. Andererseits könnte der niedrige pH-Wert der Lösung selbst eine antibakterielle oder antiadhärente Wirkung haben. Um das zu überprüfen, wird zusätzlich eine Lösung aus Wasser angesetzt, die mit Salzsäure auf $\text{pH} = 2,5$ titriert wurde.

2.1.8 Hydroxylapatit

HAP wird in der Zahnmedizin schon seit über einem Jahrhundert verwendet. Bereits im 19. Jahrhundert hatte Cravens (1876) vorgeschlagen, die freiliegende Pulpa mit zahnähnlichen Materialien zu behandeln [24]. Zunächst zur Überkappung oder als Knochenersatzmaterial eingesetzt, fand HAP auch in der Behandlung früher Kariesläsionen Verwendung [31]. Die Theorie ist, dass eine hohe Konzentration an Calcium und Phosphat im Biofilm das Gleichgewicht zugunsten der Remineralisation verschiebt [81]. Jedoch kann eine einfache Spülung mit einer Calcium-Phosphat-Lösung die Konzentration im Biofilm nicht erhöhen. Dafür sind stabile Verbindungen nötig [115]. *In-vitro* können beispielsweise Nanopartikel aus HAP den Schmelz remineralisieren [69]. Insbesondere HAP, das auf die Größe von natürlichen Schmelzkristallen reduziert wurde, passt optimal in die Defekte von erosiv geschädigtem Schmelz [80]. Viele Studien beschäftigen sich deshalb mit der Eigenschaft von HAP, die Zahnhartsubstanz zu remineralisieren. Jedoch kann HAP auch über andere Mechanismen in die Kariesätiologie eingreifen [75]. Schon bevor HAP in Mundhygieneprodukten zum Einsatz kam, könnte es für eine niedrige Kariesinzidenz verantwortlich gewesen sein. In der Mensch-

heitsgeschichte kam es trotz Sesshaftigkeit und Ernährungswandel von Proteinen auf Kohlenhydrate kaum zu einem Kariesanstieg. Erst durch Abnahme abrasiver Nahrungsmittel konnte ein Kariesanstieg beobachtet werden. Das könnte daran liegen, dass beim Zahnabrieb durch abrasive Nahrungsmittel Nanopartikel aus HAP entstanden, die kariespräventiv gewirkt haben könnten. In der modernen Kost mangelt es an solchen Nahrungsbestandteilen. Das könnte die Erhöhung der Kariesinzidenz im Laufe der Menschheitsgeschichte erklären [55]. Weiterhin wirkt HAP antiadhärent. Nach dem gleichen Prinzip, wie Bakterien die Zahnhartsubstanz besiedeln, interagieren sie mit Partikeln aus HAP. Sie können nicht nur größere Partikel besiedeln, sondern auch selbst von kleineren Partikeln bedeckt werden [138]. Durch Anlagerung solcher kleinen Partikel und möglicher Wechselwirkung mit den Adhäsinen kann die Bindung der Bakterien an den Zahn verhindert werden. Dafür ist es von Vorteil, wenn die Partikel kleiner sind als die Bakterien selbst [62]. HAP hat jedoch keine antibakterielle Wirkung [75]. Die Kombination aus guter antiadhärenter und fehlender antibakterieller Wirkung ist nicht unbedingt schlecht. Schon Crowley *et* Rickert (1937) haben 1937 suggeriert, dass die Bekämpfung oraler Bakterien auch den Widerstand gegenüber Pathogenen verringern könnte [25]. Die residente Mikroflora übernimmt nämlich auch einen wichtigen Teil für unsere Gesundheit. Sie verhindert die Kolonisation exogener oder pathogener Keime, indem sie Nährstoffe und Lebensraum für sich beansprucht. Außerdem bildet sie Hemmstoffe oder schafft ein ungünstiges Milieu für entsprechende Keime [89]. Die Entfernung der residenten Flora kann zur oralen Dysbiose führen und beispielsweise eine Pilzinfektion auslösen. Deshalb ist es von Vorteil, den Biofilm zu kontrollieren, ohne die restlichen oralen Bakterien zu eliminieren [92]. Ein Nachteil bei der Verwendung von Calcium-Phosphat-Verbindungen könnte sein, dass sie die Bildung von Zahnstein fördern [114]. Im Gegensatz zu CHX und Tanninsäure ruft HAP jedoch keine extrinsischen Zahnverfärbungen hervor. Ganz im Gegenteil, es wird Zahnpasten sogar zugesetzt, um die Zähne aufzuhellen [103].

Bisher gibt es wenige *in-situ*-Studien (Stand 2020), welche die antiadhärente oder antibakterielle Wirkung von HAP untersucht haben. Hannig *et al.* (2013) haben *in-situ*-Versuche mit Zink-Carbonat-HAP durchgeführt. Es wurden wieder Schienen, die mit bovinen Schmelzprüfkörper bedeckt waren, verwendet. Eine Minute nach dem Einsetzen wurde für 1 min mit 8 ml einer Lösung gespült und die Schiene nach 6 oder 12 h entnommen. Es war eine antiadhärente und antibakterielle Wirkung nachweisbar, wobei der antibakterielle Effekt von Zink ausgehen könnte [57]. Kensche *et al.* (2017) dagegen haben reines HAP verwendet. Die Probanden haben mit 8 ml einer 5%igen Suspension 1 min nach dem Einsetzen der

Schiene für 1 min gespült. Die Schiene wurde über Nacht für 8 h getragen. Das HAP zeigte eine genauso gute antiadhärente Wirkung wie CHX, aber keine antibakterielle Wirkung. In rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen waren Partikel und Klumpen von HAP im niedrigen Mikrometerbereich und darunter zu sehen [75]. *In-vivo*-Studien bestätigen die klinische Wirkung gegen Karies [72].

2.1.9 Chitosan

Im Zuge von Untersuchungen an Pilzen wurde im Jahre 1811 die Substanz Chitin zum ersten Mal extrahiert [10]. 1832 wurde sie dann auch in Insekten gefunden. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von Chitin wurden verschiedene Modifikationen vorgenommen, bei denen 1859 das besser lösliche Chitosan entstand [107]. Erst 1930 wurde mit den Gliederfüßern eine weitere große Quelle gefunden [110]. Chitin ist nach Zellulose das zweithäufigste vorkommende Polymer. Es ist Zellulose in vielerlei Hinsicht ähnlich [26]. Es ist ebenfalls ein Polysaccharid, schlecht löslich, reaktionsträge und basisch. Im Gegensatz zu vielen synthetischen Polymeren sind die natürlichen Polymere biokompatibel und biologisch abbaubar. Da Chitin in wässrigen und gesundheitlich unbedenklichen organischen Lösungen schlecht löslich ist, muss es chemisch verändert werden [111]. Und zwar wird das Polymer, bestehend aus N-Acetyl-Glucosamin, deacetyliert. Ab einem Deacetylierungsgrad (DD) von 50% wird von Chitosan gesprochen. Es enthält nun mehr Glucosamin-Einheiten und ist in sauren wässrigen Lösungen löslich [142]. Das liegt daran, dass die Aminogruppen der Glucosamin-Einheiten bei niedrigen pH-Wert protoniert vorliegen. Dadurch ist Chitosan positiv geladen und wasserlöslich. Der pH-Wert, ab dem Chitosan anfängt in Lösung zu gehen, ist abhängig vom DD und vom MW. Diese Werte beeinflussen neben der Löslichkeit die Biokompatibilität, Viskosität, antibakterielle Wirkung und viele weitere Eigenschaften von Chitosan [26]. Die Verwendung saurer Lösungen kann durch weitere chemische Modifikationen am Chitosan umgangen werden [147]. Der Einsatz von Chitosan ist vielfältig und erstreckt sich auf viele Bereiche der Medizin und darüber hinaus. So wird Chitosan als Naht- und Verbandmaterial, als Träger für Arzneistoffe oder in der Landwirtschaft und in Kläranlagen verwendet, nur um ein paar Beispiele zu nennen [111]. Chitosan gilt als nicht toxisch und wurde sogar kürzlich zur Behandlung der oralen Mukositis verwendet [33,74]. Die für die vorliegende Arbeit interessante antibakterielle Wirkung ist auf die Ladung der Aminogruppen zurückzuführen. *In-vitro*-Versuche an *E. coli* haben nämlich gezeigt, dass die antibakterielle Wirkung mit der Anzahl positiv geladener Aminogruppen zunimmt. Sie sind bei einem höheren DD und MW häufiger vorhanden. Es wird angenommen, dass die positiven Gruppen an die negativ geladene Oberfläche

von Bakterien binden und sie damit schädigen. Folglich könnte die Membranintegrität oder der Membrantransport gestört oder Metall-Ionen chelatisiert werden [38,118]. Chitosan könnte auch eine schützende organische Schicht auf der negativ geladenen Zahnhartsubstanz bilden und so vor Erosion und Abrasion schützen [42,43,122]. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen einer *in-situ*-Studie zeigen jedoch, dass eine saure Lösung aus Chitosan den Schmelz auch demineralisieren kann [113]. Des Weiteren ist es möglich, dass Chitosan über die Agglutination von Bakterien das Wachstum hemmt. Niedermolekulares Chitosan kann sogar die Zellmembran penetrieren und mit der DNA wechselwirken [28]. Die Behandlung der Pellikel mit Chitosan kann die bakterielle Adhärenz verringern [20,137]. Klinisch kann eine mehrwöchige Applikation von Chitosan den Plaque-Index und die Bakterienanzahl im Speichel senken [97,119]. Wie bereits erwähnt, können sich Bakterien an einen niedrigen pH-Wert anpassen und in Folge Säureschübe besser tolerieren [134]. Die Verwendung von Nanopartikeln aus Chitosan kann diese Anpassung verhindern, sodass Bakterien stattdessen bei einem Säureschub untergehen [99].

Zahlreiche Studien bestätigen die antibakterielle Wirkung von Chitosan. Davon beschäftigen sich einige explizit mit der präventiven Zahnmedizin. Jedoch handelt es sich bei vielen um *in-vitro*-Studien und manchmal werden keine Angaben über MW und DD gemacht. Pasquantonio *et al.* (2008) haben *in-vivo*-Versuche mit einem wasserlöslichen Chitosan-Derivat in einer 1%igen Lösung durchgeführt. Es hatte ein MW von 3000 bis 5000 Da und ein DD von 75%. Eine zweimalige tägliche Spülung über 4 Tage konnte die Vitalität in der dentalen Plaque reduzieren [106]. Eine ähnliche Studie kam zu dem gleichen Ergebnis und konnte zudem *in-vivo* die dentale Plaque reduzieren [4]. Del Carpio-Perochena *et al.* (2015) dagegen haben die Wirkung von Nanopartikeln aus Chitosan untersucht. Eine vorausgehende Behandlung bovinen Wurzeldentins konnte bei der anschließenden intraoralen Biofilm-Bildung die Anzahl adhärenter Bakterien sowie die Vitalität senken [30]. Es fehlen Daten zur Verwendung vom eigentlichen Chitosan als Mundspüllösung in der Mundhöhle. Es werden nämlich oft Derivate oder verschiedene Verarbeitungen und Applikationsformen gewählt. Deshalb wird im vorliegenden Versuch Chitosan einfach in einer sauren wässrigen Lösung gelöst und die antibakterielle und antiadhärente Wirkung *in-situ* untersucht.

2.2 Ziel der Arbeit / Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden *in-situ*-Studie ist die Untersuchung der antibakteriellen und antiadhären Wirkung von experimentellen Mundspüllösungen auf der Basis von Tanninsäure,

HAP oder Chitosan. Es soll folgende Frage geklärt werden: Unterscheiden sich diese Substanzen in ihrer Wirkung von der Negativkontrolle Wasser und können sie eine ähnlich hohe Wirkung wie die Positivkontrolle CHX im Hinblick auf die Reduktion der Biofilm-Bildung zeigen? Die Nullhypothese lautet, dass sich die experimentellen Mundspüllösungen in ihren antibakteriellen und antiadhärenteren Wirkungen nicht von Wasser unterscheiden.

Um zu untersuchen, inwieweit der pH-Wert der Tanninsäure-Lösung eine Rolle spielt, wird zusätzlich eine neutrale Tanninsäure-Lösung sowie eine Salzsäure-Lösung als Mundspüllösung angesetzt.

Während einer zweitägigen Biofilm-Bildung auf bovinen Schmelz-Prüfkörpern spülen die Probanden 4 oder 5 Mal mit den verschiedenen experimentellen Lösungen. Durch die Verwendung zweier Spülprotokolle wird die sofortige und langanhaltende Wirkung geprüft. Die Wirkungen werden unter Verwendung der Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie bewertet.

3 Material und Methode

3.1 Probanden

An der Studie nahmen 6 Probanden ($n = 6$) im Alter von 24 bis 30 Jahren teil. Die Probanden waren Zahnmedizinstudenten. Sie alle hatten ein kariesfreies Gebiss und waren parodontal gesund. In den letzten 6 Monaten hatten sie keine Antibiotika eingenommen und standen weder unter Dauermedikation noch litten sie an Erkrankungen der Speicheldrüsen oder der Mundschleimhaut. Außerdem waren sie Nichtraucher. Die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigte das Versuchsprotokoll (Kennnummer 238/03, 2016). Im Anhang sind zu den folgenden aufgeführten Materialien die Bezugsquellen angegeben.

3.2 Prüfkörper

Die Oberkiefer der Probanden wurde mit Alginat abgeformt und die Modelle aus Gips gegossen. Darauf wurden Tiefziehschienen mit dem Tiefziehgerät angefertigt. Sie waren auf die Zahnreihen vom 1. Prämolaren bis zum 2. Molaren beidseits zugeschnitten. Die Prüfkörper (PK) wurden aus unteren Frontzähnen der 2. Dentition von Rindern des Zweibrücker Schlachthofs hergestellt. Mithilfe einer Trennschleifmaschine wurden aus den Labialflächen mehrere rechteckige Rohlinge gefertigt. Darauf folgend wurden sie mit Schleifpapier bei niedriger Körnung an der Schleifmaschine nass geschliffen. Dabei wurde eine rechteckige Form mit einer Mindestschichtdicke für die Retention im Silikon von 1,5 mm und einer Kantenlänge von jeweils 5 mm erstellt. Die Schmelzschicht wurde gegenüber der ausgedünnten Dentinbasis dicker gestaltet. Das Dentin stabilisiert den spröden Schmelz und dient der Orientierung. Die Flächen waren rechtwinkelig und die Schmelz- und Dentinflächen parallel zueinander. Dies vereinfacht das Greifen mit der Pinzette. Letztlich wurde der Schmelz mit Schleifpapier in aufsteigender Körnung bis zu P2500 poliert. Die fertigen PK besitzen eine oberflächliche Schmierschicht, die durch Eintauchen in 3%iger NaOCl-Lösung für 3 min auf dem Wipp-Tisch entfernt wurde. Danach wurden die PK unter fließendem vollentsalztem Wasser abgespült und im Ultraschallgerät in vollentsalztem Wasser für 5 min gereinigt. Die anschließende Desinfektion erfolgte für 15 min in 70%igem Isopropylalkohol auf dem Wipp-Tisch. Letztlich wurden die PK 3-mal mit sterilem Wasser gespült und im sterilen Wasser bei 4°C für mind. 6 h rehydriert [54]. Auf Vorrat hergestellte PK, Zähne und Zwischenstufen wurden in 0,1%iger Thymol-Lösung gelagert. Sie wurden jedoch vor dem Einsatz nochmal mit Schleifpapier der Körnung P2500 poliert, bevor sie wieder vorbereitet wurden. Jeweils zwei PK

wurden mit Silikon auf die bukkale Seite der beiden Schienen befestigt, in die zuvor Retentionslöcher für das Silikon gebohrt wurden. Alle Flächen mit Ausnahme der bukkalen Schmelzfläche waren von Silikon bedeckt. Die rechte Schiene trug den PK Nr. 1 auf Höhe des 1. Prämolaren und Nr. 2 auf Höhe des 2. Molaren. Auf der linken Schiene befand sich der PK Nr. 3 auf Höhe des 2. Prämolaren und Nr. 4 auf Höhe des 1. Molaren (Abb. 1).

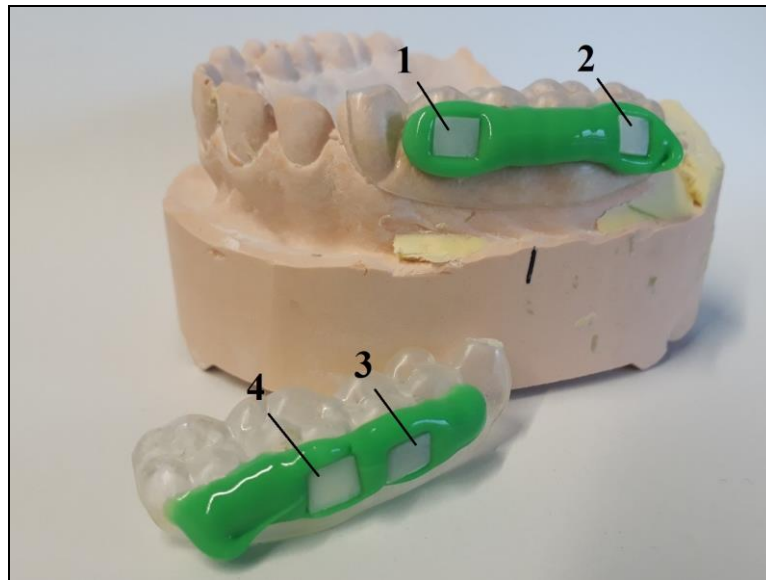


Abb. 1: Die Prüfkörper sind mit Silikon auf der Schiene befestigt. Die Nummern kennzeichnen verschiedene Positionen der Prüfkörper. Modifiziert und entnommen aus [121].

3.3 Prüfsubstanzen

Wasser und CHX lagen als verbrauchsfertige Substanzen vor. Die experimentellen Spüllösungen mit Tannin- und Salzsäure sowie HAP wurden jeweils frisch vor dem Versuch angesetzt. Ausschließlich die Chitosan-Lösung wurde im Voraus für mehrere Versuche hergestellt. Die Prüfsubstanzen sind in [Tabelle 1](#) aufgelistet. Zum Ansetzen der Salzsäure-Lösung wurde steriles Wasser mit 1 M Salzsäure bis $\text{pH} = 2,5$ titriert. Für die Tanninsäure-Lösung wurde eine hochmolekulare Tanninsäure verwendet. Sie wird aus Galläpfeln der Eiche *Quercus infectoria* gewonnen. Die Lagerung soll bei Raumtemperatur (RT) erfolgen. Für eine 5%ige Lösung wurden 5 g abgewogen und mit sterilem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung hatte einen pH-Wert von $\text{pH} = 2,5$. Das nächste Spülmittel mit Tanninsäure wurde wie eben beschrieben angesetzt. Jedoch wurde mit ca. 1,5 ml 20%iger Natronlauge bis $\text{pH} = 7$ titriert. Dabei wurde die Konzentration kaum verändert. HAP lag als Pulver vor und ergab mit Wasser eine Suspension. Laut Hersteller handelt es sich um reines HAP, dessen Partikelgröße im Nanometerbereich liegt. Die Haltbarkeit beträgt bei kühler und trockener Lagerung 12 Monate. Um eine Suspension mit entsprechender Konzentration zu erhalten, wurden 5 g HAP ab-

gewogen und bis 100 ml mit sterilem Wasser aufgefüllt. Vor dem Spülen wurde die Suspension solange geschüttelt, bis sich HAP homogen in Wasser verteilte. Das im vorliegenden Versuch verwendete Chitosan hat ein DD von $\geq 92,6\%$ und ein MW von 300–700 kDa. Es ist bei kühler und trockener Lagerung 36 Monate haltbar. Das Chitosan liegt als Feststoff vor und muss zunächst gelöst werden. Dafür wurden 5 g Chitosan in einem 1000 ml Gefäß abgewogen. Anschließend wurden 3,5 ml 100%ige Essigsäure hinzugefügt und mit sterilem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Nach mehreren Stunden Rühren geht das Chitosan in Lösung. Die fertige Lösung kann bei 4°C bis zu 3 Monaten gelagert werden.

Tabelle 1: Auflistung der Prüfsubstanzen mit den verwendeten Konzentrationen. Bei den Tannin- und Salzsäure-Lösungen ist zusätzlich der pH-Wert angegeben. Hersteller sind im Anhang angegeben.

Prüfsubstanz	Gehaltsangabe
Steriles Wasser	
Salzsäure	Lösung, pH = 2,5
Tanninsäure	5%ige Lösung, 50 [g/l], pH = 2,5
Tanninsäure	5%ige Lösung, 50 [g/l], pH = 7
Hydroxylapatit	5%ige Suspension, 50 [g/l]
Chitosan	0,5%ige Lösung, 5 [g/l]
Chlorhexidin	0,2%ige Lösung

3.4 Versuchsablauf

Der Versuch bestand aus mehreren Runden, wobei für jede Runde neue Prüfkörper an den Schienen befestigt wurden. Jeder Proband durchlief alle Runden (Abb. 2). Die Auswaschphase zwischen den einzelnen Runden betrug mindestens 1 d, damit sich die Effekte der Spüllösungen nicht überlagerten. In jeder Runde wurden die Schienen 48 h lang intraoral getragen und es wurde nur eine Testsubstanz je nach Spülprotokoll vier- oder fünfmal appliziert. Es wurden zwei Spülprotokolle verwendet, so dass es zwei Läufe pro Testsubstanz gab. Im Spülprotokoll 1 erfolgte die Spülung mit 10 ml der jeweiligen Testsubstanz für 30 sec nach 3 min, 12 h, 24 h, 36 h und 47,5 h nach Einsetzen der Schienen. Im Spülprotokoll 2 wurde die Applikation nur nach 3 min, 12 h, 24 h und 36 h durchgeführt. Die Probanden verzichteten

2 h vor dem Versuch auf Essen und Trinken. Während der gesamten Tragedauer wurden die Zähne weder mit Zahnpasta noch mit anderen Mundspüllösungen behandelt. Die Mundhygiene erfolgte nach temporärer Herausnahme der Schienen nur mit Wasser und Zahnbürste. Mit Ausnahme beim Wassertrinken wurden beim Essen und Trinken die Schienen vorübergehend in einem feuchten Milieu gelagert. Nach einer Tragedauer von 48 h wurden die Schienen aus der Mundhöhle entfernt. Die PK wurden aus dem Silikon gezogen, ohne die zu untersuchende Fläche zu verletzen. Anschließend wurden überschüssiger Speichel und nicht adhärente Zellen vorsichtig mit bidestilliertem Wasser mittels einer Druckflasche abgestrahlt.

Steriles Wasser Spülprotokoll 1	Steriles Wasser Spülprotokoll 2
Salzsäure Spülprotokoll 1	Salzsäure Spülprotokoll 2
Tanninsäure (pH = 2,5) Spülprotokoll 1	Tanninsäure (pH = 2,5) Spülprotokoll 2
Tanninsäure (pH = 7) Spülprotokoll 1	Tanninsäure (pH = 7) Spülprotokoll 2
Chitosan Spülprotokoll 1	Chitosan Spülprotokoll 2
Chlorhexidin Spülprotokoll 1	Chlorhexidin Spülprotokoll 2

Abb. 2: 6 Mundspüllungen und 2 Spülprotokolle ergeben insgesamt 12 Runden, die jeder Proband durchläuft. Modifiziert und entnommen aus [121].

3.5 LIVE/DEAD® *BacLight*™

Der Biofilm der PK Nr. 1 und Nr. 4 wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop (FM) untersucht. Dafür wurden die Bakterien mit dem LIVE/DEAD® *BacLight*™ Bacterial Viability Kit L7012 gefärbt. Das Kit enthält die zwei Farbstoffe SYTO 9 und Propidiumiodid sowie ein *BacLight* mounting oil. Die Farbstoffe unterscheiden sich in ihren spektralen Eigenschaften

und in ihrer Fähigkeit, Bakterien zu durchdringen. SYTO 9 (3,34 mM, 300 µl Lösung in Dimethylsulfoxid) ist ein grün fluoreszierender Farbstoff zum Nachweis von Nukleinsäure. Er durchdringt Bakterien sowohl mit intakter als auch geschädigter Membran. Propidiumiodid (20 mM, 300 µl Lösung in Dimethylsulfoxid) ist ein rot fluoreszierender Farbstoff, der ebenfalls vorhandene Nukleinsäure nachweist. Jedoch durchdringt er nur Bakterien mit einer geschädigten Membran. Wenn beide Farbstoffe in der Zelle präsent sind, verdrängt Propidiumiodid den Farbstoff SYTO 9. Dadurch fluoreszieren lebende Bakterien mit intakter Membran grün und tote Bakterien mit geschädigter Membran rot. Die beiden Stammlösungen können lichtgeschützt bei unter -20°C bis zu einem Jahr gelagert werden. Das *BacLight* mounting oil hingegen ist bei RT unbegrenzt haltbar. Es wurden jeweils 1 µl der beiden Farbstoffe in 1000 µl 0,9%ige NaCl Lösung pipettiert und unter Einsatz eines Vortexgerät vermischt. Die angesetzte Farblösung kann in einem lichtundurchlässigen Reaktionsgefäß bei 4°C für einen Monat gelagert werden. Nachdem die PK aus der Schiene entfernt und abgespült wurden, wurden sie in einer Feuchtkammer gelagert. Die Feuchtkammer wurde vorbereitet, indem in die Näpfchen einer Well-Platte ein fuselfreies Tuch gelegt und mit bidestilliertem Wasser befeuchtet wurde. Der zu untersuchende PK wurde aus der Feuchtkammer entfernt und die bukkale Schmelzoberfläche vorsichtig mit fusselfreien Tüchern trocken getupft. Im Anschluss wurde der PK mit 15 µl der Farblösung bedeckt. Die Inkubation erfolgte unter Lichtschutz für 10 min. Als Nächstes wurde der PK in einer 0,9%igen NaCl-Lösung geschwenkt und von restlicher Farblösung befreit. Das erfolgte nacheinander in drei Näpfchen, die frisch mit NaCl-Lösung gefüllt worden sind. Nach vorsichtiger Trocknung mit einem fusselfreien Tuch wurde der PK in einer Kugel aus Putty-Material befestigt und auf den Objektträger platziert. Der Schmelz wurde parallel zur Tischebene ausgerichtet, um die gesamte Oberfläche bei gleichem Fokus mikroskopieren zu können. Außerdem wurde der PK soweit in das Putty-Material gedrückt, bis das Deckglas die Schmelzoberfläche nicht mehr berühren konnte. Darauf folgend wurde die Schmelzoberfläche mit Mounting-Öl benetzt und mit einem Deckglas bedeckt. Schließlich erfolgte die Untersuchung mit dem Fluoreszenzmikroskop (FM). Mit einem Fluoresceindiacetat-Filter wurde Licht der Wellenlänge 480 nm erzeugt. Damit wird der Farbstoff SYTO 9 angeregt, welcher grünes Licht mit einer Wellenlänge von 500 nm emittiert. Der Farbstoff Propidiumiodid wird bei einer Wellenlänge von 490 nm angeregt. Hierfür kam ein Ethidiumbromid-Filter zum Einsatz. Propidiumiodid emittiert dann rotes Licht mit einer Wellenlänge von 635 nm. Da die Farbstoffe bei verschiedenen Wellenlängen angeregt werden, erfolgte die Aufnahme grün und rot fluoreszierender Bakterien nacheinander. Die Aufnahmen lagen zunächst in Grau vor und wurden hinterher in ein farbiges Bild zusammengela-

gert. Die Bilder wurden bei 1000facher Vergrößerung mit der Kamera aufgenommen. Jeder PK wurde in sechs Felder aufgeteilt, in denen jeweils ein Bild angefertigt wurde. So entstanden 6 repräsentative Bilder pro PK. Währenddessen wurde der nächste PK in Farblösung inkubiert und sogleich untersucht. Sowohl Flüssig- als auch Feststoffabfälle, welche mit der Farblösung kontaminiert waren, wurden separat entsorgt.

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software ImageJ. Die Bilder wurden vorher verschlüsselt. Dadurch konnte die untersuchende Person die Bilder keiner der verwendeten Spürlösung zuordnen. Die Auswertung erfolgte nur durch eine Person. Es wurden sowohl Bedeckung und Vitalität erfasst. Zur Bestimmung der Bedeckung wurden die Bakterien der farbigen Bilder manuell mithilfe der Software ausgewählt. Sie berechnet die Anzahl Pixel der ausgewählten Fläche. Die Bedeckung ist dann der Flächenanteil der Bakterien von der Gesamtfläche des Bildes. Zur Bestimmung der Vitalität wurden die Bakterien beider grauen Bilder separat ausgewählt und ausgewertet. Von den ausgewählten Flächen wurden die Anzahl und Helligkeit der Pixel bestimmt. Damit lagen zwei Messwerte sowohl für die sonst grün und rot fluoreszierenden Bakterien vor. Die Vitalität wurde ermittelt, indem das Ergebnis der grünen Bakterien durch die Summe aus grünen und roten Bakterien geteilt wurde. Bedeckung und Vitalität werden in Prozent angegeben.

3.6 Rasterelektronenmikroskopie

Der Biofilm der PK Nr. 2 und Nr. 3 wurde im Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht, um die Morphologie zu beurteilen und die fluoreszenzmikroskopische Auswertung zu verifizieren. Dazu müssen die PK fixiert, entwässert und getrocknet werden (Tabelle 2). Jenes wurde in Wellplatten durchgeführt. Die Fixierung erfolgte in einer aus Glutaraldehyd und Cacodylat-Puffer bestehenden Fixierlösung. Für den Cacodylat-Puffer wurde 21,4 g Cacodylat in 250 ml bidestilliertem Wasser gelöst und mit 0,1 N HCl auf ein pH-Wert von pH = 7,4-7,6 eingestellt. Das Konzentrat wurde mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt, um ein 0,1 M Cacodylat-Puffer zu erhalten. Von der 50%igen Glutaraldehyd-Lösung wurden 4 ml abgemessen und auf 100 ml mit dem Cacodylat-Puffer aufgefüllt. Diese Fixierlösung war bei 4°C 3 Monate haltbar. Die PK wurden in 1 ml Fixierlösung für min. 1 h bei 4°C fixiert. Dadurch wird die Struktur der Mikroorganismen konserviert und für die weitere Untersuchung zur Verfügung gestellt. Anschließend wurden die PK mit 0,1 M Cacodylat-Puffer gewaschen. Darauffolgend wurden sie in frische Näpfchen gelegt und in einer Alkoholreihe entwässert. Andernfalls würde sich vorhandenes Wasser im REM unter Vakuum verflüchtigen.

gen und Artefakte verursachen. Schließlich wurde der Biofilm durch Eintauchen in Hexamethyldisilazan chemisch getrocknet. Letztlich erfolgte die Lufttrocknung in leeren Näpfchen im Abzug über Nacht [6]. Das Ethanol verdampfte, die restlichen Lösungen wurden im halogenfreien Abfall entsorgt.

Tabelle 2: Vorbereitung der Proben für die Rasterelektronenmikroskopie

RF	Arbeitsschritt	Chemikalien, Anwendung
1	Fixierung	1 ml Fixierlösung (2% Glutaraldehyd, 0,1 M Cacodylat-Puffer) für mindestens 1 h bei 4°C
2	Waschung	Cacodylat-Puffer, 5-mal für 10 min, bei RT, unter Abzug
3	Entwässerung	Alkoholreihe, bei RT, unter Abzug <ul style="list-style-type: none"> • 2-mal für 5 min in 50%igem vergällten Ethanol • 5 min in 70%igem vergällten Ethanol • 5 min in 80%igem vergällten Ethanol • 5 min in 90%igem vergällten Ethanol • 2-mal für 10 min in 100%igem nicht vergällten Ethanol
4	Trocknung	1 ml Hexamethyldisilazan für 30 min, bei RT, unter Abzug
5	Lufttrocknung	über Nacht, bei RT, unter Abzug

Nach der Entnahme der Schienen werden die PK Nr. 2 und Nr. 3 für das REM vorbereitet. Dazu werden sie fixiert, gewaschen, entwässert und getrocknet. Anschließend können sie gesputtert und im REM untersucht werden. RF = Reihenfolge, RT = Raumtemperatur.

Biologische Proben haben nichtleitende Eigenschaften und benötigen aus diesem Grund eine leitfähige Beschichtung. Daher wurden die PK mithilfe einer leitfähigen Klebefolie auf Probenträger aus Aluminium befestigt und im Gerät zum Sputtern mit Kohlenstoff beschichtet (Bergmans et al., 2005). Mit einem REM (XL 30 ESEM FEG, FEI Company, Eindhoven, Niederlande) wurden nun repräsentative Bilder der PK in bis zu 20000-facher Vergrößerung aufgenommen.

3.7 Statistik

Die Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung geprüft. Sie waren trotz Transformation oder Eliminierung von Ausreißern nicht normalverteilt. Deshalb wurden nicht-parametrische Tests durchgeführt. Der Unterschied der Spülmittel zu Wasser wurde mit dem Friedmann-Test (one-tailed, $p = 0,05$) ermittelt. Mit dem Wilcoxon-Test (one-tailed,

$p = 0,05$) wurden die Unterschiede zwischen den beiden Spülprotokollen untersucht. Die statistische Analyse erfolgte mit der Software GraphPad Prism 8.

4 Ergebnisse

4.1 LIVE/DEAD® BacLight™ - Bedeckung

Im Spülprotokoll 1 wiesen die Prüfkörper nach der Spülung mit Wasser oder Salzsäure-Lösung eine Biofilm-Bedeckung von 47-55% auf (Abb. 3). Die Spülung mit HAP oder Chitosan reduzierte die Bedeckung auf 31-36%, während die Spülung mit Tanninsäure (pH = 2,5), Tanninsäure (pH = 7) oder CHX die Biofilm-Bedeckung auf 2-11% signifikant ($p < 0,05$) reduzierte. Im Spülprotokoll 2 betrug die Bedeckung der Prüfkörper nach der Applikation von Wasser, der Salzsäure-Lösung, HAP oder Chitosan 50-66%. Für beide Tanninsäure-Lösungen oder CHX befand sie sich bei 3-26%. Im Spülprotokoll 2 konnte nur CHX die Biofilm-Bedeckung signifikant ($p < 0,05$) reduzieren. Die Unterschiede zwischen den Spülprotokollen waren nicht signifikant. Die Standardabweichung ist bis zu $\pm 33%$ hoch. Repräsentative Aufnahmen sind in Abb. 4 gezeigt.

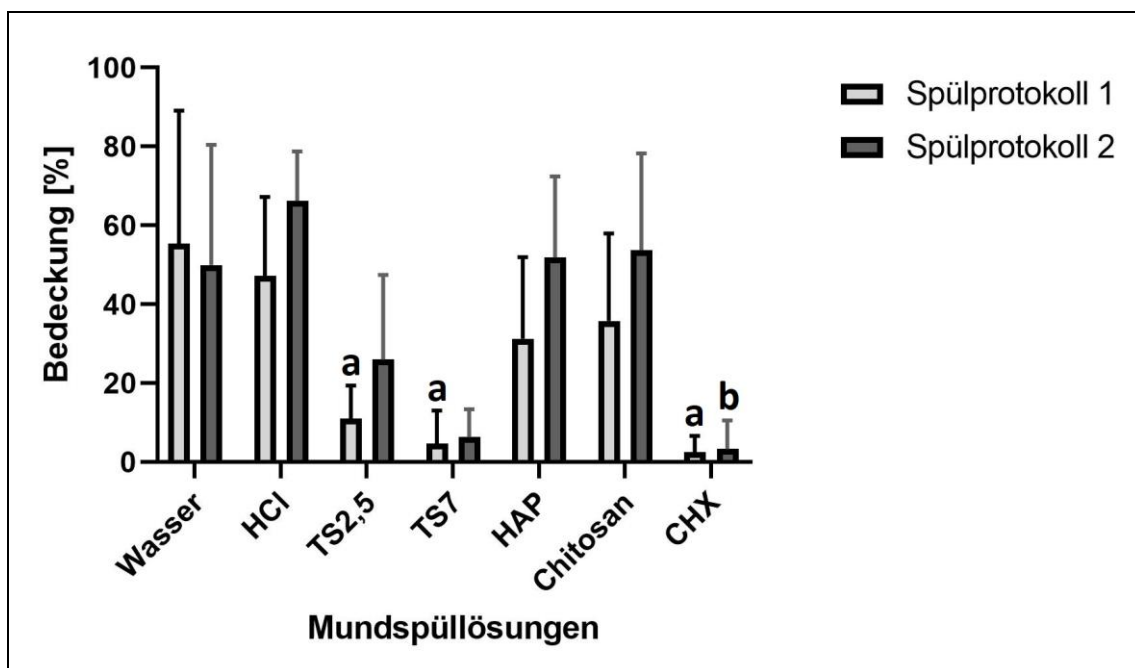


Abb. 3: Die Bedeckung der Prüfkörper mit Bakterien in [%]. Die Höhe der Balken entspricht dem Mittelwert und die aufgesetzte Linie der \pm Standardabweichung. Während einer zweitägigen Biofilm-Bildung auf bovinen Schmelz-Prüfkörpern *in-situ* spülen die Probanden ($n = 6$) 4 oder 5 Mal mit verschiedenen experimentellen Lösungen. Durch die Verwendung zweier Spülprotokolle wird die sofortige und langanhaltende Wirkung geprüft. Für die anschließende *ex-vivo* Untersuchung mit einem Fluoreszenzmikroskop wird der Biofilm mit LIVE/DEAD® BacLight™ gefärbt. Friedman-Test: $p < 0,05$. Die Spülmittel, die sich von Wasser signifikant unterscheiden, sind für das Spülprotokoll 1 mit **a** und für das Spülprotokoll 2 mit **b** markiert. HCl = Salzsäure-Lösung, TS2,5 = Tanninsäure pH = 2,5; TS7 = Tanninsäure pH = 7, HAP = Hydroxylapatit, CHX = Chlorhexidin. Modifiziert und entnommen aus [121].

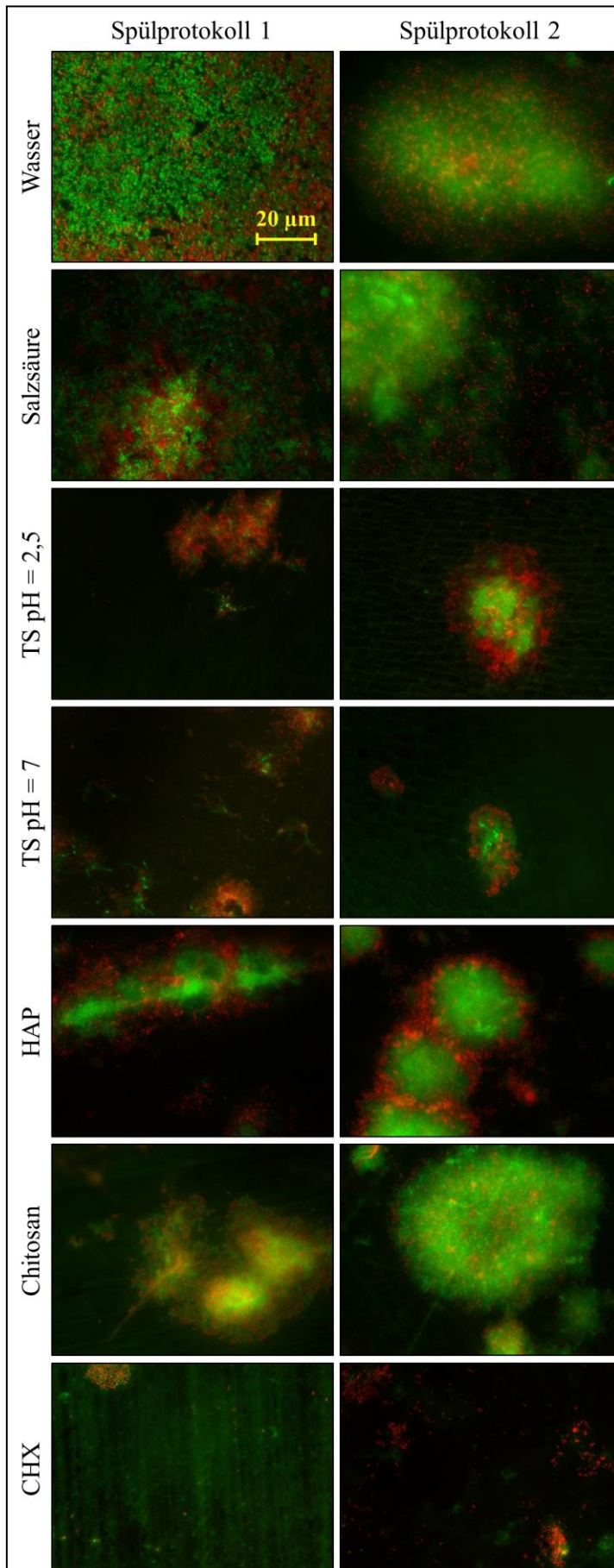


Abb. 4: Repräsentative LIVE/DEAD® BacLight™ Bilder. Während einer zweitägigen Biofilm-Bildung auf bovinen Schmelz-PK *in-situ* spülen die Probanden (n = 6) 4 oder 5 Mal mit verschiedenen experimentellen Lösungen. Durch die Verwendung zweier Spülprotokolle wird die sofortige und langanhaltende Wirkung geprüft. Für die anschließende *ex-vivo* Untersuchung mit einem Fluoreszenzmikroskop wird der Biofilm mit LIVE/DEAD® BacLight™ gefärbt. Die lebenden Bakterien fluoreszieren grün und die toten rot. HCl = Salzsäure-Lösung, TS2,5 = Tanninsäure pH = 2,5; TS7 = Tanninsäure pH = 7, HAP = Hydroxylapatit, CHX = Chlorhexidin. Modifiziert und entnommen aus [121].

4.2 LIVE/DEAD® BacLight™ - Vitalität

In Spülprotokoll 1 ergab die Spülung mit Wasser, Salzsäure-Lösung oder HAP eine Vitalität des Biofilms von 51-66% (Abb. 5). Für Tanninsäure (pH = 7) oder Chitosan liegt die Vitalität im Biofilm bei 35-43%, während Tanninsäure (pH = 2,5) oder CHX die Vitalität auf 6-23% signifikant ($p < 0,05$) reduzieren konnten. In Spülprotokoll 2 betrug die Vitalität des Biofilms nach der Applikation von Wasser, Salzsäure-Lösung, HAP oder Chitosan 51-73%. Mit der Tanninsäure (pH = 2,5) wurde die Vitalität auf 30% signifikant ($p < 0,05$) reduziert und die Spülung mit Tanninsäure (pH = 7) ergab eine Vitalität von 39%. CHX konnte die Vitalität auf 18% signifikant ($p < 0,05$) reduzieren. Unterschiede zwischen den beiden Spülprotokollen waren nur für Chitosan und CHX signifikant ($p < 0,05$). Repräsentative Aufnahmen sind in Abb. 4 gezeigt.

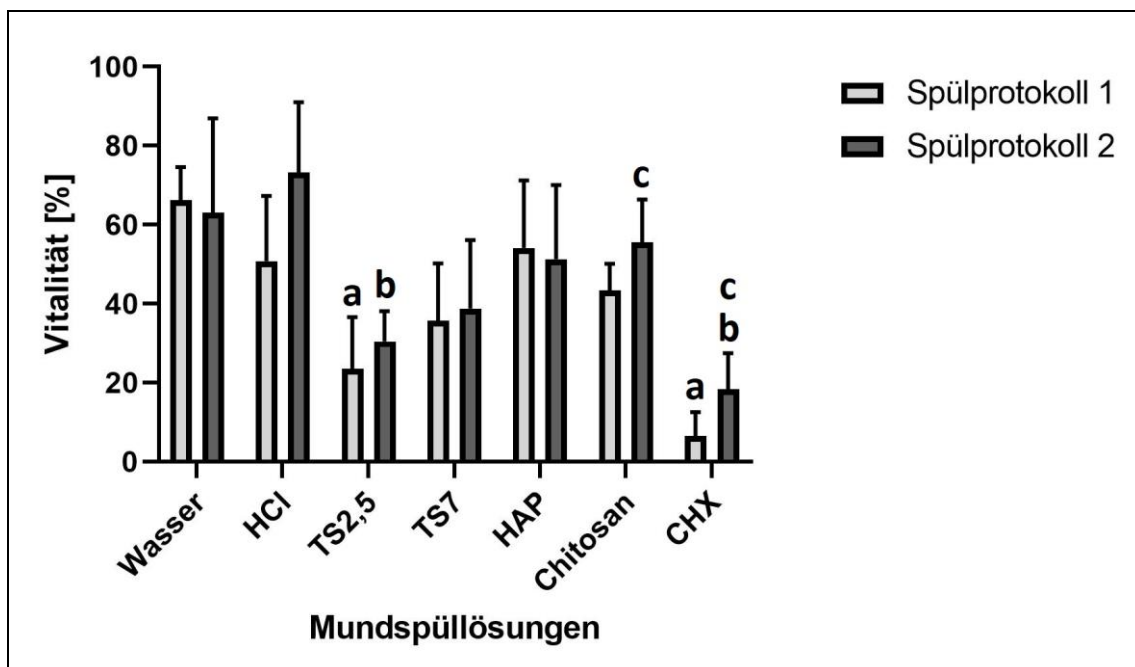


Abb. 5: Die Vitalität der Bakterien in [%]. Die Höhe der Balken entspricht dem Mittelwert und die aufgesetzte Linie der \pm Standardabweichung. Während einer zweitägigen Biofilm-Bildung auf bovinen Schmelz-Prüfkörpern *in-situ* spülen die Probanden ($n = 6$) 4 oder 5 Mal mit verschiedenen experimentellen Lösungen. Durch die Verwendung zweier Spülprotokolle wird die sofortige und langanhaltende Wirkung geprüft. Für die anschließende *ex-vivo* Untersuchung mit einem Fluoreszenzmikroskop wird der Biofilm mit LIVE/DEAD® BacLight™ gefärbt. Friedman-Test: $p < 0,05$. Die Spülmittel, die sich von Wasser signifikant unterscheiden, sind für das Spülprotokoll 1 mit **a** und für das Spülprotokoll 2 mit **b** markiert. Wilcoxon-Test: $p < 0,05$. Die signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Spülprotokollen sind mit einem **c** gekennzeichnet. HCl = Salzsäure-Lösung, TS2,5 = Tanninsäure pH = 2,5; TS7 = Tanninsäure pH = 7, HAP = Hydroxylapatit, CHX = Chlorhexidin. Modifiziert und entnommen aus [121].

4.3 Rasterelektronenmikroskopie

Unabhängig davon, welche Substanz zum Einsatz kam, war neben vereinzelt stäbchenförmigen Bakterien die prädominante Spezies *Cocci*. Sie besitzen kurze Fimbrien und sind von globulären Partikeln bedeckt. Die Fimbrien verbinden sie mit anderen Bakterien, der Matrix oder der Pellikel. Die Pellikel besteht aus 100-200 nm großen globulären Aggregaten. Die Bakterien liegen entweder einzeln oder gruppiert direkt auf der Pellikel oder eingebettet in einer Matrix vor. Zwischen den Bakterien sind auch tiefere Hohlräume zu erkennen (Abb. 11). Nach der Spülung mit Wasser oder Salzsäure-Lösung waren die PK hauptsächlich von Biofilm bedeckt (Abb. 6, 7). Bei HAP und Chitosan ist der Biofilm-Anteil geringer (Abb. 10, 11). Außerdem sind bei HAP vor allem im Spülprotokoll 1 eckige nanometergroße Partikel zu sehen. Nach der Applikation von Tanninsäure (pH = 2,5 oder 7) oder CHX waren die PK hauptsächlich von der Pellikel oder vereinzelt Bakterienkolonien bedeckt (Abb. 8, 9, 12). Die Spülung mit CHX ergab eine leicht veränderte Pellikelstruktur mit 200-500 nm großen globulären Agglomeraten.

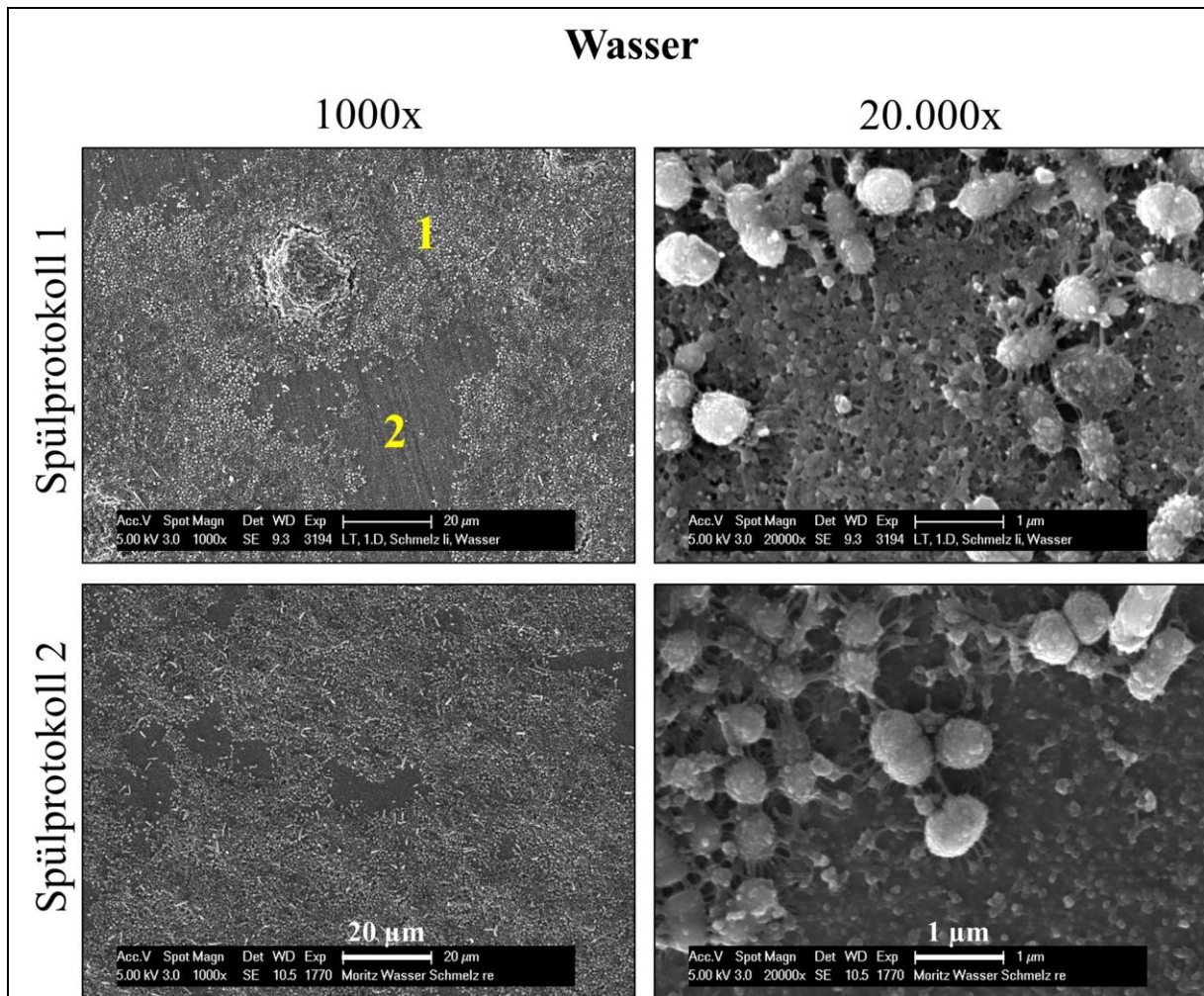


Abb. 6: REM-Aufnahmen der Prüfkörper in 1.000- und 20.000-facher Vergrößerung. Die Tragedauer der Schienen, die mit Schmelz-Prüfkörpern besetzt sind, beträgt für beide Spülprotokolle 48 h. Im Spülprotokoll 1 wird 5-mal und im Spülprotokoll 2 4-mal mit Wasser gespült. Die Prüfkörper sind mit Biofilm (1) bedeckt. Es sind nur wenige bakterienfreie Areale (2) vorhanden. Die Bakterien haben eine intakte Morphologie. Modifiziert und entnommen aus [121].

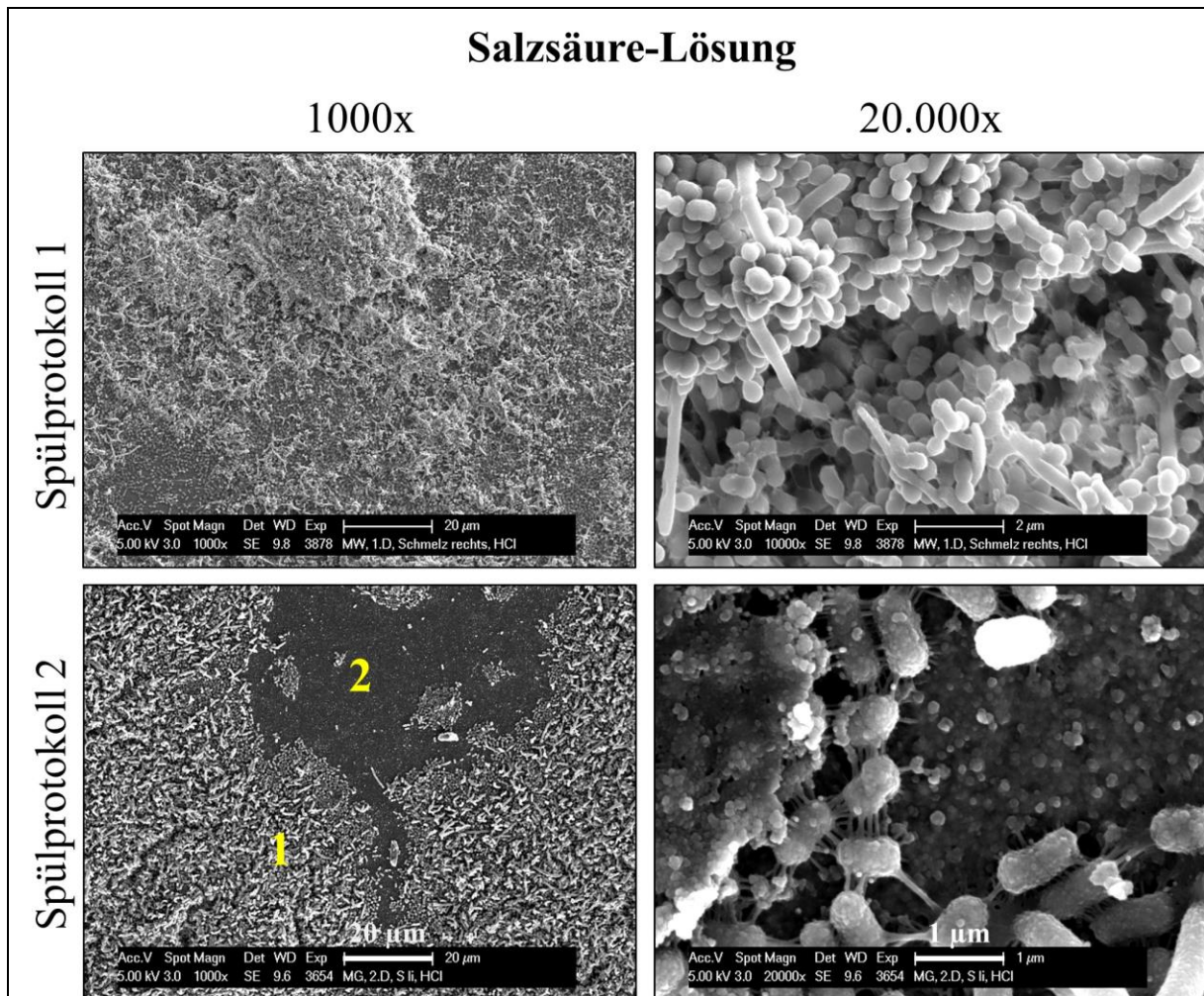


Abb. 7: REM-Aufnahmen der Prüfkörper in 1.000- und 20.000-facher Vergrößerung. Die Tragedauer der Schienen, die mit Schmelz-Prüfkörpern besetzt sind, beträgt für beide Spülprotokolle 48 h. Im Spülprotokoll 1 wird 5-mal und im Spülprotokoll 2 4-mal mit einer Salzsäure-Lösung gespült. Die Prüfkörper sind überwiegend mit Biofilm (1) bedeckt. Es kommen wenige bakterienfreie Areale vor (2). Die Bakterien haben eine intakte Morphologie. Modifiziert und entnommen aus [121].

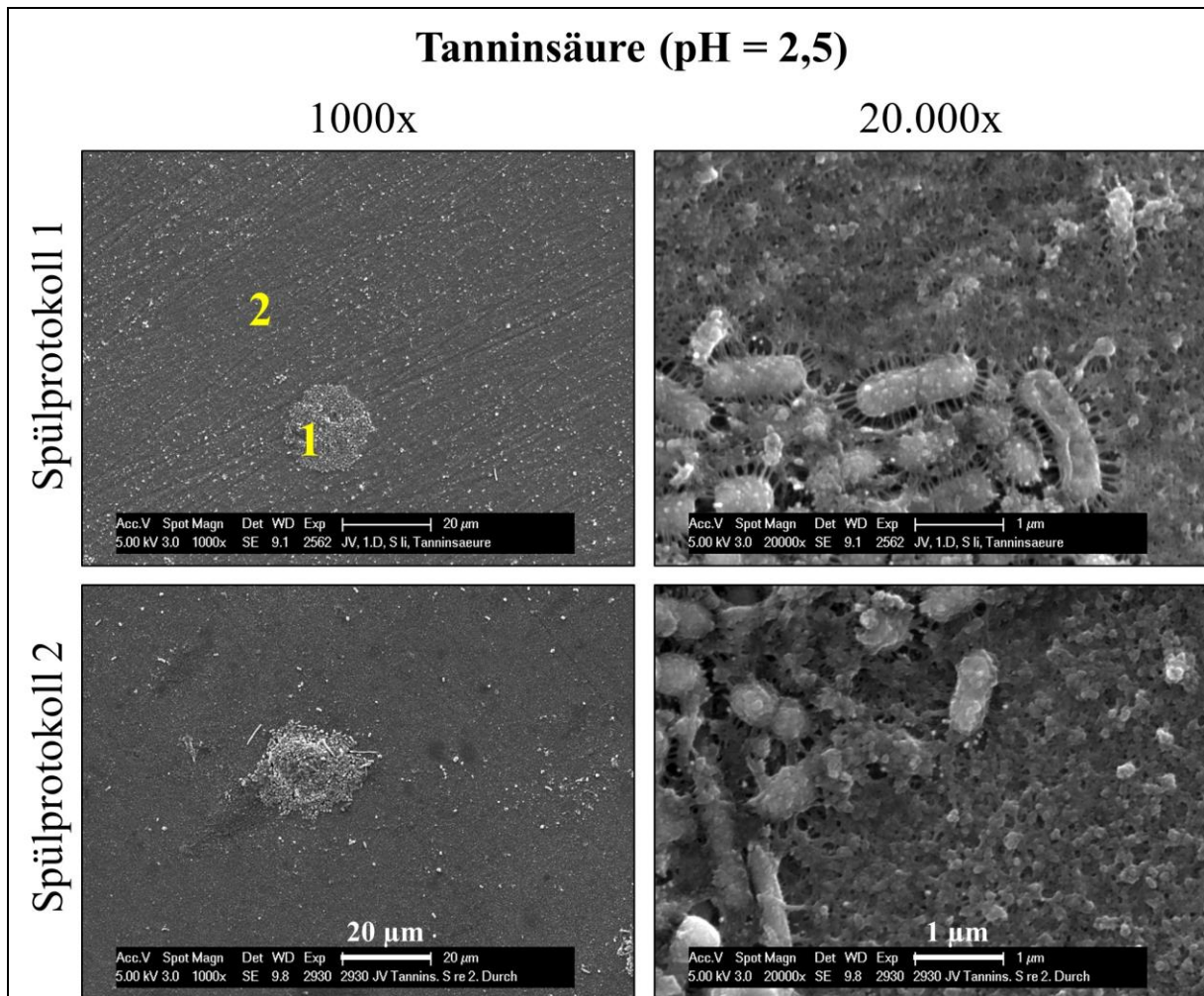


Abb. 8: REM-Aufnahmen der Prüfkörper in 1.000- und 20.000-facher Vergrößerung. Die Tragedauer der Schienen, die mit Schmelz-Prüfkörpern besetzt sind, beträgt für beide Spülprotokolle 48 h. Im Spülprotokoll 1 wird 5-mal und im Spülprotokoll 2 4-mal mit Tanninsäure (pH = 2,5) gespült. Neben einzelnen bakteriellen Kolonien (**1**) sind die Prüfkörper vorwiegend bakterienfrei (**2**). Die Bakterien haben eine intakte Morphologie. Modifiziert und entnommen aus [121].

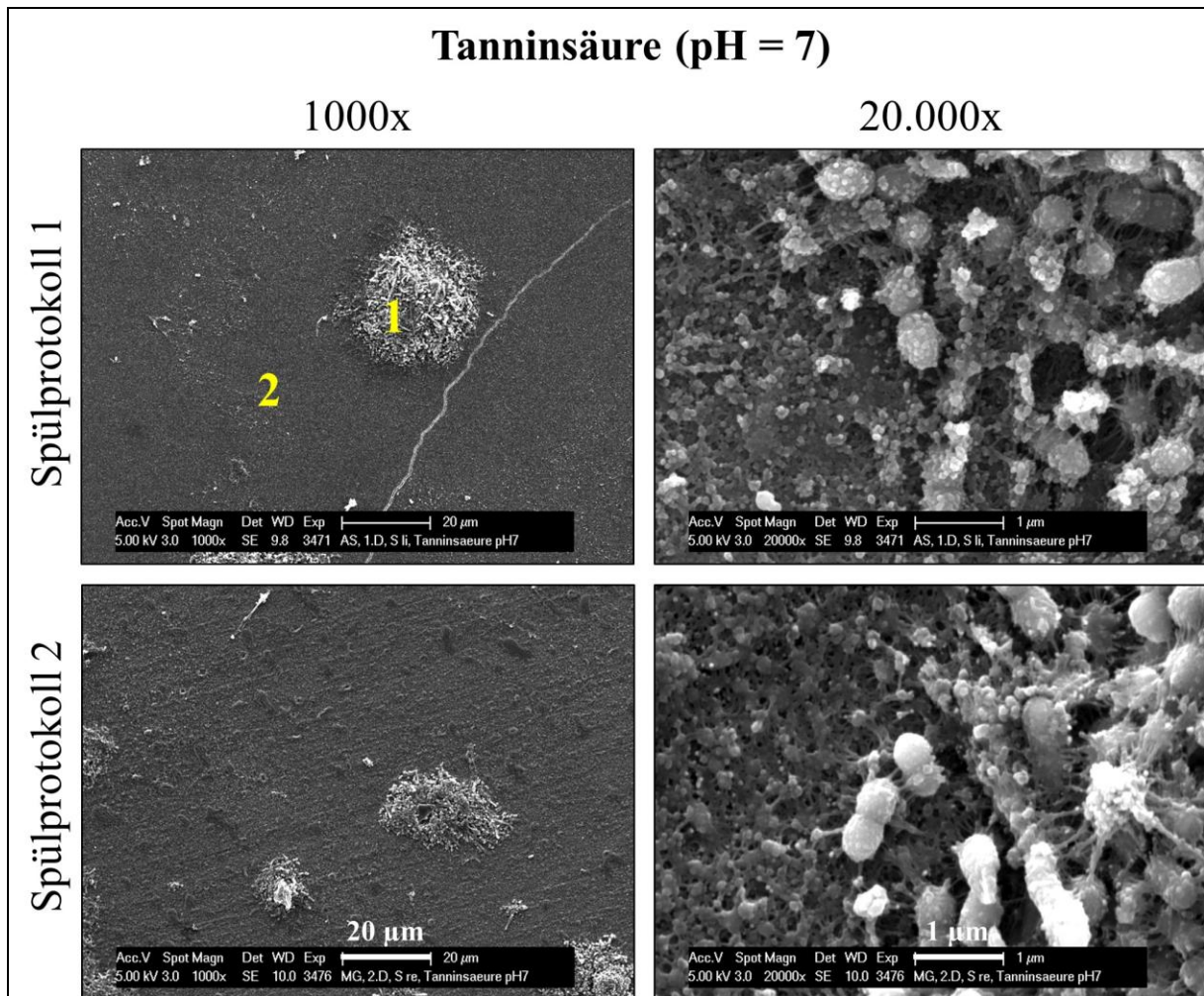


Abb. 9: REM-Aufnahmen der Prüfkörper in 1.000- und 20.000-facher Vergrößerung. Die Tragedauer der Schienen, die mit Schmelz-Prüfkörpern besetzt sind, beträgt für beide Spülprotokolle 48 h. Im Spülprotokoll 1 wird 5-mal und im Spülprotokoll 2 4-mal mit Tanninsäure (pH = 7) gespült. Neben einzelnen bakteriellen Kolonien (1) sind die Prüfkörper vorwiegend bakterienfrei (2). Die Bakterien haben eine intakte Morphologie. Modifiziert und entnommen aus [121].

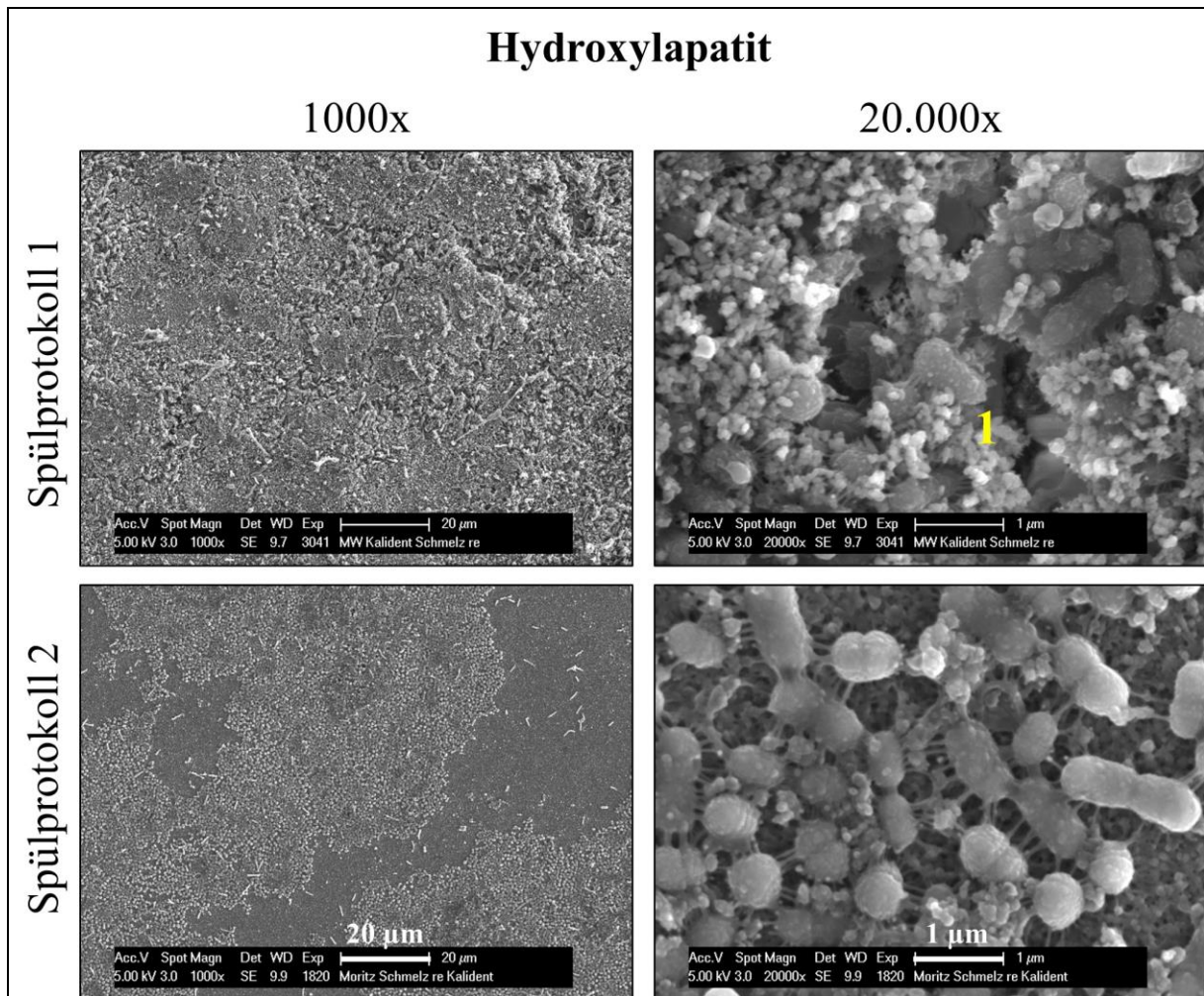


Abb. 10: REM-Aufnahmen der Prüfkörper in 1.000- und 20.000-facher Vergrößerung. Die Tragedauer der Schienen, die mit Schmelz-Prüfkörpern besetzt sind, beträgt für beide Spülprotokolle 48 h. Im Spülprotokoll 1 wird 5-mal und im Spülprotokoll 2 4-mal mit Hydroxylapatit gespült. Im Spülprotokoll 1 sind bei 20.000-facher Vergrößerung eckige Partikel zu erkennen (1).

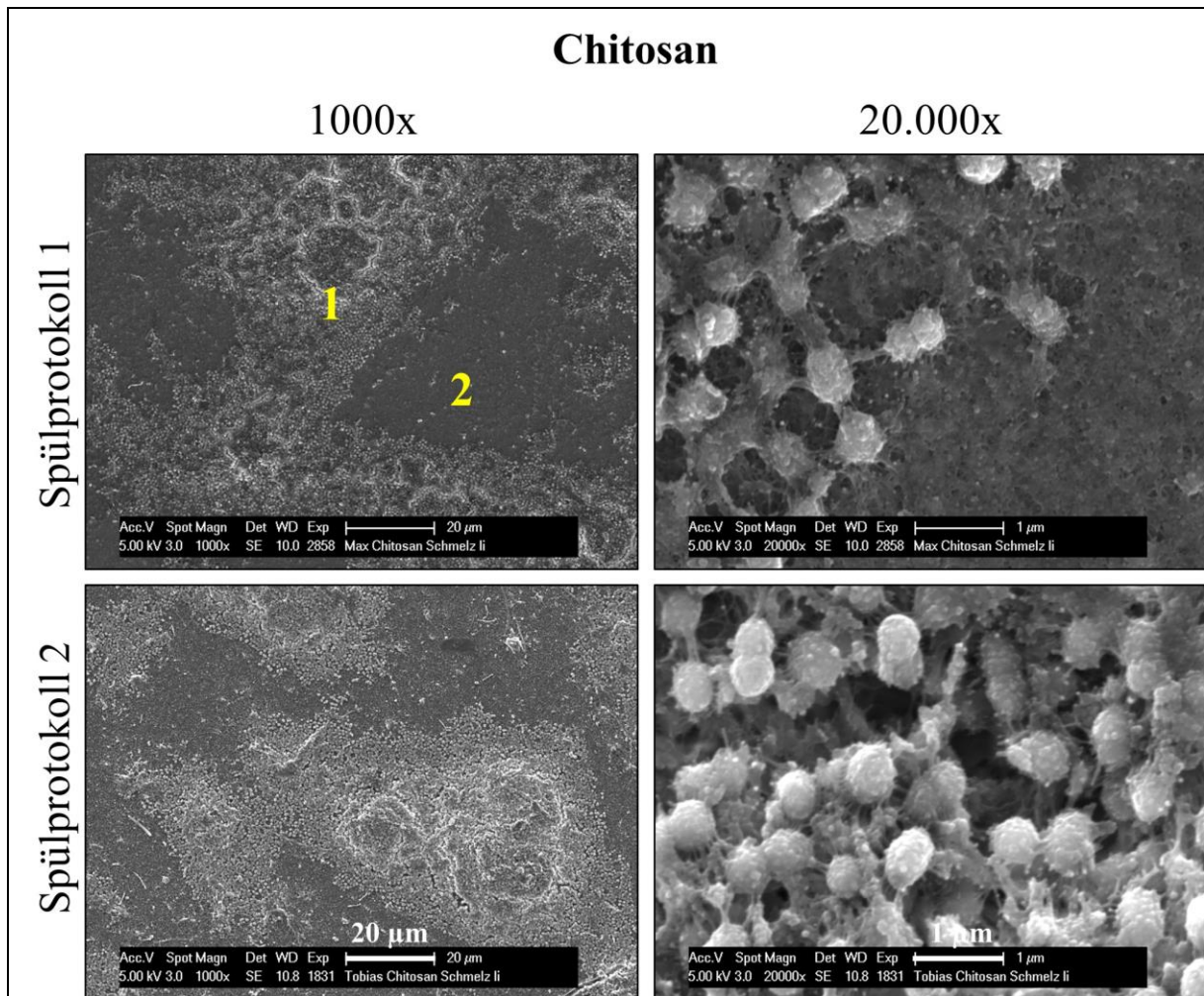


Abb. 11: REM-Aufnahmen der Prüfkörper in 1.000- und 20.000-facher Vergrößerung. Die Tragedauer der Schienen, die mit Schmelz-Prüfkörpern besetzt sind, beträgt für beide Spülprotokolle 48 h. Im Spülprotokoll 1 wird 5-mal und im Spülprotokoll 2 4-mal mit Chitosan gespült. Die Prüfkörper sind teilweise von Biofilm (**1**) oder von einer Pellikel (**2**) bedeckt. Modifiziert und entnommen aus [121].

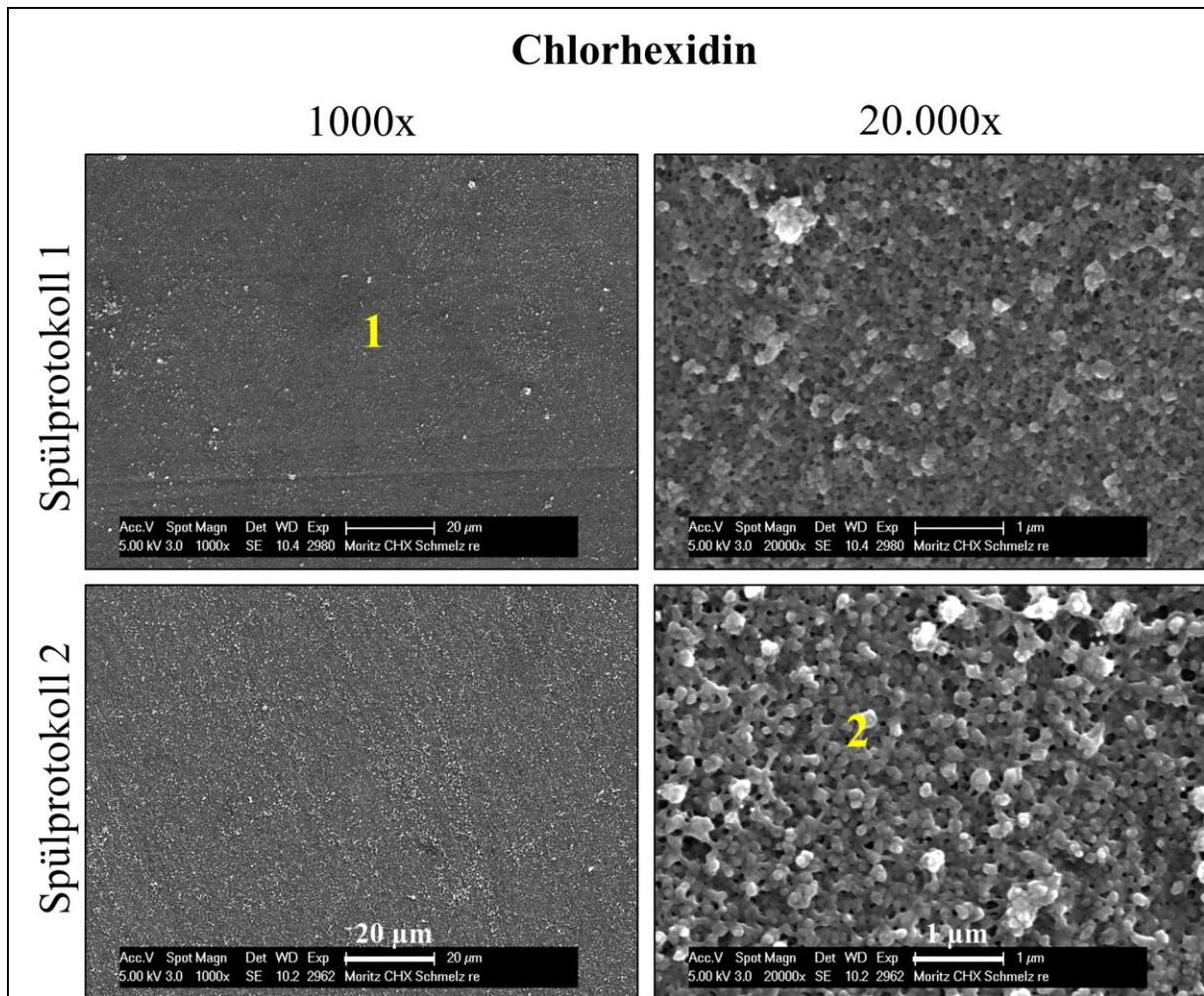


Abb. 12: REM-Aufnahmen der Prüfkörper in 1.000- und 20.000-facher Vergrößerung. Die Tragedauer der Schienen, die mit Schmelz-Prüfkörpern besetzt sind, beträgt für beide Spülprotokolle 48 h. Im Spülprotokoll 1 wird 5-mal und im Spülprotokoll 2 4-mal mit Chlorhexidin gespült. Die Prüfkörper sind hauptsächlich bakterienfrei (1). Es ist eine veränderte Pellikelstruktur zu erkennen (2). Modifiziert und entnommen aus [121].

5 Diskussion

5.1 Probanden

Bei den Probanden handelt es sich um Zahnmedizinstudenten, die gesunde orale Zustände aufweisen und eine suffiziente Mundhygiene betreiben. Damit repräsentieren sie eine Population, deren prädominierter Phänotyp im Biofilm sich von Patienten mit oralen Krankheiten unterscheiden könnte [135]. Es ist bisher unklar, inwieweit sich die Phänotypen im Widerstand gegenüber antibakteriellen Substanzen unterscheiden. Nichtsdestotrotz ist der Biofilm eine wichtige Bedingung für die Entstehung von Karies oder Gingivitis, da seine Reduktion ebenfalls die Häufigkeit von Karies und Gingivitis reduziert [85].

Die Anzahl der Probanden orientierte sich an Studien mit ähnlicher Methode [3,5,45,52,54,93,136,145,149]. *In-situ*-Studien zur Untersuchung eines intraoral gebildeten Biofilms oder der Pellikel sind sehr zeitaufwändig. Dies gilt sowohl für die Wissenschaftler bei der Vorbereitung und Auswertung der Proben als auch für die Probanden. In der vorliegenden Arbeit mussten die Probanden die Schienen 12-mal für jeweils 48 h tragen und dabei auf ihre Mundhygiene verzichten. Daher war neben der Geduld auch die Zuverlässigkeit der Probanden erforderlich. Es ist schwierig, Personen von der Teilnahme an einer solchen Studie zu überzeugen. Daher wurden Studenten, die in unserem Labor arbeiten, als Probanden rekrutiert.

5.2 Prüfkörper

In dem vorliegenden Versuch kamen 336 bovine Schmelz-PK zum Einsatz. Zwar hätten humane Zähne klinisch einen höheren Stellenwert, jedoch begrenzen mehrere Faktoren ihre Anwendung. Humane Zähne stehen weder in ausreichender Quantität noch Qualität zur Verfügung. Viele Zähne werden in Folge von Karies oder anderen Defekten extrahiert und sind damit ungeeignet. Zudem unterscheiden sich die Zähne interindividuell im Alter sowie in chemischen und physikalischen Merkmalen. Das allein kann zu großen Abweichungen der Ergebnisse führen. Außerdem können humane Zähne eine Infektionsgefahr darstellen.

Manche Untersuchungen, wie die am Mikroskop, erfordern eine ausreichend große plane Fläche, die mit humanen Zähnen schwer zu realisieren ist. Deshalb werden neben synthetischen und anderen tierischen Materialien vermehrt PK bovinen Ursprungs verwendet. Sie können in großer Anzahl und einheitlicher Qualität bereitgestellt werden. Trotz vieler Gemeinsamkeiten

mit humanen Zähnen sind mehrere Unterschiede vorhanden. So weisen bovine Zähne beispielsweise größere Schmelzkristalle auf und das Calcium ist homogener im Schmelz verteilt. Diese Faktoren müssen bei der Interpretation von Ergebnissen berücksichtigt werden [148]. Die Befestigung der PK erfolgt auf der bukkalen Seite der Schienen, da sich die Pellikel auf der palatinalen Seite unterscheidet. Das liegt daran, dass sich die Zusammensetzung des Speichels aus den palatinalen Speicheldrüsen von der der Ohrspeicheldrüse unterscheidet. Außerdem kommen palatinal mehr Scherkräfte durch die Zunge zustande. Dadurch hat die Pellikel palatinal eine geringere Dicke und eine mehr granuläre als globuläre Struktur [58]. Bei der Verwendung von bovinen Prüfkörpern, die auf Oberkieferschienen befestigt sind, handelt es sich um eine etablierte Methode, die wieder kürzlich verwendet wurde [49,151].

5.3 Studiendesign

Bei dem vorliegenden Versuch handelt es sich um eine *in-situ*-Studie. Sie hat gegenüber *in-vitro*-Studien eine höhere klinische Relevanz. *In-vitro*-Studien werden häufig an planktonischen Bakterien oder an Monokulturen durchgeführt. Zudem werden die antibakteriellen Substanzen oftmals länger appliziert als klinisch üblich. In der Mundhöhle hingegen bilden viele verschiedene Mikroorganismen einen komplexen Biofilm. Er ist im Vergleich zu planktonischen Bakterien resistenter gegenüber antibakteriellen Substanzen. Außerdem kommen intraoral zusätzliche Faktoren wie der Speichel und der Kontakt mit Geweben hinzu. Deshalb können die Ergebnisse einer *in-vitro*-Studie nicht immer mit einer *in-situ*- oder *in-vivo*-Studie bestätigt werden. Sie eignen sich jedoch zur Durchführung präklinischer Versuche potenzieller Substanzen [46,141].

Der Versuchsaufbau gehört zum sogenannten Crossover Design, bei dem alle Probanden mit allen Substanzen spülen und ihre eigenen Kontrollen sind. Eine wichtige Voraussetzung zur Durchführung einer solchen Studie ist die Auswaschphase. Sie muss lang genug sein, damit keine Überhangseffekte in den nächsten Versuch hineinwirken können [140]. In der Literatur werden verschiedene Angaben über die Auswaschphase gemacht. Da CHX als Goldstandard die höchste Substantivität besitzt, wird es zur Ermittlung der Auswaschphase berücksichtigt. CHX persistiert nach einmaliger Spülung in der Mundschleimhaut und kann so bis zu 12 h die Bakterienanzahl im Speichel unterdrücken [94]. Die Zahnoberfläche wird nach 24 h in gewohntem Muster von Bakterien besiedelt [116]. Deshalb betrug die Auswaschphase zwischen den einzelnen Versuchen mindestens einen ganzen Tag.

Die Tragedauer von 48 h wurde aus mehreren Gründen gewählt. In Vorversuchen erwies sich eine Tragedauer von nur 24 h als ungünstig, da nicht ausreichend Biofilm zur Beurteilung der Vitalität gebildet wurde. Außerdem ist bei 48 h der intraoralen Biofilm-Bildung die Vitalität der Bakterien im Biofilm nicht länger abhängig von der Lokalisation der Prüfkörper in der Mundhöhle [3]. Das gleiche gilt für die Dicke des Biofilms an verschiedenen Stellen im bukkalen Bereich des Ober- und Unterkiefers [3]. In den 48 h wurde 4 oder 5 Mal gespült. Da der Abstand zur *ex-vivo* Untersuchung entweder 30 min oder 12 h betrug, konnte sowohl eine Aussage über die sofortige als auch langanhaltende Wirkung getroffen werden. Gerade die langanhaltende Wirkung wird von Mundspüllösungen gefordert. Sie ist von der Retention der Substanz in der Mundhöhle abhängig [11].

Während der Versuche durften die Probanden weder Zahnpasta noch andere Mundspülungen verwenden. Lediglich zur Nahrungsaufnahme und zum Zähneputzen mit Wasser durfte die Schiene temporär außerhalb der Mundhöhle in einer Feuchtkammer gelagert werden. Damit kann sich der *in-situ* gebildete Biofilm von dem physiologischen Biofilm dahingehend unterscheiden, dass er von dem mechanischen Einfluss fester Nahrung nicht gestört wird. Die Probanden können während des zweitägigen Versuchs nicht kontinuierlich kontrolliert werden. Deshalb muss die Compliance der Probanden bei der Interpretation von Ergebnissen ebenfalls berücksichtigt werden [141].

5.4 Auswertungsverfahren

Zur Beurteilung der antibakteriellen und antiadhärenten Wirkung wurde der Biofilm mit LIVE/DEAD® *BacLight*TM gefärbt und im FM untersucht. Zur Unterscheidung sowie Zählung lebender und toter Bakterien ist LIVE/DEAD® *BacLight*TM anderen Färbungen und Verfahren überlegen. Die Methode ist reliabel, bietet einen nützlichen Farbkontrast aus grün und rot, zeigt eine relativ geringe Hintergrund-Fluoreszenz und ist schnell und einfach durchzuführen [9,29]. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit der Software ImageJ ausgewertet. Die kostenlose Software wurde 1987 von Rasband entwickelt. Sie zählt zu den populärsten wissenschaftlichen Analyseprogrammen von Bilddateien [123]. Mithilfe der Software wurden die Bakterien manuell ausgewählt sowie Anzahl und Helligkeit der Pixel berechnet. Für die Bestimmung der Bedeckung wurden von den ausgewählten Bakterien der farbigen Bilder die Anzahl der Pixel gemessen. Für die Bestimmung der Vitalität hingegen wurden die grauen Bilder beider Filter separat ausgewertet. Dabei wurde neben der Anzahl auch die Helligkeit der Pixel berücksichtigt. Das hat den Vorteil, dass übereinanderliegende

Bakterien heller leuchten und damit einen höheren Messwert erhalten. Damit kann die Vitalität eines dicken Biofilms genauer ermittelt werden. Das kann aber auch nachteilig sein. Vor allem dann, wenn der Biofilm eine heterogene Dicke aufweist und sowohl aus dichten als auch spärlich besiedelten Regionen besteht. Und zwar wird die Belichtungszeit im FM an die Menge des Biofilms angepasst. Sie ist bei großer Bedeckung und dickem Biofilm geringer als bei wenig vorhandenem und dünnem Biofilm. Wenn in einem Bild nebeneinander dicker und dünner Biofilm vorhanden ist, wird die Belichtungszeit den dicken Arealen angepasst. Damit wird verhindert, dass die Bakterien heller angezeigt werden und im Bild zu einem grellen Fleck verschmelzen. Das kann aber dazu führen, dass Bakterien in den dünnen Arealen weniger Belichtungszeit bekommen. Sie werden damit weniger hell angezeigt und erhalten fälschlicherweise geringere Werte bei der Auswertung (Abb. 13).

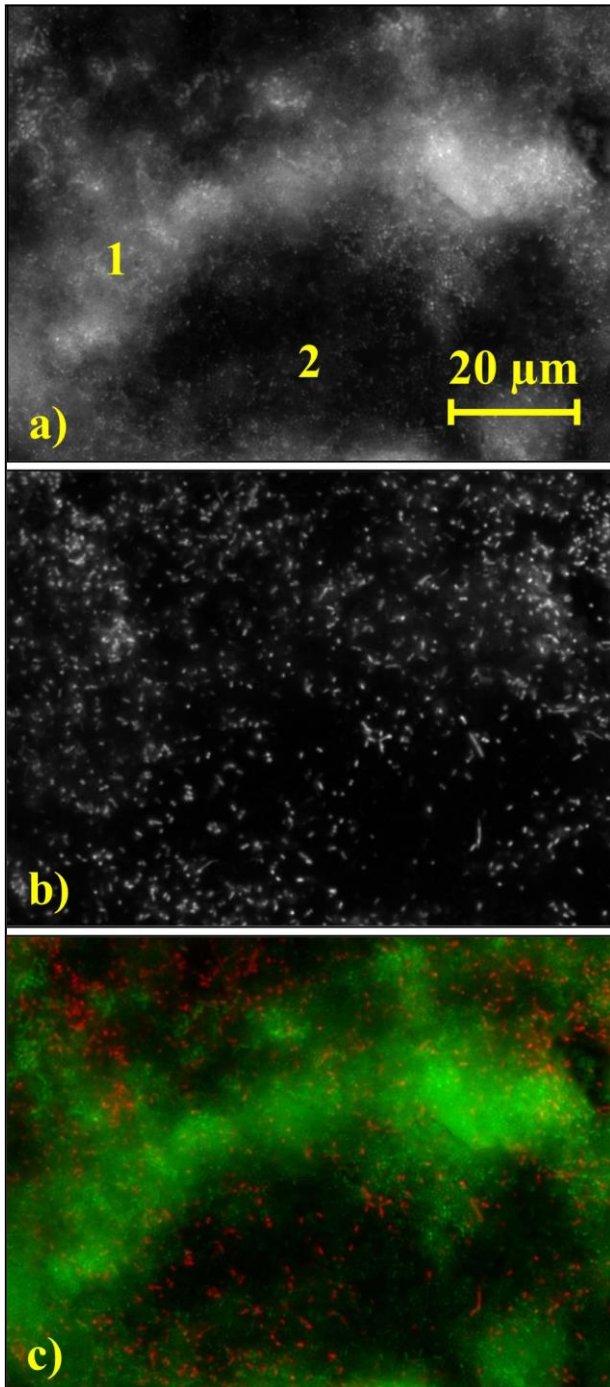


Abb. 13: Beispiel für die Problematik bei der Auswertung mit ImageJ. Der Biofilm wurde *in-situ* auf Schmelz-Prüfkörpern gebildet. Der Biofilm wird mit LIVE/DEAD® BacLight™, das zwei Farbstoffe enthält, gefärbt. Anschließend werden Bilder mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die Farbstoffe werden bei verschiedenen Wellenlängen angeregt. Deshalb erfolgt die Aufnahme grün fluoreszierender lebender Bakterien (a) und rot fluoreszierender toter Bakterien (b) nacheinander. Die zunächst in Grau vorliegenden Bilder werden hinterher in ein farbiges Bild zusammengelagert (c). Die Belichtungszeit variiert je nach Menge und Verteilung von Bakterien. Wenn innerhalb eines Bildes dicker (1) und dünner (2) Biofilm nebeneinander vorliegt, erhalten die Bakterien im letztgenannten Fall zu wenig Belichtungszeit und erscheinen dunkler. Da mit dem Analyseprogramm ImageJ auch die Helligkeit der ausgewählten Bakterien berücksichtigt wird, kann das zu Ungenauigkeiten bei der Berechnung der Vitalität kommen. Im Vergleich dazu erscheinen die toten Bakterien (b) gleichermaßen hell. Da die Software die Pixel des ausgewählten Bereichs und nicht die Bakterien zählt, variieren die Werte zwischen unterschiedlich großen Bakterien. Dadurch haben Stäbchen oder in diesem Bild auch tote Bakterien (b) mehr Einfluss auf die Vitalität als die kleineren grünen Bakterien (a).

Außerdem können Bakterien, die sich teilen, heller leuchten. Während der Zellteilung liegt ein erhöhter Metabolismus und damit vermehrt Nukleinsäuren vor, an denen die Farbstoffe binden können [7]. Hinzu kommt, dass nicht die Anzahl Bakterien, sondern die Anzahl Pixel berechnet werden. Dadurch erhalten unterschiedlich große Bakterien verschiedene Messwerte. Diese Diskrepanz zeigt sich insbesondere im Vergleich von Kokken und Stäbchen. Gelegentlich sind auch die rot fluoreszierenden Bakterien insgesamt größer und täuschen in Folge eine geringere Vitalität vor. Weiterhin ist die Interpretation der Vitalität bei einer geringen

Bedeckung erschwert. Wenn der gesamte PK nur von wenigen Bakterien bedeckt wird, dann hat der Zustand einzelner Bakterien einen weitaus größeren Einfluss auf das Ergebnis als eine große repräsentative Menge Bakterien. Insgesamt ist die Auswertung mit ImageJ objektiver als die Verwendung eines Scoring-Systems, weist aber oben genannte Schwächen auf, die mit anderen Methoden wie der Durchflusszytometrie umgangen hätten können [44].

Die Untersuchung mit einem einzigen bildgebenden Verfahren reicht nicht aus, um die komplexe Struktur des Biofilms vollständig aufzudecken. Deshalb wurde die fluoreszenzbasierte Untersuchung zumindest durch das REM ergänzt. Während erstgenanntes für die Quantifizierung von lebenden und toten Bakterien geeignet ist, kann mithilfe des Rasterelektronenmikroskops die Struktur von Oberflächen besser beschrieben werden. Außerdem können bei Einsatz zweier Verfahren Artefakte einfacher als solche erkannt werden [132]. Für die Interpretation rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen ist die Bildqualität von entscheidender Bedeutung. Die Bilder werden in Grau angezeigt. Deshalb sind sowohl Auflösung und Kontrast wichtig [6].

5.5 Spülung mit Wasser (Negativkontrolle)

In der Negativkontrolle waren die PK bei beiden Spülprotokollen zur Hälfte von Bakterien bedeckt. In der Literatur sind wenige Studien vorhanden, welche die Bedeckung der Schmelz-PK erfasst haben. Stattdessen wird häufig die Anzahl der Bakterien gemessen. Außerdem unterscheiden sich die Studien in der Häufigkeit der Spülung und der Tragedauer der Schienen. Die Ergebnisse stimmen mit einer anderen Studie überein, in der laut Scoring-System ebenfalls die PK nach 48 h zur Hälfte von Biofilm bedeckt waren [39]. Die interindividuellen Unterschiede im vorliegenden Versuch waren hoch. Das zeigt sich an einer hohen Standardabweichung. Die Vitalität lag im Spülprotokoll 1 und 2 bei über 60%. Das Ergebnis stimmt mit der Literatur überein [3]. Die hohe Anzahl toter Bakterien kann wie folgt erklärt werden. Zu Beginn der Biofilm-Bildung ist der Zahn von einer dünnen Bakterienschicht besiedelt. Sie ist den antibakteriellen Komponenten im Speichel besser zugänglich als ein reifer Biofilm. Außerdem kann der Zahn auch mit bereits toten Bakterien besiedelt werden, da ihre Adhäsine weiterhin mit der Pellicel wechselwirken können. An die tote Bakterienschicht können sich lebende Bakterien anlagern. An der Oberfläche des Biofilms gehen wiederum Bakterien zugrunde, da sie dem Speichel ausgesetzt sind. Zusammenfassend sind im ungestörten Biofilm tote Bakterien vorhanden, die insbesondere am Boden und der Oberfläche des Biofilms lokalisiert sind [3,51,100]. Mit dem REM wird die Oberfläche des Biofilms abgebil-

det, also die Schicht, die eben für überwiegend avital erklärt wurde. Zum einen ist die Pellikel als bakterienarme Schicht zu erkennen. Die globulären Partikel stellen Proteinaggregate der Pellikel dar [61]. Zum anderen sind Bakterien vorhanden. Sie weisen eine globulär strukturierte Oberfläche auf. Diese Struktur kann verschiedener Herkunft sein. Es kann sich um eine aufgelagerte Schicht Pellikel oder auch um die Glykokalyx handeln, also eine Schicht aus Polysacchariden, die der Zellmembran außen anliegt [82,88]. Sie kann durch Entwässerung und Trocknung der PK schrumpfen und eine globuläre Form annehmen [132]. Andererseits wird beschrieben, dass die Glykokalyx erst bei niedrigen Spannungen und nach bestimmten Färbungen sichtbar ist und eine nadelförmige Form besitzt [35]. Neben der Glykokalyx kann es sich bei der globulären Struktur auch um Bestandteile der extrazellulären Matrix handeln [139]. Das Auftreten einer globulären Oberfläche wurde auch nach Behandlung mit antibakteriellen Substanzen beschrieben [18,63]. Die globuläre Struktur ist bereits in der Negativkontrolle deutlich zu erkennen. Deshalb ist diese Struktur schwierig als Resultat antibakterieller Substanzen zu interpretieren. Bei den Hohlräumen kann es sich um Wasserkanäle handeln, die die Zirkulation verschiedener Substanzen sowie Zellen ermöglichen [2,145].

5.6 Spülung mit Chlorhexidin (Positivkontrolle)

Als Positivkontrolle hat sich CHX in einer 0,2%igen Lösung als Goldstandard der chemischen Biofilm-Kontrolle etabliert [77]. Im vorliegenden Versuch zeigt die Spülung mit CHX den stärksten sofortigen und dank der hohen Substantivität auch langanhaltenden antiadhärenten Effekt. Die hohe Substantivität ergibt sich unter anderem durch die Bindung von CHX an die Pellikel [67]. Der antiadhärente Effekt konnte mit dem REM verifiziert werden. Es waren, wenn überhaupt, nur einzelne Bakterien erkennbar. Im Vergleich zu der Negativkontrolle wies die Pellikel jedoch eine veränderte Struktur auf. Während in der Negativkontrolle die Pellikel aus 100-200 nm großen Proteinaggregaten bestand, waren nach der Spülung mit CHX globuläre Einheiten in einer Größe von 200-500 nm zu erkennen. Das könnte verschiedene Ursachen haben. Aus transelektronenmikroskopischen Aufnahmen geht hervor, dass die Pellikel nach der Applikation von CHX aus einem elektronen-dichteren granulären Material bestand als ohne Applikation [16]. Zudem kann CHX an die Proteine in der Pellikel binden [94]. Andererseits könnte es sich um Reste untergegangener Zellen handeln. Dem widerspricht jedoch die Tatsache, dass Zellschäden durch CHX selten im REM zu sehen sind, sondern vielmehr im Transmissionselektronenmikroskop [17,139]. Zusammengefasst ist im REM vor allem der antiadhärente Effekt von CHX zu beobachten.

Neben der antiadhärenten Wirkung hat CHX auch den höchsten antibakteriellen Effekt unter den verwendeten Substanzen. Die Vitalität war im Spülprotokoll 1 niedriger als im Spülprotokoll 2, was für einen starken sofortigen antibakteriellen Effekt spricht. Das deckt sich mit der Formulierung von Jenkins *et al.* (1988). Er beschrieb die Langzeitwirkung von CHX als Folge einer unmittelbar bakteriziden Wirkung und einer länger andauernden bakteriostatischen Wirkung [67].

5.7 Spülung mit Tanninsäure (pH = 2,5)

Tanninsäure oder Polyphenole generell sind für ihre antibakterielle und antiadhärente Wirkung bekannt [65,108]. Tannine sind in der Lage, Proteine auszufällen und in ihrer Funktion zu hemmen, Chelatkomplexe zu bilden sowie die Pellikelstruktur zu verändern [64,65,113,120,146,151]. Die eingesetzte Tanninsäure wurde aus den Galläpfeln der Eiche *Quercus infectoria* gewonnen. Es wurde eine 5%ige Lösung verwendet, die einen pH-Wert von pH = 2,5 aufwies. Die Spülung mit der Lösung resultierte im Spülprotokoll 1 in einer signifikant ($p < 0,05$) reduzierten Bedeckung (4,6%) der Schmelzoberfläche mit Biofilm. Damit wirkt die Tanninsäure an Schmelz-PK antiadhärent, was mit den Ergebnissen der Literatur übereinstimmt [52,54,65,125,144]. Mit Ausnahme von Hertel *et al.* (2017) wurden in den Studien andere Polyphenole als die Tanninsäure verwendet. Zwar haben sich die aufgeführten Studien bezüglich der Applikationsdauer, Tragedauer sowie Konzentration und Volumen der verwendeten Mittel untereinander und zu dem vorliegenden Versuch unterschieden, sie konnten aber allesamt eine antiadhärente Wirkung von polyphenolhaltigen Mundspüllösungen nachweisen. Im Spülprotokoll 2 dagegen war die Bedeckung (6,3%) der Schmelzoberfläche mit Biofilm höher als im Spülprotokoll 1. Die Tanninsäure konnte den Biofilm statistisch nicht signifikant reduzieren. Aufgrund der geringen Probandenzahl ($n = 6$) ist die Power und damit die Chance gering, statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten. Laut der Software G*Power wären mindestens 12 Probanden nötig, um mit einer Power von 80% eine Reduktion des Biofilms von 80% zu erkennen [36]. Da das Ergebnis statistisch nicht signifikant ist, liegen nicht genügend Beweise vor, um die Nullhypothese abzulehnen. Eine Wirkung ist zwar zu erkennen, aber klinisch ist eine Reduktion der Bedeckung auf 25% ohnehin nicht ausreichend. Zwar hat Tanninsäure möglicherweise einen klinisch relevanten sofortigen Effekt, ihr fehlt es aber an Substantivität, um über 12 h ausreichend antiadhärent zu wirken. Das Ergebnis im Spülprotokoll 2 müsste infolge der geringen Probandenzahl und der hohen Standardabweichung durch weitere Versuche verifiziert werden. Die Vitalität konnte in beiden Spülprotokollen auf 30% oder darunter gesenkt werden, was sich mit der Literatur

deckt [65]. Der Effekt ist zwar nicht so stark wie der von CHX, die Eliminierung aller oralen Bakterien ist aber ohnehin nicht gewünscht. Eine Störung der residenten Flora kann nämlich zu Dysbiose führen [92]. Insgesamt wirkt die Tanninsäure in dem Maße antibakteriell, dass sie auch langfristig die Mundhygiene ergänzen kann. Die Bildung extrinsischer Verfärbungen der Zähne könnte ein limitierender Faktor sein [104]. In der vorliegenden Arbeit wurden keine extrinsischen Zahnverfärbungen beobachtet. In einer kürzlich publizierten Studie von Radafshar et al. (2017) wurden Zahnverfärbungen beobachtet. Jedoch haben die Probanden eine Woche lang täglich mit einem Tee, der 1% Tannine enthielt, gespült. Die Verfärbungen waren weniger ausgeprägt als in der Kontrolle Chlorhexidin [109]. Nichtsdestotrotz können extrinsische Zahnverfärbungen hauptsächlich aus ästhetischen Gründen durch eine professionelle Zahnreinigung entfernt werden [34].

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigen die geringe Bedeckung der Schmelzoberfläche mit Biofilm. Im Vergleich zu Wasser sind jedoch keine Unterschiede in der Morphologie festzustellen. Tannine können die Zellmembran stören und es wurden deshalb lytische Zellen erwartet. Da die Tanninsäure dafür die Zellwand durchdringen muss, kann es sein, dass die Konzentration der verwendeten Lösung nicht ausgereicht hat [63]. Außerdem könnte sich die Wirkungsweise und das Wirkspektrum der Tanninsäure von anderen Tanninen oder Polyphenolen unterscheiden.

5.8 Spülung mit Tanninsäure (pH = 7) und Salzsäure-Lösung

Ein niedriger pH-Wert kann den Phänotyp der Bakterien im Biofilm ungünstig beeinflussen [13,134]. Deshalb wurde eine weitere Tanninsäure-Lösung angesetzt, die auf einen neutralen pH-Wert titriert wurde. Sie wirkte genauso antiadhärent und leicht schwächer antibakteriell als die saure Lösung. Die antibakterielle Wirkung von Tanninsäure beruht u.a. auf der Fähigkeit, Chelatkomplexe mit Metallionen zu bilden. Von einem anderen in der Zahnmedizin verwendeten Chelatbildner ist bekannt, dass seine Affinität zu Calcium-Ionen mit dem pH-Wert abnimmt [102]. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) hat mehrere Carboxylgruppen, die als Liganden für einen Chelatkomplex zur Verfügung stehen. Bei einem geringen pH-Wert liegen die Gruppen protoniert vor und dadurch sind weniger Liganden vorhanden [21]. Ein ähnlicher Effekt könnte bei der Tanninsäure auftreten, wobei Hydroxylgruppen Chelatkomplexe bilden [47,120]. Inwieweit der Dissoziationsgrad dieser Gruppen bei einem sauren pH-Wert eine Rolle spielt, ist nicht bekannt.

Um zu überprüfen, in welchem Ausmaß der niedrige pH-Wert der verwendeten Tanninsäure selbst Einfluss auf den Biofilm ausübt, wurde eine Salzsäure-Lösung mit $\text{pH} = 2,5$ angesetzt. Die anorganische Säure wurde deshalb gewählt, da sie im Gegensatz zu manchen organischen Säuren bisher keine antibakterielle oder chelatisierende Wirkung gezeigt hat [130]. Die Spülung resultierte in beiden Spülprotokollen in einer Bedeckung der Schmelzoberfläche mit Biofilm und Vitalität, die sich mit den Ergebnissen der Negativkontrollen deckten. Mit Rücksicht auf die niedrige Probandenzahl und der semiquantitativen Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder, hat die Salzsäure-Lösung weder eine antiadhärente noch antibakterielle Wirkung gezeigt. Im REM waren keine Unterschiede zu der Spülung mit Wasser zu erkennen.

Zusammenfassend hat der pH-Wert der Tanninsäure-Lösung keinen großen Einfluss auf die antibakterielle oder antiadhärente Wirkung. Deshalb ist der klinische Einsatz einer neutralen Tanninsäure-Lösung als Mundspüllösung denkbar, da insbesondere der antiadhärente Effekt ähnlich hoch ist wie der von CHX. Es sind bisher keine *in-situ*-Studien einer neutralen Tanninsäure-Lösung auf die Biofilm-Bildung bekannt.

5.9 Spülung mit Hydroxylapatit

Aufbauend auf der Theorie, dass durch abrasive Nahrungsmittel Nanopartikel aus HAP entstehen und diese kariespräventiv wirken, wurde eine HAP-Suspension als Mundspüllösung untersucht [55]. Laut Hersteller handelt es sich bei der verwendeten Substanz um Nanopartikel aus reinem HAP. Die kleine Partikelgröße ermöglicht nicht nur die Remineralisation erosiv geschädigten Schmelzes [80], sondern auch die Wechselwirkung mit Bakterien [62,138]. Die Spülung mit der Suspension wirkte sich im Spülprotokoll 1 nur gering und im Spülprotokoll 2 gar nicht auf die Bedeckung aus. Das könnte heißen, dass HAP zwar vorhandenen Biofilm teilweise entfernen, aber langfristig die Biofilm-Bildung nicht verhindern kann. In der Literatur wurden diesbezüglich verschiedene Angaben gemacht. In einer Studie von Kensche *et al.* (2017) wurde ebenfalls mit einer 5%igen Suspension gespült. Die einmalige Spülung betrug zwar eine ganze Minute, nach einer anschließenden 8-stündigen Tragedauer erwies sich HAP aber genauso antiadhärent wie CHX [75]. Dieses Ergebnis kann mit dem vorliegenden Versuch nicht bestätigt werden. Das kann daran liegen, dass die Tragedauer mit 8 h vergleichsweise kurz war. In den ersten 8 h besteht der Biofilm nur aus einzelnen Bakterien oder Kolonien. Erst kurze Zeit später nimmt die Bakterienanzahl rapide zu und erreicht nach etwa 2 Tagen ihr Maximum. Danach kommt es bei gleichbleibender Menge zu kontinuierlichen

Anpassungen und Veränderungen [15,131]. Neben der reduzierten Menge ist ein junger Biofilm gegenüber antibakteriellen Substanzen auch weniger resistent als ein älterer Biofilm [96]. Das könnte den Unterschied in der antiadhärenten Wirkung zwischen 8 h und 48 h Tragedauer erklären. An dieser Stelle sei angemerkt, dass in vielen *in-situ*-Studien der Biofilm bereits in den ersten Minuten der Pellikelbildung verschiedenen Substanzen ausgesetzt wird und nicht nochmal kurz vor der *ex-vivo* Untersuchung. Hannig *et al.* (2013) haben ebenfalls eine antiadhärente Wirkung festgestellt. Es wurde einmalig mit Zink-HAP gespült und der Biofilm nach 6 h und 12 h Tragedauer untersucht. Die Bakterienanzahl war hingegen nicht so niedrig wie nach der Spülung mit CHX [57]. Zusammenfassend kann HAP die Biofilm-Bildung auf einer sauberen Zahnoberfläche verzögern. Die antiadhärente Wirkung lässt jedoch schnell nach, sodass HAP die mechanische Mundhygiene nur ergänzen, aber allein nicht ersetzen kann. Die Vitalität konnte in beiden Spülprotokollen nicht gesenkt werden. Die fehlende antibakterielle Wirkung wurde auch in der Literatur angegeben [75]. In den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen waren besonders im Spülprotokoll 1 Ablagerungen von HAP zu erkennen. Sie umhüllten auch teilweise einzelne Bakterien. Die Bindung der Partikel an die Zelloberfläche wurde in der Literatur mit transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigt [75]. Über Bindung und Hemmung bakterieller Adhäsine können sie so zum antiadhärenten Effekt beitragen.

5.10 Spülung mit Chitosan

Die Substanz Chitosan wurde 1859 gefunden und wird seither in vielen Bereichen auch außerhalb der Medizin verwendet [107,111]. Dank vieler kationischer Gruppen kann das Chitosan antibakteriell wirken und an der Zahnhartsubstanz haften [38,122]. Da die antibakterielle Wirkung mit einem höheren DD und MW zunimmt, wurde im vorliegenden Versuch ein hochmolekulares Chitosan mit einem DD von über 92% verwendet [26]. Es kam als saure wässrige 0,5%ige Lösung zum Einsatz. Die praktische Anwendung als Mundspüllösung wird durch die Viskosität begrenzt. Deshalb wurde die Konzentration nicht weiter erhöht. Zwar zeigte die Spülung mit Chitosan einen kleinen sofortigen antiadhärenten Effekt, dafür keinen langanhaltenden Effekt. In der Literatur kommen verschiedene Derivate sowie Verarbeitungen und Applikationsformen von Chitosan zum Einsatz. Deshalb ist der objektive Vergleich der Studien schwierig. In einer klinischen Studie von Bae *et al.* (2006) konnte der Plaque-Index durch Spülung mit einem wasserlöslichen Derivat signifikant reduziert werden. Jedoch war die Wirkung nur halb so stark wie die einer 0,1%igen CHX-Lösung [4]. Neben der geringen antiadhärenten Wirkung war die antibakterielle Wirkung von Chitosan in dem vorliegen-

den Versuch ebenfalls niedrig. In der Literatur hingegen konnten zwei klinische Studien mit wasserlöslichen Derivaten die Vitalität des oralen Biofilms signifikant reduzieren [4,106]. Das liegt vermutlich daran, dass die Probandenzahl höher und die Standardabweichung geringer war sowie ein parametrischer statistischer Test durchgeführt wurde. Trotz Signifikanz war die Reduktion der Vitalität in beiden Studien gering und die klinische Relevanz fragwürdig. Obwohl Chitosan eine hochgelobte Substanz in der Zahnmedizin ist [142], kommt der klinische Einsatz einer sauren wässrigen Lösung von unmodifizierten Chitosan als Anti-Biofilm-Mittel weniger in Betracht. Das könnte daran liegen, dass sowohl der niedrige pH-Wert der Lösung und Chitosan selbst der Pellikel eine positive Ladung verleihen und somit die Anlagerung von weiterem Chitosan verhindern [113,151]. Es sind weitere Studien mit chemisch modifiziertem Chitosan nötig. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Hinzufügen funktioneller Gruppen oder Substituenten sowohl Löslichkeit und antibakterielle Aktivität verbessern kann [118]. Durch Optimierung der Struktur kann der klinische Einsatz als Anti-Biofilm-Mittel vielleicht ermöglicht werden.

5.11 Ausblick

Auf Grundlage der dargestellten Methoden wäre zu klären, inwieweit die Probanden die Zielgruppe der chemischen Biofilm-Kontrolle repräsentieren, insbesondere Personen mit hohem Kariesrisiko. Es ist bekannt, dass der prädominante Phänotyp der Bakterien im kariogenen Biofilm von dem Phänotyp bei Gesunden abweicht [135]. Es besteht Forschungsbedarf hinsichtlich der Resistenz des Biofilms gegenüber Anti-Biofilm-Mitteln bei Personen mit hohem und niedrigem Kariesrisiko.

Die Ergebnisse waren aufgrund der niedrigen Probandenzahl, der hohen Standardabweichung und der Verwendung eines nicht-parametrischen Tests nur in einzelnen Fällen statistisch signifikant. Um die klinische Relevanz mit einer statistischen Signifikanz zu untermauern, könnten Studien mit einer höheren Probandenzahl durchgeführt werden. Um eine ausreichende Anzahl freiwilliger Probanden zu gewinnen, könnte die Anzahl an Spüllösungen reduziert und damit auch der zeitliche Aufwand für die Probanden verringert werden.

In der vorliegenden Studie war die experimentelle Mundspüllösung mit Tanninsäure von allen getesteten Substanzen der antibakteriellen und antiadhärenten Wirkung von CHX am nächsten. Weiterführende Forschungsfragen ließen sich hier anschließen. Der spezielle Wirkmechanismus der Tanninsäure auf kariogene Keime oder den dentalen Biofilm wurde nicht abschließend geklärt. Obwohl die Wirkung der Polyphenole in der Literatur hinreichend unter-

sucht wurde, kann der spezielle Wirkmechanismus der Tanninsäure davon abweichen. Im Einzelnen könnte die chelatisierende Wirkung der Tanninsäure, die Anlagerung und Lokalisation der Tanninsäure im Biofilm mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie, die durch Tanninsäure induzierte Lyse von Zellen sowie die zellulären Reaktionen der Bakterien auf Protein-Ebene untersucht werden.

5.12 Schlussfolgerungen

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Wirkung verschiedener experimenteller Mundspüllösungen auf die intraorale Biofilm-Bildung zu untersuchen. Die antibakterielle und antiadhärente Wirkung der Mundspüllösungen wurde im Vergleich zu der Negativkontrolle Wasser sowie Positivkontrolle und Goldstandard CHX eingeordnet [77]. Die klinische Relevanz wurde primär deskriptiv beurteilt, da verschiedene Faktoren eine statistische Signifikanz erschweren. Zusammenfassend hat die Spülung mit Tanninsäure selbst bei neutralem pH-Wert eine antibakterielle und antiadhärente Wirkung sowohl kurzfristig als auch langanhaltend gezeigt, die der Wirkung von CHX nahekommt. Mit Ausnahme der Verfärbungen weist die Verwendung von Tanninsäure keine weitere Nebenwirkung von CHX auf und ist damit eine potentielle Alternative in der chemischen Biofilm-Kontrolle [41,94,104]. Dagegen ergab die Spülung mit HAP einen geringfügigen antiadhärenten Effekt und die Spülung mit Chitosan zusätzlich einen antibakteriellen Effekt, wobei keine der beiden Mundspüllösungen eine langanhaltende Wirkung zeigte und damit unter den gewählten Versuchsbedingungen die Biofilm-Bildung nicht nachhaltig beeinflussen konnte.

6 Literaturverzeichnis

1. Akiyama H, Fujii K, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K (2001) Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 48:487–491
2. Allison DG (2003) The Biofilm Matrix. *Biofouling* 19:139–150
3. Arweiler NB, Hellwig E, Sculean A, Hein N, Auschill TM (2004) Individual Vitality Pattern of in situ Dental Biofilms at Different Locations in the Oral Cavity. *Caries Res* 38:442–447
4. Bae K, Jun EJ, Lee SM, Paik DI, Kim JB (2006) Effect of water-soluble reduced chitosan on *Streptococcus mutans*, plaque regrowth and biofilm vitality. *Clin Oral Investig* 10:102
5. Banfield N, Addy M (2004) Dentine hypersensitivity: development and evaluation of a model in situ to study tubule patency. *J Clin Periodontol* 31:325–335
6. Bergmans L, Moisiadis P, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P (2005) Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM. *Int Endod J* 38:775–788
7. Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann H-U, Egli T (2007) Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry. *Appl Environ Microbiol* 73:3283
8. Biazevic MGH, Rissotto RR, Michel-Crosato E, Mendes LA, Mendes MOA (2008) Relationship between oral health and its impact on quality of life among adolescents. *Braz Oral Res* 22:36–42
9. Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R (1999) LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods* 37:77–86
10. Braconnot MH (1811) Chemical analysis of the green shell of the walnut. *Philos Mag* 38:447–451
11. Brading MG, Marsh PD (2003) The oral environment: the challenge for antimicrobials in oral care products. *Int Dent J* 53:353–362

12. Bradshaw D, Homer K, Marsh P, Beighton D (1994) Metabolic cooperation in oral microbial communities during growth on mucin. *Microbiology* 140:3407–3412
13. Bradshaw DJ, McKee AS, Marsh PD (1989) Effects of Carbohydrate Pulses and pH on Population Shifts within Oral Microbial Communities in vitro. *J Dent Res* 68:1298–1302
14. Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C (1998) Role of *Fusobacterium nucleatum* and Coaggregation in Anaerobe Survival in Planktonic and Biofilm Oral Microbial Communities during Aeration. *Infect Immun* 66:4729
15. Brex M, Theilade J, Attström R (1983) An ultrastructural quantitative study of the significance of microbial multiplication during early dental plaque growth. *J Periodontal Res* 18:177–186
16. Brex M, Theilade J (1984) Effect of chlorhexidine rinses on the morphology of early dental plaque formed on plastic film. *J Clin Periodontol* 11:553–564
17. Brex M, Theilade J, Attström R, Glantz P-O (1987) The effect of chlorhexidine and Octapinol® on early human plaque formation. A light and electron microscopic study. *J Periodontal Res* 22:290–295
18. Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3:238–250
19. Busscher HJ, Van Der Mei HC (1997) Physico-Chemical Interactions in Initial Microbial Adhesion and Relevance for Biofilm Formation. *Adv Dent Res* 11:24–32
20. Busscher HJ, Engels E, Dijkstra RJB, Van Der Mei HC (2008) Influence of a chitosan on oral bacterial adhesion and growth in vitro. *Eur J Oral Sci* 116:493–495
21. Chaberek S, Bersworth FC, Martell AE (1955) Chelating agents as metal buffers in biological systems. I. Principles and use of ethylenediaminetetraacetic acid. *Arch Biochem Biophys* 55:321–337
22. Chung K-T, Jr SES, Lin W-F, Wei CI (1993) Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds. *Lett Appl Microbiol* 17:29–32
23. Chung K-T, Wong TY, Wei C-I, Huang Y-W, Lin Y (1998) Tannins and Human Health: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 38:421–464

24. Cravens JE (1876) Treatment of Exposed Pulps by Lacto Phosphate of Lime. *Am J Dent Sci* 10:274
25. Crowley MC, Rickert UG (1937) Effect of Certain Mouthwashes on the Number of Oral Bacteria. *J Dent Res* 16:531–535
26. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E (2011) Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Spec Issue Biomater* 36:981–1014
27. Davies D (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2:114–122
28. De Carvalho M, Stamford TCM, Pereira E, Dos Santos P, Sampaio F (2011) Chitosan as an oral antimicrobial agent. *Formatex* 2012:13
29. Decker E-M (2001) The ability of direct fluorescence-based, two-colour assays to detect different physiological states of oral streptococci. *Lett Appl Microbiol* 33:188–192
30. del Carpio-Perochena A, Bramante CM, Duarte MAH, de Moura MR, Aouada FA, Kishen A (2015) Chelating and antibacterial properties of chitosan nanoparticles on dentin. *Restor Dent Endod* 40:195–201
31. Dorozhkin SV (2013) Calcium orthophosphates in dentistry. *J Mater Sci Mater Med* 24:1335–1363
32. Eccles JD (1979) Dental erosion of nonindustrial origin. A clinical survey and classification. *J Prosthet Dent* 42:649–653
33. Epstein JB, Villines DC, Baker S (2018) Efficacy of a glycopolymer-based oral rinse upon pain associated with ulcerative and erosive lesions of the oral mucosa: A within-subject pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 126:240–245
34. Eriksen HM, Nordboe H (1978) Extrinsic discoloration of teeth. *J Clin Periodontol* 5:229–236
35. Erlandsen SL, Kristich CJ, Dunny GM, Wells CL (2004) High-resolution Visualization of the Microbial Glycocalyx with Low-voltage Scanning Electron Microscopy: Dependence on Cationic Dyes. *J Histochem Cytochem* 52:1427–1435

36. Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A (2007) G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 39:175–191
37. Featherstone J (2008) Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J* 53:286–291
38. Fei Liu X, Lin Guan Y, Zhi Yang D, Li Z, De Yao K (2001) Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J Appl Polym Sci* 79:1324–1335
39. Feng J, Cheng L, Zhou X, Xu HHK, Weir MD, Meyer M, Maurer H, Li Q, Hannig M, Rupf S (2015) In situ antibiofilm effect of glass-ionomer cement containing dimethylaminododecyl methacrylate. *Dent Mater* 31:992–1002
40. Fischman SL (1997) The history of oral hygiene products: how far have we come in 6000 years? *Periodontol* 2000 15:7–14
41. Flötra L, Gjermo P, Rölla G, Waerhaug J (1971) Side effects of chlorhexidine mouth washes. *Eur J Oral Sci* 79:119–125
42. Ganss C, Lussi A, Grunau O, Klimek J, Schlueter N (2011) Conventional and Anti-Erosion Fluoride Toothpastes: Effect on Enamel Erosion and Erosion-Abrasion. *Caries Res* 45:581–589
43. Ganss C, von Hinckeldey J, Tolle A, Schulze K, Klimek J, Schlueter N (2012) Efficacy of the stannous ion and a biopolymer in toothpastes on enamel erosion/abrasion. *J Dent* 40:1036–1043
44. Gasol JM, Del Giorgio PA (2000) Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Sci Mar* 64:197–224
45. Giertsen E, Guggenheim B, Thurnheer T, Gmür 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
46. Guggenheim B, Giertsen E, Schüpbach P, Shapiro S (2001) Validation of an in vitro Biofilm Model of Supragingival Plaque. *J Dent Res* 80:363–370
47. Gülçin İ, Huyut Z, Elmastaş M, Aboul-Enein HY (2010) Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arab J Chem* 3:43–53

48. Gunsolley JC (2010) Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. Role Dly Use Mouthrinses Maint Oral Health 38:6–10
49. Güth-Thiel S, Kraus-Kuleszka I, Mantz H, Hoth-Hannig W, Hähl H, Dudek J, Jacobs K, Hannig M (2019) Comprehensive measurements of salivary pellicle thickness formed at different intraoral sites on Si wafers and bovine enamel. Colloids Surf B Biointerfaces 174:246–251
50. Hannig C, Hannig M, Attin T (2005) Enzymes in the acquired enamel pellicle. Eur J Oral Sci 113:2–13
51. 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
52. Hannig C, Spitzmüller B, Al-Ahmad A, Hannig M (2008) Effects of Cistus-tea on bacterial colonization and enzyme activities of the in situ pellicle. J Dent 36:540–545
53. Hannig C, Hannig M (2009) The oral cavity - a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. Clin Oral Investig 13:123–139
54. Hannig C, Sorg J, Spitzmüller B, Hannig M, Al-Ahmad A (2009) Polyphenolic beverages reduce initial bacterial adherence to enamel in situ. J Dent 37:560–566
55. Hannig C, Hannig M (2010) Natural enamel wear – A physiological source of hydroxylapatite nanoparticles for biofilm management and tooth repair? Med Hypotheses 74:670–672
56. Hannig C, Kirsch J, Al-Ahmad A, Kensche A, Hannig M, Kümmerer K (2013) Do edible oils reduce bacterial colonization of enamel in situ? Clin Oral Investig 17:649–658
57. Hannig C, Basche S, Burghardt T, Al-Ahmad A, Hannig M (2013) Influence of a mouthwash containing hydroxyapatite microclusters on bacterial adherence in situ. Clin Oral Investig 17:805–814
58. Hannig M (1997) Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. Eur J Oral Sci 105:422–433
59. Hannig M, Balz M (1999) Influence of in vivo Formed Salivary Pellicle on Enamel Erosion. Caries Res 33:372–379

60. Hannig M, Fiebiger M, Güntzer M, Döbert A, Zimehl R, Nekrashevych Y (2004) Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. *Arch Oral Biol* 49:903–910
61. Hannig M, Joiner A (2006) The Structure, Function and Properties of the Acquired Pellicle. In: *The teeth and their environment. Monogr Oral Sci* 19:29-64
62. Hannig M, Hannig C (2010) Nanomaterials in preventive dentistry. *Nat Nanotechnol* 5:565–569
63. Hartmann M, Berditsch M, Hawecker J, Ardakani MF, Gerthsen D, Ulrich AS (2010) Damage of the Bacterial Cell Envelope by Antimicrobial Peptides Gramicidin S and PGLa as Revealed by Transmission and Scanning Electron Microscopy. *Antimicrob Agents Chemother* 54:3132
64. Haslam E (1996) Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. *J Nat Prod* 59:205–215
65. Hertel S, Pötschke S, Basche S, Delius J, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C (2017) Effect of Tannic Acid on the Protective Properties of the in situ Formed Pellicle. *Caries Res* 51:34–45
66. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N (2009) Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. *J Dent Res* 88:982–990
67. Jenkins S, Addy M, Wade W (1988) The mechanism of action of chlorhexidine. *J Clin Periodontol* 15:415–424
68. Jenkinson HF, Lamont R (1997) Streptococcal Adhesion and Colonization. *Crit Rev Oral Biol Med* 8:175–200
69. Jeong S, Jang S, Kim KN, Kwon H, Park YD, Kim B (2006) Remineralization potential of new toothpaste containing nano-hydroxyapatite. *Trans Tech Publ* 309:537-540
70. 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
71. Jones CG (1997) Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol* 2000 15:55–62

72. Kani M (1994) Cariostatic effect of hydroxyapatite-containing dentifrices. *J Dent Med* 39:809–822
73. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, Murray CJL, Marcenes W (2017) Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990–2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J Dent Res* 96:380–387
74. Kean T, Thanou M (2010) Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Chitosan-Based Formul Drugs Imaging Agents Biotherapeutics* 62:3–11
75. Kensche A, Holder C, Basche S, Tahan N, Hannig C, Hannig M (2017) Efficacy of a mouthrinse based on hydroxyapatite to reduce initial bacterial colonisation in situ. *Arch Oral Biol* 80:18–26
76. Körstgens V, Flemming H-C, Wingender J, Borchard W (2001) Uniaxial compression measurement device for investigation of the mechanical stability of biofilms. *J Microbiol Methods* 46:9–17
77. Kour K, Kaur S, Singh P (2019) Comparative evaluation of the efficacy of Chlorohexidine mouthwash as a supplement to regular tooth brushing. *Int J Oral Health Dent* 5:97–103
78. Lagerlöf F (1994) Caries-Protective Factors in Saliva. *Adv Dent Res* 8:229–238
79. Leme AFP, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA (2006) The Role of Sucrose in Cariogenic Dental Biofilm Formation - New Insight. *J Dent Res* 85:878–887
80. Li L, Pan H, Tao J, Xu X, Mao C, Gu X, Tang R (2008) Repair of enamel by using hydroxyapatite nanoparticles as the building blocks. *J Mater Chem* 18:4079–4084
81. Li X, Wang J, Joiner A, Chang J (2014) The remineralisation of enamel: a review of the literature. *Enamel Eros – Adv Miner Technol* 42:12–20
82. Lie T (1977) Early dental plaque morphogenesis. *J Periodontal Res* 12:73–89
83. Lindhe J, Lang NP, Karring T (eds) (2008) *Clinical periodontology and implant dentistry* 2:737-754. Blackwell Munksgaard: Oxford, United Kingdom

84. Loe H, Rindom Schiøtt C (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
85. Loe H (2000) Oral hygiene in the prevention of caries and periodontal disease. *Int Dent J* 50:129–139
86. Low IM, Duraman N, Mahmood U (2008) Mapping the structure, composition and mechanical properties of human teeth. *Mater Sci Eng C* 28:243–247
87. Mangus DJ, Morgan LR, Gilchrist D (1977) The use of topical solutions in antibacterial burn wound therapy. *Burns* 3:257–260
88. Marrie TJ, Costerton JW (1984) Scanning and transmission electron microscopy of in situ bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters. *J Clin Microbiol* 19:687
89. Marsh PD (2000) Role of the Oral Microflora in Health. *Microb Ecol Health Dis* 12:130–137
90. Marsh PD (2003) Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 149:279–294
91. Marsh PD (2004) Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Res* 38:204–211
92. Marsh PD (2010) Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *J Dent* 38:11–15
93. Martínez-Hernández M, Reda B, Hannig M (2020) Chlorhexidine rinsing inhibits biofilm formation and causes biofilm disruption on dental enamel in situ. *Clin Oral Investig* 1–11
94. Mathur S, Mathur T, Srivastava R, Khatri R (2011) Chlorhexidine: The gold standard in chemical plaque control. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol* 1:45
95. Mila I, Scalbert A, Expert D (1996) Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and rots. *Phytochemistry* 42:1551–1555
96. Millward T, Wilson M (1989) The effect of chlorhexidine on *Streptococcus sanguis* biofilms. *Microbios* 58:155
97. Mohire NC, Yadav AV (2010) Chitosan-based polyherbal toothpaste: as novel oral hygiene product. *Indian J Dent Res* 21:380

98. Mukhtar H, Das M, Khan WA, Wang ZY, Bik DP, Bickers DR (1988) Exceptional activity of tannic acid among naturally occurring plant phenols in protecting against 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-, benzo (a) pyrene-, 3-methylcholanthrene-, and N-methyl-N-nitrosourea-induced skin tumorigenesis in mice. *Cancer Res* 48:2361–2365
99. Neilands J, Sutherland D, Resin A, Wejse PL, Chávez de Paz LE (2011) Chitosan Nanoparticles Affect the Acid Tolerance Response in Adhered Cells of *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 45:501–505
100. Netuschil L, Reich E, Unteregger G, Sculean A, Brex M (1998) A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. *Arch Oral Biol* 43:277–285
101. Niessen LC, Weyant RJ (1989) Causes of Tooth Loss in a Veteran Population. *J Public Health Dent* 49:19–23
102. Nikiforuk G, Sreebny L (1953) Demineralization of Hard Tissues by Organic Chelating Agents at Neutral pH. *J Dent Res* 32:859–867
103. Niwa M, Sato T, Li W, Aoki H, Aoki H, Daisaku T (2001) Polishing and whitening properties of toothpaste containing hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med* 12:277–281
104. Nordboe H (1977) Discoloration of dental pellicle by tannic acid. *Acta Odontol Scand* 35:305–310
105. Osso D, Kanani N (2013) Antiseptic mouth rinses: an update on comparative effectiveness, risks and recommendations. *Am Dent Hyg Assoc* 87:10–18
106. Pasquantonio G, Greco C, Prenna M, Ripa C, Vitali LA, Petrelli D, Di Luca MC, Ripa S (2008) Antibacterial Activity and Anti-Biofilm Effect of Chitosan against Strains of *Streptococcus Mutans* Isolated in Dental Plaque. *Int J Immunopathol Pharmacol* 21:993–997
107. Periyah MH, Halim AS, Saad AZM (2016) Chitosan: A promising marine polysaccharide for biomedical research. *Pharmacogn Rev* 10:39
108. Petti S, Scully C (2009) Polyphenols, oral health and disease: A review. *J Dent* 37:413–423

109. Radafshar G, Ghotbizadeh M, Saadat F, Mirfarhadi N (2017) Effects of green tea (*Camellia sinensis*) mouthwash containing 1% tannin on dental plaque and chronic gingivitis: a double-blinded, randomized, controlled trial. *J Investig Clin Dent* 8:12184
110. Rammelburg G (1931) Chitin from fungi and from crab shells. *Bot Arch* 32:1
111. Ravi Kumar MNV (2000) A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym* 46:1–27
112. Reda B, Hollemeyer K, Trautmann S, Hannig M, Volmer DA (2020) Determination of chlorhexidine retention in different oral sites using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Arch Oral Biol* 110:104623
113. Rehage M, Delius J, Hofmann T, Hannig M (2017) Oral astringent stimuli alter the enamel pellicle's ultrastructure as revealed by electron microscopy. *J Dent* 63:21–29
114. Reynolds E (2008) Calcium phosphate-based remineralization systems: scientific evidence? *Aust Dent J* 53:268–273
115. Reynolds EC, Cai F, Shen P, Walker GD (2003) Retention in Plaque and Remineralization of Enamel Lesions by Various Forms of Calcium in a Mouthrinse or Sugar-free Chewing Gum. *J Dent Res* 82:206–211
116. Rindom Schiøtt C, Løe H, Børglum Jensen S, Kilian M, Davies RM, Glavind K (1970) The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human oral flora. *J Periodontal Res* 5:84–89
117. Rölla G, Melsen B (1975) On the Mechanism of the Plaque Inhibition by Chlorhexidine. *J Dent Res* 54:57–62
118. Sahariah P, Másson M (2017) Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure–Activity Relationship. *Biomacromolecules* 18:3846–3868
119. Sano H, Shibasaki K-I, Matsukubo T, Takaesu Y (2003) Effect of chitosan rinsing on reduction of dental plaque formation. *Bull Tokyo Dent Coll* 44:9–16
120. Scalbert A (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30:3875–3883
121. Schestakow A, Hannig M (2020) Effects of Experimental Agents Containing Tannic Acid or Chitosan on the Bacterial Biofilm Formation in Situ. *Biomolecules* 10:1315
122. Schlueter N, Klimek J, Ganss C (2013) Randomised in situ Study on the Efficacy of a Tin/Chitosan Toothpaste on Erosive-Abrasive Enamel Loss. *Caries Res* 47:574–581

123. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675
124. Schneyer LH, Pigman W, Hanahan L, Gilmore RW (1956) Rate of Flow of Human Parotid, Sublingual, and Submaxillary Secretions During Sleep. *J Dent Res* 35:109–114
125. Schött G, Liesegang S, Gaunitz F, Gleß A, Basche S, Hannig C, Speer K (2017) The chemical composition of the pharmacologically active Thymus species, its antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and the antiadherent effects of *T. vulgaris* on the bacterial colonization of the in situ pellicle. *Fitoterapia* 121:118–128
126. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB (2007) Dental caries. *The Lancet* 369:51–59
127. Shani S, Friedman M, Steinberg D (2000) The Anticariogenic Effect of Amine Fluorides on *Streptococcus sobrinus* and Glucosyltransferase in Biofilms. *Caries Res* 34:260–267
128. Sheiham A (2006) Dental caries affects body weight, growth and quality of life in pre-school children. *Br Dent J* 201:625–626
129. Silverman S Jr, Wilder R (2006) Antimicrobial mouthrinse as part of a comprehensive oral care regimen: Safety and compliance factors. *J Am Dent Assoc* 137:22–26
130. Smith JJ, Wayman BE (1986) An evaluation of the antimicrobial effectiveness of citric acid as a root canal irrigant. *J Endod* 12:54–58
131. Socransky SS, Manganiello AD, Propas D, Oram V, Van Houte J (1977) Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *J Periodontal Res* 12:90–106
132. Surman SB, Walker JT, Goddard DT, Morton LHG, Keevil CW, Weaver W, Skinner A, Hanson K, Caldwell D, Kurtz J (1996) Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. *J Microbiol Methods* 25:57–70
133. Sutherland IW (2001) The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9:222–227
134. Takahashi N, Yamada T (1999) Acid-induced acid tolerance and acidogenicity of non-mutans streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 14:43–48
135. Takahashi N, Nyvad B (2008) Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process. *Caries Res* 42:409–418

136. Tawakoli P, 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. Van Der Mei HC, Engels E, De Vries J, Dijkstra RJB, Busscher HJ (2007) Chitosan adsorption to salivary pellicles. *Eur J Oral Sci* 115:303–307
138. Venegas SC, Palacios JM, Apella MC, Morando PJ, Blesa MA (2006) Calcium Modulates Interactions between Bacteria and Hydroxyapatite. *J Dent Res* 85:1124–1128
139. Vitkov L, Hermann A, Krautgartner WD, Herrmann M, Fuchs K, Klappacher M, Hannig M (2005) Chlorhexidine-induced ultrastructural alterations in oral biofilm. *Microsc Res Tech* 68:85–89
140. Wellek S, Blettner M (2012) Vom richtigen Umgang mit dem Crossover-Design in klinischen Studien. *Dtsch Aerzteblatt Int* 109
141. West NX, Davies M, Amaechi BT (2011) In vitro and in situ Erosion Models for Evaluating Tooth Substance Loss. *Caries Res* 45:43–52
142. Wieckiewicz M, W Boening K, Grychowska N, Paradowska-Stolarz A (2017) Clinical application of chitosan in dental specialities. *Mini Rev Med Chem* 17:401–409
143. Wimpenny JWT, Colasanti R (1997) A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. *FEMS Microbiol Ecol* 22:1–16
144. Wittpahl G, Koelling-Speer I, Basche S, Herrmann E, Hannig M, Speer K, Hannig C (2015) The polyphenolic composition of *Cistus incanus* herbal tea and its antibacterial and anti-adherent activity against *Streptococcus mutans*. *Planta Med* 81:1727–1735
145. Wood S, Kirkham J, Marsh P, Shore R, Nattress B, Robinson C (2000) Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res* 79:21–27
146. Wu-Yuan CD, Chen CY, Wu RT (1988) Gallotannins Inhibit Growth, Water-insoluble Glucan Synthesis, and Aggregation of Mutans Streptococci. *J Dent Res* 67:51–55
147. Xie W, Xu P, Wang W, Liu Q (2002) Preparation and antibacterial activity of a water-soluble chitosan derivative. *Carbohydr Polym* 50:35–40
148. Yassen GH, Platt JA, Hara AT (2011) Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J Oral Sci* 53:273–282

149. Zaura E, Ten Cate J (2004) Dental plaque as a biofilm: a pilot study of the effects of nutrients on plaque pH and dentin demineralization. *Caries Res* 38:9–15
150. Zhang X, Bishop PL, Kupferle MJ (1998) Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Sci Technol* 37:345–348
151. Zimmermann R, Delius J, Friedrichs J, Stehl S, Hofmann T, Hannig C, Rehage M, Werner C, Hannig M (2019) Impact of oral astringent stimuli on surface charge and morphology of the protein-rich pellicle at the tooth–saliva interphase. *Colloids Surf B Biointerfaces* 174:451–458

7 Publikation / Danksagung

7.1 Publikation

Schestakow A, Hannig M (2020) Effects of Experimental Agents Containing Tannic Acid or Chitosan on the Bacterial Biofilm Formation in Situ. *Biomolecules* 10:1315

7.2 Danksagung

Das Thema „Einfluss experimenteller Mundspüllösungen auf die bakterielle Biofilm-Bildung *in-situ*“ ist nicht nur spannend, es hat mich auch durch die umfangreiche Methodik mit verschiedenen Untersuchungsmöglichkeiten vertraut gemacht. Daher bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Matthias Hannig für das Überlassen des Themas. Vor allem bedanke ich mich für die gute Betreuung, die regelmäßigen Besprechungen sowie der zeitaufwendigen Unterstützung bei der Publikation der Arbeit. PD Dr. Johanna Dudek, Dr. Nazife Yazdani und Norbert Pütz danke ich für die Unterweisung in die Methodik, mit der mir selbstständiges Arbeiten ermöglicht wurde. Ich danke besonders Bashar Reda, der auch außerhalb seiner Arbeitszeit in Krisensituationen telefonisch zu Rat stand, mir die Verwendung der Softwares erklärte und mir einschlägige Literatur zur Statistik übergeben hatte. Da die Arbeit ihren Anfang mit der Herstellung der Schienen genommen hatte, möchte ich mich hiermit bei Bettina Neissius-Paul für ihre Hilfe bedanken. Die Studie wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, SFB 1027) finanziert, wofür ich meinen herzlichen Dank aussprechen möchte. Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Probanden für ihren selbstlosen Einsatz, für ihren Kommilitonen mehrmals aufs Zähneputzen zu verzichten, bedanken.

8 Anhang

8.1 Materialliste


Prüfsubstanzen	
Steriles Wasser	Ampuwa®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Salzsäure	Hydrochloric acid fuming 37%, Emsure®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tanninsäure	Tannic Acid, Sigma®, Saint Louis, USA
Hydroxylapatit	Kalident Powder 100, Brescia, Italien
Chitosan	Chitosan 95/3000, Heppe Medical Chitosan GmbH, Halle, Deutschland,
Chlorhexidin	Chlorhexidin 0,2 %-digluconat Lösung, Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg, Deutschland
Geräte	
Tiefziehgerät	Erkopress ES 2004, Erkodent GmbH, Pfalzgrafenweiler, Deutschland
Schleifmaschine	Phoenix 3000, Buehler, Düsseldorf, Deutschland
Trennschleifmaschine	WOCO 50 P, Conrad GmbH, Clausthal, Deutschland
Lichtmikroskop	Stereo Zoom Mikroskop SMZ-140, Motic GmbH, Wetzlar, Deutschland
Ultraschallgerät	Sonorex Super RK 100 H, Bandelin, Berlin, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager.M2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Kamera	AxioCam MRm, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Wipp-Tisch	Rocky®, Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop	XL 30 ESEM FEG, FEI Company, Eindhoven, Niederlande
Gerät zum Sputtern	Sputter Coater SCD 040, Oerlikon Balzers Coating Germany GmbH, Bingen, Deutschland

Chemikalien	
Thymol	Thymollösung 0,1 %, Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg, Deutschland
Natriumhypochlorit	Natriumhypochlorit-Lösung 3 % DAC, Hedinger, Stuttgart, Deutschland
Isopropylalkohol	Isopropylalkohol 70%, Hedinger, Stuttgart, Deutschland
Glutaraldehyd	Glutaraldehyd, 50 %-Lösung in Wasser, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Hexamethyldisilazan	Hexamethyldisilazane 98+%, Thermo Fisher GmbH, Kandel, Deutschland
Cacodylat	Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
LIVE/DEAD Kit	LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit L7012, Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Natriumchlorid	NaCl 0,9% Spüllösung, 1000 ml Plastipur®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Bidestilliertes Wasser	Destilliertes Wasser, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Vergälltes Ethanol	Ethanol \geq 99,8 %, vergällt, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Reines Ethanol	Ethanol \geq 99,5%, Ph. Eur., reinst, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge	Natriumhydroxid Plätzchen zur Analyse EMSURE® ISO, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Essigsäure (Eisessig) 100% wasserfrei zur Analyse EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Hilfsmaterialien	
Alginat	Alginat Blueprint, Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Deutschland
Superhartgips IV	Die-Stone, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland
Tiefziehfolie	DURAN®, Scheu Dental GmbH, Iserlohn, Deutschland
SiC Schleifpapier	CarbiMet™, Buehler, Illinois, USA
Silikon	President light body, Coltène/Whaledent GmbH + Co.KG, Langenau, Deutschland
Aluminium Stummel	SEM Specimen Stubs – Short Pin, Agar Scientific Ltd, Essex, England
Klebefolie	Leit-Tabs, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Putty Material	Optosil® Comfort® Putty, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Kohlefaden	Hochreine Kohlefäden für Kohlebedampfung Klasse CT4, Micro to Nano, Haarlem, Niederlande
Software	
AxioVision SE64 Rel. 4.9	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
ImageJ 1.52	NIH, Bethesda, Maryland, USA
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA
GPower	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Deutschland

8.2 Datenblätter

8.2.1 Tanninsäure



SIGMA-ALDRICH

3050 Spruce Street
 Saint Louis, Missouri 63103 USA
 Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765
 Fax (314) 286-7828
 email: techserv@sial.com
 sigma-aldrich.com

Product Information

Tannic acid

Product Number **T 0125**
 Store at Room Temperature

Product Description
 CAS Number: 1401-55-4
 Melting Point: 210-215 °C¹
 Synonym: tannin¹

Product Description
 The product is a fine yellow powder with a faint characteristic color, which darkens on exposure to air and light. Chemically, it is a penta-m-digalloyl-glucose, which has a high molecular weight. This product is a hydrolyzable tannin obtained from oak gall nuts (also known as galls) from *Quercus infectoria*. Galls are tumors formed by fungi, insects or bacteria on oak trees and are a rich source of tannic acid. Upon hydrolysis with sulfuric acid, this product is converted to gallic acid and glucose.

This product has the following typical composition: tannin, 90.0%; soluble non-tannin, 5.0%; insolubles, none; loss on drying 5.0%; ash content, less than 0.1%. The pH of a 0.4% solution is approximately 3. By HPLC, the isomer composition is typically: Gallic acid, monogalloyl glucose, digalloyl glucose, trigalloyl glucose, tetragalloyl glucose, pentagalloyl glucose, ESA galloyl glucose, EPTA galloyl glucose, and octagalloyl glucose (probably 6, 7, and 8 galloyl glucose products, respectively, for the latter three). Higher molecular weight isomers were not detected.

This product forms insoluble complexes with proteins.² Insoluble precipitates are formed with albumin, gelatin, most alkaloids, and heavy metal salts. Tannic acid is incompatible with lime water and oxidizing substances such as permanganates and chlorates. In the presence of ferric salts, a bluish black precipitate is produced.

This product is used as a secondary fixative mixture with aldehydes for biological tissues, and also as a stain.³ Specimens treated with tannic acid show increased contrast and more delineation of cell membranes.^{4,5} It is also used in electron microscopy applications.^{3,6}

Precautions and Disclaimer
 For Laboratory Use Only. Not for drug, household or other uses.

Preparation Instructions
 This product is soluble in ethanol (100 mg/ml), yielding a clear, yellow to brown solution. This product is also soluble in water (2.8 g/ml), warm glycerol (1 mg/ml), and acetone.¹ It is practically insoluble in benzene, chloroform, ether, petroleum ether, carbon disulfide, and carbon tetrachloride. Solutions should be sealed tightly and protected from light. Solutions will gradually darken on exposure to air and light.

References

1. The Merck Index, 11th Ed., Entry# 9023.
2. Aoki, K., et al., Tannic acid staining and extraction of enzymes in polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **95**, 575-578 (1979).
3. Simionescu, N., and Simionescu, M., Galloylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy. I. Procedure, and evidence for mordanting effect. *J. Cell Biol.*, **70**, 608-621 (1976).
4. Takagi, M., et al., Ultrastructural visualization of complex carbohydrates in epiphyseal cartilage with the tannic acid-metal salt methods. *J. Histochem. Cytochem.*, **31**, 783-790 (1983).

8.2.2 Hydroxylapatit



KALIDENT-Calcium Hydroxyapatite

GENERAL DESCRIPTION

KALIDENT-Calcium Hydroxyapatite is based on a formulation designed to significantly enhance the natural salivary remineralisation of dental enamel.

Each day dental enamel is demineralised by acids present in the mouth and remineralised by the calcium and phosphate ions carried in saliva. Under normal circumstances the dynamic balance between demineralisation and remineralisation is stable. This equilibrium results in healthy teeth which are not affected by caries, and are not eroded, decalcified or hyper-sensitive.

Poor oral hygiene, wrong dietary habits, excess consumption of carbonated beverages, occupational hazards can all increase the rate of demineralisation. The dynamic balance ions-salt can also be adversely affected by reductions in the salivary flow resulting from the normal ageing process, the use of many common drugs, the fitting of orthodontic appliances, dehydration through occupational or recreational activities and the radiotherapy and surgical interventions connected to some diseases.

Saliva is normally super-saturated in calcium and phosphate ions (i.e. saliva carries the maximum possible amount of them) hence it was not possible to increase its ions concentration in order to compensate for the loss of tooth enamel caused by any of the above circumstances. The problem of carrying high concentrations of calcium and phosphate ions directly to the tooth surface could not be solved in this way .


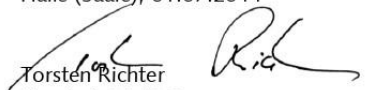
The regular use of KALIDENT-Calcium Hydroxyapatite over an extended period can do much to alleviate problems caused by excessive demineralisation of dental enamel. The use of KALIDENT-Calcium Hydroxyapatite helps preventing caries or to stabilise rampant caries, counteracting the consequences of poor oral hygiene, acid foods and carbonated drinks. It can help prevent the dental consequences of xerostomia or Sjogren's syndrome. It can even assist in the reversal of dental erosion and its adverse consequences.

KALIDENT-Calcium Hydroxyapatite is a good alternative to those patients unwilling to use fluorides as part of their dental care regime.

Sede legale: Via San Bartolomeo 9- 25128 BRESCIA
Sede operativa: Via Pastore 1 - 25082 Botticino Sera (Brescia) Italia
Tel. 0302693532 – Fax. 0302193581
Sito Internet: www.kalichem.it – e.mail: kalichem@kalichem.it



8.2.3 Chitosan

		<p>HEPPE MEDICAL CHITOSAN GmbH CEO: Dipl. Biotechnol. Katja Richter</p> <p>Heinrich-Damerow-Straße 1 D-06120 Halle (Saale) Tel: +49 (0) 345 27 996 300 Fax: +49 (0) 345 27 996 378 info@medical-chitosan.com www.medical-chitosan.com</p> <p>HypoVereinsbank Halle (Saale) Account: 356 864 832 BLZ: 800 200 86 SWIFT: HYVE DE MM 440 IBAN: DE33 8002 0086 0356 8648 32</p> <p>Volksbank Halle (Saale) eG Account: 0001 160 966 BLZ: 800 937 84 SWIFT: GENO DE F1 HAL IBAN: DE83 8009 3784 0001 1609 66</p> <p>VAT.ID: DE 249 728 508 Amtsgericht Stendal HRB 5561</p>
Product Specification Sheet		
<p>Product line:</p> <p>Product: CAS: Product No.: Storage conditions: Shelf life: Valid from:</p>	<p>Chitoscience</p> <p>Chitosan 95/3000 9012-76-4 23711 < 25 °C, dry and well closed 36 months 01.07.2011</p>	
Parameter	Method	Specification
Appearance of solid product	HMC QK-PA-0001	white to light yellow
Appearance of solution	HMC QK-PA-0002	clear, colorless to slightly yellowish
Degree of deacetylation	HMC QK-PA-0003	≥ 92.6 %
Viscosity (1 % in 1 % acetic acid, 20 °C)	HMC QK-PA-0004	2751 - 3250 mPas
Ashes (sulphated)	HMC QK-PA-0005	≤ 1 %
Dry matter content	HMC QK-PA-0006	≥ 85 %
Heavy metals		
Hg	HMC QK-PA-0020	≤ 0.2 ppm
Cd	HMC QK-PA-0020	≤ 0.5 ppm
Halle (Saale), 01.07.2011  Torsten Richter Head of QA/QC		
		Page: 1/1 Rev: 02

8.3 Ergebnisse Datensatz

8.3.1 Bedeckung

Bedeckung								
Spülprotokoll 1								
	Wasser	HCl	TS 2,5	TS 7	HAP	Chitosan	CHX	
Proband 1	81,96	65,04	9,22	2,77	17,12	35,64	10,84	
Proband 2	17,82	62,58	2,56	0,00	11,75	15,02	0,08	
Proband 3	30,66	67,03	1,89	3,32	14,61	9,60	1,22	
Proband 4	94,26	29,84	15,34	21,52	56,05	51,60	0,54	
Proband 5	80,64	37,00	12,70	0,29	56,85	68,94	1,50	
Proband 6	26,92	22,01	24,21	0,03	31,40	33,73	0,69	
Maximum	94,26	67,03	24,21	21,52	56,85	68,94	10,84	
Minimum	17,82	22,01	1,89	0,00	11,75	9,60	0,08	
Standardabweichung	33,73	19,94	8,41	8,39	20,63	22,23	4,13	
Mittelwert	55,38	47,25	10,99	4,66	31,30	35,76	2,48	
p-Wert (friedmann test, one-tailed)	>0,99	0,02	0,001	>0,99	>0,99	>0,99	0,002	
Spülprotokoll 2								
	Wasser	HCl	TS 2,5	TS 7	HAP	Chitosan	CHX	
Proband 1	96,56	82,47	19,89	0,04	72,28	68,12	0,04	
Proband 2	39,29	47,29	14,38	0,69	65,00	55,77	0,00	
Proband 3	17,01	58,22	63,30	18,57	30,79	56,49	1,16	
Proband 4	48,47	75,20	39,48	9,89	47,98	70,83	0,09	
Proband 5	74,35	70,37	11,34	6,38	70,28	65,80	0,43	
Proband 6	23,96	63,52	7,37	2,29	25,11	5,13	18,02	
Maximum	96,56	82,47	63,30	18,57	72,28	70,83	18,02	
Minimum	17,01	47,29	7,37	0,04	25,11	5,13	0,00	
Standardabweichung	30,48	12,58	21,48	7,07	20,51	24,57	7,23	
Mittelwert	49,94	66,18	25,96	6,31	51,91	53,69	3,29	
p-Wert (friedmann test, one-tailed)	>0,99	>0,99	0,1	>0,99	>0,99	>0,99	0,03	
p-Wert (wilcoxon test, one-t.)	0,42	0,08	0,16	0,34	0,08	0,11	0,22	

Die Bedeckung der Prüfkörper mit Biofilm ist in Prozent für jeden Probanden, jede Prüfsubstanz und für beide Spülprotokolle angegeben. Die Angaben sind um die berechneten Werte Maximum, Minimum, Standardabweichung und Mittelwert ergänzt. Für Spülprotokoll 1 und 2 sind jeweils die p-Werte des Friedmann-Tests und in der letzten Zeile die p-Werte des Wilcoxon-Tests aufgeführt. Modifiziert und entnommen aus [121].

8.3.2 Vitalität

Vitalität								
Spülprotokoll 1								
	Wasser	HCl	TS 2,5	TS 7	HAP	Chitosan	CHX	
Proband 1	56,57	55,14	7,23	23,15	52,58	44,15	6,11	
Proband 2	66,26	76,78	37,85	35,74	72,93	38,02	0,00	
Proband 3	81,46	29,31	12,59	21,56	27,15	51,54	5,68	
Proband 4	65,00	37,45	23,83	27,40	41,99	33,12	16,37	
Proband 5	66,89	49,67	20,54	52,11	64,14	46,32	0,66	
Proband 6	60,83	56,33	39,41	54,49	65,84	47,33	9,94	
Maximum	81,46	76,78	39,41	54,49	72,93	51,54	16,37	
Minimum	56,57	29,31	7,23	21,56	27,15	33,12	0,00	
Standardabweichung	8,44	16,53	13,05	14,48	17,14	6,72	6,10	
Mittelwert	66,17	50,78	23,57	35,74	54,10	43,41	6,46	
p-Wert (friedmann test, one-tailed)	>0,99	0,003	0,07	>0,99	0,27	<0,0001		
Spülprotokoll 2								
	Wasser	HCl	TS 2,5	TS 7	HAP	Chitosan	CHX	
Proband 1	85,31	74,43	34,29	13,16	45,76	64,38	21,93	
Proband 2	57,15	71,32	17,20	21,39	71,87	61,29	18,40	
Proband 3	29,90	58,14	40,40	46,09	26,95	43,01	11,74	
Proband 4	54,89	91,54	29,14	44,39	50,55	42,56	9,62	
Proband 5	96,20	94,55	29,11	53,48	74,42	67,74	14,20	
Proband 6	54,73	49,88	32,51	54,37	38,36	54,21	34,51	
Maximum	96,20	94,55	40,40	54,37	74,42	67,74	34,51	
Minimum	29,90	49,88	17,20	13,16	26,95	42,56	9,62	
Standardabweichung	23,94	17,71	7,71	17,33	18,70	10,84	9,07	
Mittelwert	63,03	73,31	30,44	38,81	51,32	55,53	18,40	
p-Wert (friedmann test, one-tailed)	>0,99	0,03	0,85	>0,99	>0,99	0,005		
p-Wert (wilcoxon test, one-t.)	0,42	0,08	0,22	0,34	0,42	0,05	0,05	

Die Vitalität des Biofilms ist in Prozent für jeden Probanden, jede Prüfsubstanz und für beide Spülprotokolle angegeben. Die Angaben sind um die berechneten Werte Maximum, Minimum, Standardabweichung und Mittelwert ergänzt. Für Spülprotokoll 1 und 2 sind jeweils die p-Werte des Friedmann-Tests und in der letzten Zeile die p-Werte des Wilcoxon-Tests aufgeführt. Modifiziert und entnommen aus [121].

9 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.