

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde,

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. M. Hannig

# ***In-vivo*-Untersuchung zum Einfluss experimenteller Mundspüllösungen auf den Speichel**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde*

**der Medizinischen Fakultät**

**der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2021

vorgelegt von:

Moritz Simon Guth

geb. am: 20.07.1993 in Homburg (Saar)

Tag der Promotion: 15.10.2021

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Hannig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. S. Becker

*Meinen Eltern, meiner Frau und  
unserer kleinen Marie gewidmet.*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Deutsche Zusammenfassung .....	1
1.2	Abstract.....	3
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
2.1	Literaturübersicht.....	7
2.1.1	Mikroorganismen der Mundhöhle .....	7
2.1.2	Speichel.....	8
2.1.3	Antibakterielle Wirkstoffe in Mundspüllösungen .....	9
2.1.4	Chitosan .....	11
2.1.5	Hydroxylapatit .....	12
2.1.6	Tanninsäure.....	13
2.1.7	Chlorhexidin .....	14
2.1.8	Methoden zur Darstellung von Bakterien im Speichel und zum Nachweis der bakteriellen Vitalität .....	15
2.2	Ziel der Arbeit / Fragestellung.....	16
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODE .....</b>	<b>17</b>
3.1	Prüfsubstanzen.....	17
3.2	Studiendesign.....	18
3.3	Versuchsdurchführung der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung .....	18
3.3.1	Probensammlung und Aufbereitung .....	18
3.3.2	LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit .....	19
3.3.3	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung .....	20

3.3.4	Relative Mengenbestimmung der BacLight™ Zellvitalität.....	20
3.3.5	Statistische Auswertung.....	20
3.4	Versuchsdurchführung TEM .....	21
3.4.1	Probensammlung und -fixierung.....	21
3.4.2	Einbettung der Proben.....	21
3.4.3	Auswertung der Proben.....	22
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>24</b>
4.1	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung .....	24
4.1.1	Mundspülung mit Wasser .....	25
4.1.2	Mundspülung mit Chlorhexidin.....	28
4.1.3	Mundspülung mit Chitosan.....	31
4.1.4	Mundspülung mit Hydroxylapatit.....	34
4.1.5	Mundspülung mit Tanninsäure .....	37
4.1.6	pH-Einfluss auf Tanninsäure .....	40
4.1.7	Überblick.....	42
4.2	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung.....	46
4.2.1	Mundspülung mit Wasser .....	47
4.2.2	Mundspülung mit Chlorhexidin.....	51
4.2.3	Mundspülung mit Chitosan.....	56
4.2.4	Mundspülung mit Hydroxylapatit.....	61
4.2.5	Mundspülung mit Tanninsäure .....	66
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>71</b>
5.1	Kritische Betrachtung der eigenen Untersuchung .....	71
5.1.1	Materialien .....	71
5.1.2	Methoden .....	72

5.2	Diskussion der Ergebnisse .....	75
5.2.1	Mundspülung mit den Kontrollen .....	75
5.2.2	Mundspülung mit Chitosan .....	76
5.2.3	Mundspülung mit Hydroxylapatit .....	77
5.2.4	Mundspülung mit Tanninsäure .....	78
5.3	Schlussfolgerungen .....	80
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>90</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>92</b>
9.1	Verzeichnis über die verwendeten Materialien und Geräte .....	92

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Deutsche Zusammenfassung

**Ziel:** In dieser Arbeit werden die antibakterielle Wirksamkeit der drei experimentellen Mundspüllösungen *Chitosan*, *Hydroxylapatit* sowie *Tanninsäure* auf die Speichelbakterien *in vivo* und die Effekte der Spüllösungen auf den Speichel untersucht.

**Material und Methoden:** Die Mundspüllösung *Chitosan* lag in einer Konzentration von 0,5% vor, die von *Hydroxylapatit* und *Tanninsäure* in einer von 5%. Als Positivkontrolle diente die Spüllösung 0,2%-*Chlorhexidindigluconat*, als Negativkontrolle die Spüllösung *Wasser*. In einem Nebenversuch kam zusätzlich die Spüllösung *Salzsäure* mit einem pH-Wert von 2,5 zum Einsatz. Fünf Probanden spülten mit der jeweiligen Spüllösung für 30 s und sammelten Speichelproben vor dem Spülen sowie 1 min, 30 min und 2 h danach. Die Proben wurden aufbereitet und die darin enthaltenen Bakterien fluoreszenzmikroskopisch mittels Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung auf ihre Vitalität hin untersucht. In einer zweiten Untersuchung sammelten zwei Probanden auf gleiche Weise Proben. Diese wurden zur Herstellung transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen fixiert und eingebettet. Die angefertigten Bilder wurden auf deskriptive Weise ausgewertet.

**Ergebnisse:** Wie sich in der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung zeigen ließ, konnte die Vitalität der Bakterienzellen in den untersuchten Proben mit den Spüllösungen *Chitosan* und *Tanninsäure* nach 1 min deutlich, nach 30 min noch erkennbar herabgesetzt werden. 2 h nach dem Spülen waren keine signifikanten Veränderungen mehr messbar. Die Spüllösung *Hydroxylapatit* weist nur 1 min nach dem Spülen eine schwache antibakterielle Wirkung auf. Die Positivkontrolle *Chlorhexidin* senkte als einzige Spüllösung die bakterielle Zellvitalität nachhaltig. Nur hier ließ sich noch nach 2 h eine deutliche antibakterielle Wirkung nachweisen. In einem Nebenversuch konnte ein etwaiger pH-Einfluss der Spüllösung *Tanninsäure* auf die bakterielle Zellvitalität ausgeschlossen werden. Die Spüllösung *Salzsäure* mit einem pH-Wert von 2,5 weist keine antibakterielle Wirkung auf.

In den Aufnahmen der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zeigen sich bei allen drei experimentellen Spüllösungen agglutinierende Effekte an den Speichelproteinen und Spei-

chelbakterien, besonders 1 min nach dem Spülen, schwächer auch noch nach 30 min. In fast allen Aufnahmen 1 min und 30 min nach dem Spülen mit der Spüllösung *Hydroxylapatit* waren Aggregationen aus Kokken, bzw. Proteinaggregaten und Hydroxylapatitkristallen zu sehen. Solche Aggregationen, wenn auch deutlich weniger, konnten 2 h nach dem Spülen ebenfalls noch nachgewiesen werden. Lediglich die Spüllösungen *Chitosan* und *Tanninsäure* sowie die Positivkontrolle *Chlorhexidin* weisen 1 min nach dem Spülen in den TEM-Aufnahmen eine deutliche antibakterielle Wirkung auf. Bei der Positivkontrolle lässt sich dieser Effekt auch noch nach 30 min und 2 h feststellen.

**Schlussfolgerungen:** Kurzfristige antibakterielle Effekte sind bei den Spüllösungen *Chitosan* und *Tanninsäure* zu beobachten. Die bakterien- und proteinagglutinierenden Effekte, welche bei der Spüllösung *Hydroxylapatit* vorkamen, könnten in der präventiven Zahnmedizin zum Biofilmmangement genutzt werden und sollten Gegenstand weiterer *in vivo* bzw. *in vitro* Studien sein.

## 1.2 Abstract

**Aim:** This study evaluates the *in vivo* antimicrobial activity of the experimental mouthrinses *Tannic acid*, *Chitosan* and *Hydroxyapatite* on salivary bacteria and their effects on saliva.

**Materials and methods:** Chitosan has a concentration of 0.5%, the two others (tannic acid, hydroxyapatite) each have one of 5%. 0.2% Chlorhexidine served as positive control, distilled water as negative control. In a side experiment the rinsing solution *Hydrochloric Acid* with a pH value of 2.5 was additionally used. In this study five volunteers rinsed 30 s with each tested product. Saliva samples were obtained before rinsing, after 1, 30 and 120 min. These samples were prepared for fluorescence microscopy via Live-Dead-Staining, by which the cell vitality of salivary bacteria was examined.

In a second study two volunteers collected salivary equally. The obtained samples were prepared for transmission electron microscopy. The resulting pictures were evaluated descriptively.

**Results:** 1 min after rinsing with the mouthrinses *Chitosan* and *Tannic acid* bacterial cell vitality was greatly reduced, whereas after 30 min at least visibly. 2 h after rinsing there was no measurable effect. The rinsing solution *Hydroxyapatite* showed a slightly significant antimicrobial effect only 1 min after rinsing. Merely the positive control *Chlorhexidine* reduced the bacterial cell vitality sustainably. Even after 2 h a distinct antibacterial effect was measurable. A side experiment revealed that the tannic acid's pH-value had no influence on the mouthrinse's antibacterial effect. Hydrochloric acid with a pH-value of 2.5 had no antibacterial effect.

The TEM pictures revealed agglutinating effects caused by all three experimental rinsing solutions, especially 1 min after rinsing, less strongly after 30 min. Almost all pictures taken 1 min and 30 min after rinsing with the rinsing solution *Hydroxyapatite* showed aggregations of hydroxyapatite crystals with cocci respectively protein aggregates. Such aggregations, albeit significantly less, could still be detected 2 h after rinsing. Only the rinsing solutions *Chitosan* and *Tannic acid* as well as the positive control *Chlorhexidine* showed, visualized by TEM, a clear antibacterial effect 1 min after rinsing. Regarding the positive control, this effect could still be observed after 30 min and even after 2 h.

**Conclusion:** Short-term antimicrobial effects are found in the rinsing solutions *Chitosan* and *Tannic acid*. The bacteria and protein agglutinating effects, which occurred with the rinsing

solution hydroxyapatite, could be used in preventive dentistry for biofilm management and should be the subject of further *in vivo* and *in vitro* investigations.

## 2 Einleitung

Prophylaxemaßnahmen in der Zahnmedizin nehmen heute im Vergleich zu vergangenen Jahrzehnten einen immer größeren Stellenwert ein. Lag damals der Fokus auf den kurativen Maßnahmen, verschiebt sich dieser heute zunehmend auf die Prophylaxemaßnahmen. Diese Entwicklung ist auch der fünften Deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS V) des Instituts der Deutschen Zahnärzte aus dem Jahr 2014 zu entnehmen. Eine direkte Folge der guten Prophylaxe ist die sinkende Karieserfahrung bei Kindern. Mit einem DMFT-Wert – sprich der Anzahl kariöser (Decayed), fehlender (Missed) und gefüllter (Filled) Zähne (Tooth) – von nur 0,5 bei den 12-Jährigen steht Deutschland an der Weltspitze. Es gibt allerdings auch einen anderen Trend, welcher in der DMS V bereits im Vorwort deutlich wird: „Mit diesen und anderen Ergebnissen geht aber auch eine wichtige Erkenntnis einher: Infolge der demografischen Entwicklung verlagern sich Zahnerkrankungen ins hohe Alter und dabei hauptsächlich auf Menschen mit Pflegebedarf“ (Jordan *et al.*, 2014).

Mundspüllösungen spielen in unserer alternden Gesellschaft eine immer größere Rolle, was die Prophylaxe von Karies und entzündlichen Erkrankungen des Zahnhalteapparates betrifft. Nach der DMS V sind 30 Prozent der Menschen mit Pflegebedarf nicht mehr selbst in der Lage, ihre Zähne und Zahnprothesen eigenständig zu reinigen und zu pflegen. Diesen Pflegebedürftigen ist dann auf eigenständige Weise oftmals nur noch eine chemische Reinigung der Zähne mittels Mundspüllösungen möglich.

Ziel der Mundspüllösungen ist hierbei nicht die vollständige Beseitigung der Mundflora, sondern eine Hemmung der bakteriellen Adhäsion an die Zahnhartsubstanz sowie die gezielte Elimination kariogener und parodontopathogener Erreger unter Wahrung eines ökologischen Gleichgewichtes des oralen Mikrobioms. Moderne Mundpflegepräparate enthalten häufig Chlorhexidin, Metallsalze oder quartäre Ammoniumverbindungen, die jedoch auf unspezifische Weise neben den schädlichen Erregern auch nützliche Bakterien abtöten, die eine Homöostase aufrechterhalten.

Es besteht ein zunehmender gesellschaftlicher Trend in der Nachfrage nach natürlich vorkommenden Gesundheitsprodukten. Dieser schlägt sich auch in der Zahnmedizin nieder. Um dieser Entwicklung Rechnung zu tragen, soll die vorliegende *In-vivo*-Studie Aufschluss über

die antibakterielle Wirkung und die Effekte auf den Speichel von experimentellen, natürlichen Mundspüllösungen geben.

## 2.1 Literaturübersicht

### 2.1.1 Mikroorganismen der Mundhöhle

Die Mundhöhle stellt mit ihrer Wärme und Feuchtigkeit für Mikroorganismen ein ideales Biotop dar. So ist es kein Wunder, dass die Bakteriendiversität an dieser Stelle auf mindestens 500 bis 700 verschiedene Arten geschätzt wird (Kroes *et al.*, 1999; Paster *et al.*, 2001; Kazor *et al.*, 2003; Dewhirst, 2010). Zudem sind neben Bakterien in geringem Maße auch Pilze und Viren Teil der normalen Mundflora. Es lässt sich abschätzen, dass an Pilzen etwa weitere 100 Arten in der Mundhöhle vorkommen (Ghannoum *et al.*, 2010). Es gibt zahlreiche Interaktionen zwischen Bakterien und Pilzen, welche noch nicht ausreichend erforscht sind. So kommt es zwischen diesen zu physikalischen, chemischen und metabolischen Wechselwirkungen (Krom *et al.*, 2014).

Die Anzahl der Bakterien liegt bei einem Milliliter Speichel bei  $10^9$ , bei einem Gramm Plaque sogar bei  $10^{11}$  (Rupf *et al.*, 2007). Da pathogene Keime gemeinsam mit apathogenen um Nährstoffe konkurrieren, ist der Erhalt der Homöostase der oralen Flora notwendig (Marsh und Martin, 2003). Eine residente Flora schützt somit vor opportunistischen Erregern, was als „Resistenz gegen Besiedelung“ bezeichnet wird (Marsh und Martin, 2003).

Im Mutterleib gesunder Frauen – so nimmt man an – wächst das Kind in einer aseptischen Umgebung heran und somit auch die fetale Mundhöhle. Neuere Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass es im Fruchtwasser bei 70 Prozent der Schwangeren bereits zu einer Besiedelung mit Bakterien kommt (Bearfield *et al.*, 2002). Am häufigsten tritt hierbei das *F. nucleatum*, ein Parodontitis-Erreger, auf (Hill, 1998). Dies bekräftigt auch die Annahme, Parodontalerkrankungen seien ein Risikofaktor für Frühgeburten und für geringes Geburtsgewicht (Offenbacher *et al.*, 1996). Das Mikrobiom wird durch weitere Bakterien während der Geburt ergänzt. Dies sind entweder Bakterien der Haut- oder der Vaginalflora, abhängig davon, ob das Kind auf natürlichem Wege oder mittels Kaiserschnittes auf die Welt gebracht wird (Nelun Barfod *et al.*, 2011). Im letzteren Fall erfolge laut Li *et al.* die Besiedelung der kindlichen Mundhöhle mit *S. mutans* ca. ein Jahr früher als bei natürlich geborenen Kindern (Li *et al.*, 2005). Weitere Veränderungen in der Besiedelung der Mundhöhle ergeben sich beim Kind durch den Kontakt mit der Mutter – die sog. vertikale Übertragung –, was dazu führt, dass sich kindliches und mütterliches Mikrobiom immer weiter annähern und später durch den

Kontakt mit anderen Menschen und der Umgebung – die sog. horizontale Übertragung. Mit dem Durchbruch der ersten Zähne sowie mit dem Wechsel zur zweiten Dentition ändert sich das kindliche Mikrobiom noch einmal deutlich (Kilian *et al.*, 2016). So entwickelt letztlich jeder Mensch im Laufe seines Lebens ein ganz individuelles Mikrobiom, welches von vielen Faktoren beeinflusst wird. Dazu gehören insbesondere die Ernährung, die Mundhygiene, das Alter oder auch die Einnahme von Medikamenten und hierbei insbesondere von Antibiotika (Meyer und Enax, 2018). Das Mikrobiom der Mundhöhle hat Einfluss auf die Gesundheit des ganzen Körpers. So gibt es Hinweise darauf, dass regelmäßige Mundspülungen mit Chlorhexidin den Blutdruck leicht steigen lassen können, da sie den Nitritspiegel im Speichel und im Blutplasma senken (Woessner *et al.*, 2016; Kapil *et al.*, 2013). Die Zusammenhänge zwischen dem zahlreichen Vorhandensein parodontopathogener Erreger und dem erhöhten Risiko für Frühgeburten bzw. der Verschlechterung einer Diabeteserkrankung sind bereits gut untersucht (Löe, 1993; Offenbacher *et al.*, 2006). Ein neuerer Ansatz ist die Gabe von apathogenen Bakterien, sog. „Probiotika“. Durch deren Gabe wird versucht, das Bakterienmilieu positiv zu beeinflussen, um so Dysbiosen zu verhindern. Probiotika beinhalten in der Regel Lactobacillen, am häufigsten *L. reuteri*, welche sich mit den pathogenen Erregern im Konkurrenzkampf um Nährstoffe befinden und so das Gleichgewicht wieder hin zu einer Homöostase verschieben können (Jones und Versalovic, 2009). Ob dieser Ansatz tatsächlich funktioniert, muss in weiteren Studien noch untersucht werden (Elavarasu *et al.*, 2012; Posner und Domanski, 2009).

### 2.1.2 Speichel

Der Speichel spielt eine wichtige Rolle, nicht nur, was die Befeuchtung der Nahrung betrifft, sondern v.a. auch als Kariesprotektor. So ist bekanntlich erwiesen, dass bei Hyposalivation bzw. Xerostomie das Kariesrisiko deutlich ansteigt. Die Ursache hierfür liegt in der nicht mehr ausreichenden Spülfunktion sowie dem verminderten Vorhandensein der antimikrobiellen Eigenschaften vieler Speichelproteine (Dreizen *et al.*, 1977).

Van Nieuw Amerongen fasst die positiven Eigenschaften des Speichels und der darin enthaltenen Komponenten in fünf Punkten zusammen: Schutz der Zahnoberfläche vor Abnutzung, Remineralisierung des Schmelzes, Verzögerung der Demineralisation, Vorbeugung der Adhärenz oraler Mikroorganismen an die Schmelzpellikel sowie Neutralisation von Säuren (Van Nieuw Amerongen *et al.*, 2004).

Die Pellikelformation ist abhängig von der Adsorption von Komponenten aus dem Speichel, der Sulkusflüssigkeit und Bakterien auf der Schmelzoberfläche (Hannig, M. und Joiner, 2006). Die Vitalität der pathogenen Keime im Speichel spielt eine entscheidende Rolle in der Entstehung des Biofilms, da die bakterielle Adhärenz an der Pellikelschicht Grundlage für die Entstehung von Plaque ist. An der Bakterienoberfläche befinden sich Fimbrien und die Glykokalyx. Letztere variiert in elektronenmikroskopischen Untersuchungen mit 50–100 nm (Stace und Damiano, 2001) stark in ihrer Größe abhängig von den eingesetzten Färbemethoden (Fassel und Edmindston, 1999). Dass die Glykokalyx allerdings mit 400–500 nm *in vivo* deutlich größer ist (Frey *et al.*, 1996), liegt an der Dehydratation während der Einbettung und Fixierung (Stace und Damiano, 2001).

Neben den Speichelbakterien lassen sich ultrastrukturell weitere Strukturen ausmachen. Proteinaggregaten lassen sich anhand ihres filamentartigen Äußeren einfach identifizieren. Auch sind häufig abgeschilferte Epithelzellen zu sehen. Die 100-200 nm großen Mizellen sind an ihrer globulären Form leicht zu erkennen (Soares *et al.*, 2004). Ihren Namen verdanken sie ihrer morphologischen Ähnlichkeit mit den in Milch enthaltenen Kasein-Mizellen (Rølla und Rykke, 1994).

Nasidze *et al.* zeigen, dass die Diversität im Mikrobiom des Speichels weltweit betrachtet relativ ähnlich ist, interindividuell jedoch stark verschieden (Nasidze *et al.*, 2009). Der interindividuelle Unterschied wird klinisch in den verschiedenen Erkrankungen sichtbar, die sich aus der Dysbiose in der Mundhöhle entwickeln, beispielsweise in der Dentalkaries und den Parodontitiden (Meyer und Enax, 2018). Das Mikrobiom des Speichels passt sich an die Lebensumstände der jeweiligen Menschen an. So haben die Nutzung des Feuers, der Ackerbau, der erleichterte Zugang zu verarbeiteten Nahrungsmitteln, insbesondere von Zucker, das menschliche Mikrobiom deutlich verändert (Kilian *et al.*, 2016).

### 2.1.3 Antibakterielle Wirkstoffe in Mundspüllösungen

Die auf dem Markt erhältlichen Mundspüllösungen zeichnen sich durch eine große Vielfalt an verschiedenen Wirkstoffen aus. So gibt es nicht nur antibakterielle, sondern auch plaque- oder entzündungshemmende Wirkstoffe. Auch eine Remineralisation des Zahnschmelzes lässt sich durch Zusatz von Fluorid oder Hydroxylapatit erzielen (Roveri *et al.*, 2009). Die verschiedenen antibakteriellen Wirkstoffe von Mundspüllösungen und deren Wirkmechanismen auf die Speichelbakterien sind Tabelle 1 zu entnehmen.

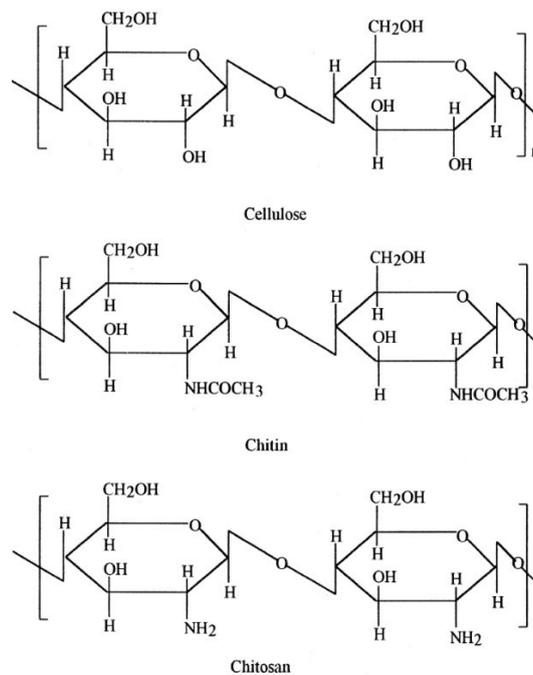
**Tab. 1: Übersicht über die gängigsten antibakteriellen Wirkstoffe in Mundspüllösungen und deren Wirkmechanismen (modifiziert nach: Meyer und Enax, 2018)**

Stoffklasse	Beispiele	Antimikrobieller Wirkmechanismus
Biguanid-Derivat	Chlorhexidin	– Inhibierung des Zuckertransports und der Säureproduktion – Inhibierung der Aminosäureaufnahme, Polysaccharidsynthese und Funktionen der bakteriellen Membran – Inhibierung der Proteaseaktivität
Quartäre Ammoniumverbindungen	Cetylpyridiniumchlorid, Octenidin	– Minimierung des bakteriellen Wachstums
Ätherische Öle	Menthol, Thymol, Eucalyptol, Methylsalicylat	– Inhibierung des bakteriellen Wachstums – Inhibierung der Säureproduktion – Reduktion von Lipopolysacchariden
Metallsalze	Zink-, Kupfer- und Zinn(II)ionen	– Inhibierung des Zuckertransports und der Säureproduktion – Inhibierung der Proteaseaktivität
Naturstoffe	Pflanzenextrakte (z.B. Apigenin)	– Inhibierung der Säureproduktion – Inhibierung der bakteriellen Polysaccharidsynthese
Phenolderivate	Triclosan	– Inhibierung des Zuckertransports und der Säureproduktion – Inhibierung der Proteaseaktivität

Das zur Gruppe der Biguanid-Derivate zählende Chlorhexidin ist nicht wasserlöslich und kann daher nur in seiner ebenso wirksamen wasserlöslichen Form als Chlorhexidindigluconat in Mundspüllösungen Anwendung finden. Es ist aufgrund unerwünschter Nebenwirkungen bei Langzeitanwendung apothekenpflichtig. Ähnliches gilt für Präparate mit quartären Ammoniumverbindungen. Deren unspezifischer Einsatz als antimikrobieller Wirkstoff in Kosmetikprodukten kann zu einer zunehmenden Resistenzentwicklung pathogener und apathogener Bakterien führen (Hegstad *et al.*, 2010). Im häuslichen Bereich finden stattdessen oftmals ätherische Öle, Metallsalze, Pflanzenextrakte und Phenolderivate Verwendung. Tenside, wie das in manchen Produkten eingesetzte Natriumlaurylsulfat, werden aufgrund ihrer möglichen allergenen Wirkung kaum mehr eingesetzt. Auch gibt es Hinweise darauf, dass sie das Auftreten von Aphten begünstigen (Herlofson und Barkvoll, 1994).

### 2.1.4 Chitosan

Chitin ist ähnlich wie Zellulose ein natürlich vorkommendes Polymer und ist einzig durch die Acetamidgruppe am C<sub>2</sub> jeder Glukoseuntereinheit von dieser verschieden (Abb. 1). Neben Zellulose ist Chitin das am weitesten verbreitete Polysaccharid und kommt als Strukturbildner in Pilzen, Schalentieren und Insektskeletten vor. Chitosan ist ein Chitinderivat, welches durch Deacetylierung von Chitin gewonnen wird. Sein Molekulargewicht verhält sich umgekehrt proportional zum Grad der Deacetylierung, d.h. je mehr Chitin in Chitosan umgewandelt wurde, desto niedriger ist das Molekulargewicht *et vice versa*. Typische Deacetylierungsgrade liegen bei 60–80% und nicht bei mehr, da eine vollkommene Deacetylierung die Chitoketten zu sehr degenerieren würde (Ondruschka *et al.*, 2008).



**Abb. 1: Strukturformeln von Zellulose, Chitin und Chitosan (Kumar, 2000)**

Chitosan ist für seine bakterizide und fungizide Wirkung bekannt. In der Medizin macht man sich zudem seine koagulierenden Eigenschaften in Form von „Gerinnungs-Pads“ zur Blutstillung zunutze (Poretti *et al.*, 2005). Chitosan eignet sich darüber hinaus sehr gut als Agens in Mundspüllösungen, da es über eine sehr gute Haftung an oralen Oberflächen verfügt (Şenel *et al.*, 2000). Chitosan wird auch als Vehikel für die Freisetzung therapeutischer Mittel eingesetzt (Bhattarai, *et al.*, 2010). In der Zahnmedizin wird für die Freisetzung oraler therapeutischer Mittel diese Vehikeleigenschaft verwendet (Decker *et al.*, 2005). Eine Studie hat ge-

zeigt, dass Chitosan in der Lage ist, die Arzneimittelabgabe in den parodontalen Taschen um bis zu 20 Tage zu verzögern (Perugini *et al.*, 2003).

Wie genau die antiadhärente Wirkweise des Chitosans zustande kommt, ist noch nicht abschließend geklärt. Man vermutet jedoch, dass Chitosan sukzessive die Hydrophobizität der Bakterienzellwände herabsetzt. Da die Oberflächenhydrophobizität jedoch mit dem Anlagerungsvermögen der Bakterien relativiert, kann diese Herabsenkung zumindest ein Faktor sein, welcher die antiadhärente Wirkung verursacht (Stamford *et al.*, 2013). Costa *et al.* zeigen antiadhärente Eigenschaften von Chitosan auf *S. mutans* (Costa *et al.*, 2013) und antibakterielle Eigenschaften gegen parodontopathogene Erreger (Costa *et al.*, 2014). Hayashi *et al.* bestätigen ebenfalls die antibakterielle Wirkung von Chitosan auf Speichelbakterien (Hayashi *et al.*, 2007a). Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass Chitosan als Zusatz in Kaugummis stärker antibakteriell wirkt als in Form von Mundspüllösungen (Hayashi *et al.*, 2007a). Einprozentige Chitosanlösung führt nach Bae *et al.* zu signifikanter Reduktion des Plaqueindex und zu reduzierter Vitalität der Plaquebakterien. Auch eine antibakterielle Wirksamkeit gegen *S. mutans* konnte demonstriert werden (Bae *et al.*, 2006).

### 2.1.5 Hydroxylapatit

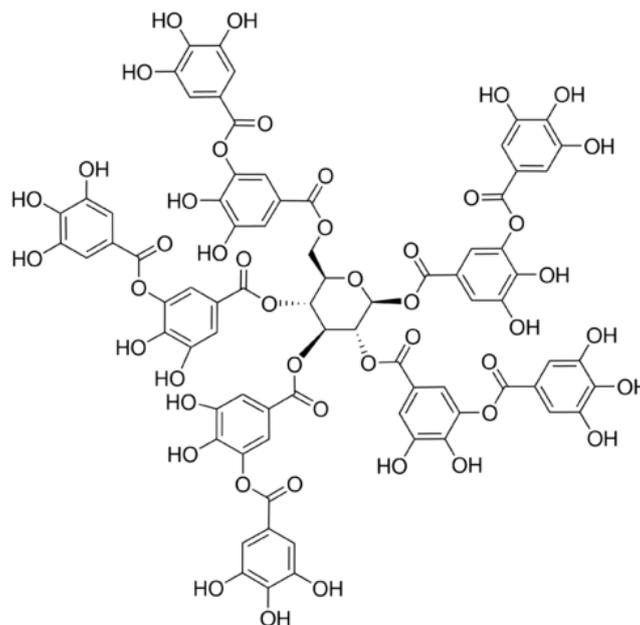
Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ) stellt den Grundbaustein aller tierischen und menschlichen Hartgewebe dar und kommt im Knochen zu 40%, im Dentin zu 70% und im Zahnschmelz zu 95% vor. Im Bereich der Medizin kommt das Biomaterial Hydroxylapatit v.a. als Beschichtung von künstlichen Gelenken oder Implantaten zum Einsatz (Zhao *et al.*, 2008). Diesen Einsatz hat es seiner guten Biokompatibilität und -aktivität zu verdanken. Bioaktivität meint die Eigenschaft, eine direkte chemische Verbindung mit lebendem Gewebe einzugehen.

Im Bereich der Zahnmedizin stellt Hydroxylapatit als Wirkstoffzusatz in Zahnpasten und Mundspüllösungen einen neuen biomimetischen Ansatz dar, frühe Schmelzläsionen zu remineralisieren oder die Anlagerung von Biofilmen zu hemmen (Hannig, M. und Hannig, C., 2010; Hannig, C. *et al.*, 2013; Tschoppe *et al.*, 2011). Bezogen auf die Remineralisierung scheint eine Konzentration von 10 Prozent am effektivsten zu sein (Huang *et al.*, 2009). Weiterhin kann Hydroxylapatit die Dentintubuli verschließen und somit die Empfindlichkeit der Zähne auf äußere Reize senken (Shetty *et al.*, 2010; Vano *et al.*, 2018). Eine *in-vivo*-Untersuchung von Tahan aus dem Jahr 2018 kann für eine kommerzielle hydroxylapatithaltige Mundspüllösung zwar einen moderaten antibakteriellen Effekt nachweisen, jedoch sind

dem Präparat noch weitere Wirkstoffe wie die Zuckeralkohole Xylitol und Sorbitol zugefügt (Tahan, 2018). Kensche *et al.* gehen von keinem antibakteriellen Effekt des Hydroxylapatits aus. Sie zeigen jedoch, dass Hydroxylapatit im Speichel zusammen mit den Bakterien Aggregate bildet und so eine antiadhäsive Wirkung entfaltet (Kensche *et al.*, 2017).

### 2.1.6 Tanninsäure

Tanninsäure gehört zur Gruppe der Polyphenole und spielt eine wichtige Rolle als Gerbsäure bei der Lederherstellung sowie im Weinbau und wurde schon lange ausführlich auf seine antimikrobiellen Eigenschaften untersucht (Scalbert, 1991). Tannine haben ein Molekulargewicht von 500–3.000 Da und gehören zur Gruppe der Polyphenole (Haslam, 1996a), was sich auch an ihrer Struktur erkennen lässt (Abb. 2).



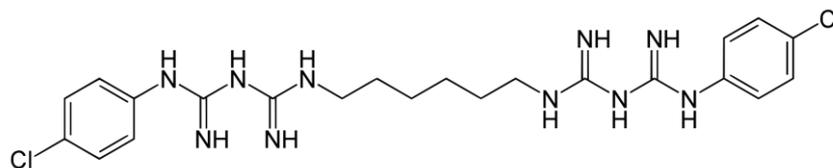
**Abb. 2: chem. Strukturformel der Tanninsäure  
(Produktinformation Sigma-Aldrich, Inc.)**

Die molekulare Wirkweise der Polyphenole besteht darin, aus Proteinen durch unspezifische Kräfte – wie Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Effekte oder kovalente Bindungen – Komplexe zu bilden und diese so zu inaktivieren (Haslam *et al.*, 1996b). Es wird davon ausgegangen, dass prolinreiche Proteine mit Tanninsäure aggregieren, um diese zu inaktivieren und somit ihre biologische Aktivität zu mindern (Lu und Bennick, 1998). Da Tanninsäure

auch die protektiven Eigenschaften der in situ geformten Pellikelschicht unterstützt (Hertel *et al.*, 2017), kann es als Additiv in Mundspüllösungen eine relevante Rolle spielen. So zeigen Rehage *et al.*, dass Tanninsäure die Pellikelschicht sowohl verbreitert als auch verdichtet (Rehage *et al.*, 2017). Eine weitere positive Eigenschaft der Tannine ist ihre Hemmung der alpha-Amylase, auf welche mehrere Studien hinweisen (Kandra *et al.*, 2004; Yanagida *et al.*, 2000). Durch eine Hemmung dieses Enzyms wird die Stärke nicht in Oligosaccharide gespalten und ist so für kariogene Bakterien nicht verfügbar.

### 2.1.7 Chlorhexidin

Chlorhexidin selbst ist schlecht wasserlöslich und kommt daher in der Regel in wässriger Lösung als ebenso wirksames Chlorhexidindigluconat zur Anwendung. Es zählt, wie seine Strukturformel erkennen lässt, zur Gruppe der Biguanid-Derivate (Abb. 3).



**Abb. 3: Chemische Strukturformel von Chlorhexidin**

Chlorhexidin galt lange als der Goldstandard unter den oralen Antiseptika in der zahnärztlichen Chirurgie. Verschiedene Studien belegen seine sehr gute antimikrobielle Wirksamkeit, welche sich u.a. auch daraus ergibt, dass es als Wirkstoff relativ lange auf der Zahnoberfläche und der Mundschleimhaut haften bleibt und dort wirken kann (Haffajee *et al.*, 2008; McBain *et al.*, 2003; Eldridge *et al.*, 1998). Nach Reda *et al.* lässt sich Chlorhexidin in der Mundhöhle elf Stunden nach einmaliger Spülung mit einer 0,2%igen Chlorhexidindigluconat-Lösung noch in der Größenordnung von mehreren Mikrogramm pro Milliliter finden und ist sogar nach 24 Stunden noch nachweisbar. Die Pellikelschicht und die Mukosa stellen hierfür Reservoir dar, im Speichel hingegen ist die nachweisbare Konzentration am geringsten (Reda *et al.*, 2020). Chlorhexidin lagert sich als kationisches Molekül an die negativ geladene bakterielle Zellwand an. In niedrigen Konzentrationen hat Chlorhexidin eine bakteriostatische Wirkung, indem es den osmotischen Gradienten verändert, was zum Austreten von Stoffen mit geringem Molekulargewicht führt (Varoni *et al.*, 2012). In hohen Konzentrationen wirkt es bakterizid, indem es die Permeabilität der bakteriellen Zellwand so weit erhöht, dass durch den

resultierenden Kaliumausstrom die Zytolyse eingeleitet wird (Varoni *et al.*, 2012). Leider kommt es aufgrund seiner Nebenwirkungen – wie z.B. Dysgeusie oder Verfärbungen an Zähnen, Zahnfleisch und der Zunge – für eine Langzeitanwendung nicht in Betracht (Flötra *et al.*, 1971; Warner, 1993).

### 2.1.8 Methoden zur Darstellung von Bakterien im Speichel und zum Nachweis der bakteriellen Vitalität

Eine etablierte Methode zur Darstellung von Bakterien ist die sogenannte Lebend-Tot-Färbung, im Englischen Live-Dead-Staining oder kurz LDS genannt (Boulos *et al.*, 1999). In zahlreichen Untersuchungen wurde bereits die auf *in situ* platzierten Schmelzproben gebildete Plaque durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht und die enthaltenen Bakterien in lebend und tot unterschieden (Kensche *et al.*, 2017). Quantifizieren lassen sich die Bakterien durch eine Bildsoftware, welche zum einen die Anteile der durch die Fluoreszenzmikroskopie unterschiedlich angefärbten Bakterien und zum anderen den Bedeckungsgrad messen kann (Collins, 2007). Diese Methode lässt sich leicht auch auf den Speichel übertragen (Tahan, 2018). Statt einer Plaque wird über Zentrifugation von Speichelproben ein Bakterienpellet gebildet, welches nach Inkubation mit der Lebend-Tot-Färbelösung und Aufbringen auf einen Glasträger fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden kann.

## 2.2 Ziel der Arbeit / Fragestellung

Es besteht eine zunehmende Nachfrage nach natürlichen Gesundheitsprodukten in der Gesellschaft. Dieses Interesse erstreckt sich auch auf den Bereich der Zahnmedizin. Im Bereich der Mundhöhle spielt die Aufrechterhaltung einer Homöostase eine entscheidende Bedeutung bei der Vermeidung von Erkrankungen der Zähne und des Zahnhalteapparates. Mundspüllösungen können zu dieser Aufrechterhaltung einen entscheidenden Beitrag leisten. Ziel dieser Arbeit ist, den Einfluss der experimentellen Spüllösungen *Chitosan*, *Hydroxylapatit* und *Tanninsäure* auf den Speichel zu untersuchen. Für Chitosan und Tanninsäure sind gegen Speichelbakterien bereits antibakterielle Eigenschaften nachgewiesen (Bae *et al.*, 2006; Scalbert, 1991). Von Hydroxylapatit wird angenommen, dass es weniger eine antibakterielle Eigenschaft aufweist, sondern vielmehr anti-adhärenz wirkt (Hannig, C. *et al.*, 2013).

Die Arbeit ist aus zwei Teilen aufgebaut. Im ersten Teil wird mittels Fluoreszenzmikroskopie die antibakterielle Wirksamkeit auf die Speichelbakterien überprüft. In einem Nebenversuch wird auch auf den Einfluss des pH-Wertes bei der Spüllösung *Tanninsäure* eingegangen. Es wird zum einen untersucht, ob bei einem weniger sauren bzw. bei einem neutralen pH-Wert die gleiche antibakterielle Wirkung erzielt werden kann, und zum anderen, welchen Einfluss der pH-Wert auf die antibakterielle Wirkung hat. Im zweiten Teil werden mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie etwaige ultrastrukturelle Veränderungen der Speichelbakterien und -proteine erforscht. Bei letzterem stehen besonders das Vorkommen von Aggregationen aus Bakterien und Proteinen bzw. aus Bakterien und Hydroxylapatitkristallen im Fokus.

In beiden Teilen werden die gewonnenen Ergebnisse der experimentellen Spüllösungen mit den Ergebnissen der Positivkontrolle *0,2%-Chlorhexidin* und der Negativkontrolle *Wasser* verglichen.

## 3 Material und Methode

### 3.1 Prüfsubstanzen

In den Versuchen wurde destilliertes Wasser als Negativ- und 0,2%ige Chlorhexidindigluconat-Lösung als Positivkontrolle verwendet. In einem Nebenversuch, welcher den pH-Einfluss auf die Tanninsäure untersucht (Kap. 4.1.6), wurde als Negativkontrolle Salzsäure mit einem pH-Wert von 2,5 benutzt. Die Konzentration betrug 0,003 mol/l.

Das eingesetzte Chitosan lag laut Herstellerangaben in einem Deacetylierungsgrad von  $\geq 92,6\%$  und in einem Viskositätsgrad im Bereich von 2751–3250 mPas vor. Das Ansetzen der Spüllösung erfolgte durch Lösung in 100%iger Essigsäure. Die Konzentration der angesetzten Lösung betrug 0,5 g/100 ml, der pH-Wert 4,5.

Die experimentelle Hydroxylapatit- und die Tanninsäure-Spüllösung wurden jeweils durch Verdünnung mit destilliertem Wasser auf 5 g/100 ml angemischt. Die durchschnittliche Partikelgröße der Hydroxylapatitkristalle beträgt laut Herstellerangaben 100 nm.

Die eingesetzte Tanninsäure hat ein Molekulargewicht von 1701,2 g/mol. Der pH-Wert der Spüllösung *Tanninsäure* lag im Bereich von 2,5. Die in einem Nebenversuch (Kap. 4.1.6) eingesetzten Spüllösungen mit Tanninsäure wurden auf gleiche Weise angesetzt und anschließend durch Titration mit Natronlauge auf die zusätzlichen pH-Werte von 5 und 7 gebracht.

Im Anhang in Kapitel 9.1 „Verwendete Materialien und Geräte“ sind Angaben zu Produkt-namen und -herstellern aufgelistet.

## 3.2 Studiendesign

Bei der Untersuchung handelt es sich um eine klinisch-experimentelle Studie. Fünf gesunde Freiwillige im Alter von 24–30 Jahren, welche an der Universität des Saarlandes Zahnheilkunde studieren, haben an dieser Studie teilgenommen. Alle Probanden haben eine polyphenolarme Diät eingehalten und 24 Stunden vor den Versuchen weder geraucht noch Alkohol getrunken. Mundhygienische Maßnahmen hatten einen mindestens 6-stündigen Abstand zu den Versuchen. Nach dem Spülen wurde eine Wash-out-Phase von 48 Stunden bis zum nächsten Versuch eingehalten. Der Studie wurde ein positives Ethik-Votum durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes beschieden (238/03, 2016). Alle Probanden gaben nach Unterrichtung über die geplanten Versuche eine schriftliche Einwilligungserklärung ab.

## 3.3 Versuchsdurchführung der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung

### 3.3.1 Probensammlung und Aufbereitung

Um einen ausreichenden Abstand zu den mundhygienischen Maßnahmen zu erhalten, erfolgte die Versuchsdurchführung vormittags mit einem etwa zweistündigen Abstand zum Frühstück. Die Versuchspersonen sammelten zunächst für ca. eine Minute 1,8 ml Ruhespeichel in einem Eppendorf Tube<sup>®</sup>. Anschließend spülten sie für 30 Sekunden mit 10 ml der Prüfsubstanz, welche danach ausgespuckt wurde. Eine Minute, 30 Minuten und zwei Stunden nach dem Spülen sammelten die Probanden erneut für etwa eine Minute 1,8 ml Speichel. Die Proben wurden jeweils in einem ersten Schritt bei 1.000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert, sodass sich die Epithelzellen absetzten. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Tube<sup>®</sup> abgeschüttet (1,5 ml) und in einem zweiten Schritt bei 10.000 rpm erneut für zehn Minuten zentrifugiert. Diesmal haben sich die Bakterien in einem Pellet am Boden des Röhrchens abgesetzt. Der Überstand wurde wieder dekantiert, sodass nur noch eine dünne Speichelschicht über dem Pellet lag. Das Röhrchen wurde zum Resuspendieren mit dem Vortex-Gerät durchmischt. Die Bakterienlösung wurde mit 20 µl der LIVE/DEAD-Färbelösung (Kap. 3.3.2) ver-

setzt und für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Eine Aluminiumfolie wurde zusätzlich um die Röhren gelegt, um sie vor dem Licht zu schützen. 2 µl der Probe wurden anschließend auf einen Objektträger aus Glas aufgebracht und mit einem Deckglas versehen.

### 3.3.2 LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit

#### a. Einführung

Das LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit stellt eine Methode dar, lebende und tote Bakterien farblich sichtbar zu machen. Die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Bakterien ergibt sich aus der Intaktheit bzw. der Beschädigung ihrer Zellmembran. Bakterien mit beschädigter Membran werden als tot angenommen und rot angefärbt, solche mit intakter Membran werden als lebend angenommen und grün angefärbt.

#### b. Ansetzen der Färbelösung

Die Anfärbung vollzieht sich durch die zwei Farbstoffe SYTO™ 9, der Komponente A, sowie Propidiumiodid (PI), der Komponente B. Erstere Komponente liegt in einer Konzentration von 3,34 mM, zweitere in einer von 20 mM vor. Die Färbelösung wurde aus 1 ml 0,9%iger Kochsalz-Lösung, 1 µl SYTO™ 9 und 1 µl PI angesetzt. Darauf wurde die Färbelösung mit dem Vortex-Gerät durchmischt.

#### c. Wirkungsweise

Die beiden Färbemittel unterscheiden sich in ihren Lichtbrechungseigenschaften, was zu den beiden unterschiedlichen Farben führt und es möglich macht, sie fluoreszenzmikroskopisch zu nutzen. Ein weiterer Unterschied besteht in ihrer Fähigkeit, gesunde bzw. nur beschädigte Zellmembranen zu penetrieren. SYTO™ 9 färbt generell alle Bakterien an, egal ob eine beschädigte oder eine unbeschädigte Membran vorliegt. Im Gegensatz zu PI, welches nur beschädigte Membranen zu durchdringen vermag und hierbei SYTO™ 9 verdrängt.

Die Anzahl von lebenden (grün) und toten (rot) Bakterien kann so bestimmt werden (Boulos *et al.*, 1999).

### 3.3.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung

Die Proben wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Imager.M2 bei 1.000-facher Vergrößerung untersucht.

Acht repräsentative Bilder wurden pro Probe ausgewählt und anschließend mit der *AxioCam MRm* sowie dem dazugehörigen Programm *AxioVision 4.9* aufgenommen.

### 3.3.4 Relative Mengenbestimmung der BacLight™ Zellvitalität

Die Auswertung des Anteils lebender und toter Bakterien erfolgte abhängig von der Bakterienanzahl über zwei Methoden: Bei geringer Anzahl ( $n < 100$ ) wurde direkt ausgezählt und bei größerer Anzahl erfolgte die Auswertung über das Programm *ImageJ*.

Als „lebend“ wurden alle rein grünen Bakterien gezählt, als „tot“ bereits diejenigen, die leicht grün-orange angefärbt wurden, da man hier i.d.R. von einer irreversiblen Beschädigung der Zellmembran ausgehen muss, was für das Bakterium mit dem Tod gleichzusetzen ist. Epithelzellen, welche in der hier angewandten Fluoreszenzmikroskopie rot dargestellt werden, wurden nicht mitgezählt, um das Ergebnis nicht zu verfälschen.

### 3.3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und die Anfertigung der Grafiken erfolgte über das Programm IBM® SPSS® Statistics (Version 25). Den Balkendiagrammen wurde ein Konfidenzintervall von 95% zugrunde gelegt. Die Bestimmung der Signifikanzen erfolgte im paarweisen Vergleich nach dem Mann-Whitney-U-Test.

## 3.4 Versuchsdurchführung TEM

### 3.4.1 Probensammlung und -fixierung

Um einen ausreichenden Abstand zu den mundhygienischen Maßnahmen zu erhalten, erfolgte die Versuchsdurchführung vormittags mit einem etwa zweistündigen Abstand zum Frühstück. Die Versuchspersonen sammelten zunächst für ca. eine Minute 1,8 ml Ruhespeichel in einem Eppendorf Tube<sup>®</sup>. Anschließend spülten sie für 30 Sekunden mit 10 ml der Prüfsubstanz, welche daraufhin ausgespuckt wurde. Eine Minute, 30 Minuten und zwei Stunden nach dem Spülen wurden erneut für etwa eine Minute 1,8 ml Speichel gesammelt. Die Proben wurden jeweils in einem ersten Schritt bei 5.000 rpm für sechs Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und das Pellet in der Fixierlösung (1% Formaldehyd und 1% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten erfolgte ein erneutes Zentrifugieren bei 5.000 rpm für sechs Minuten. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in 0,1 M Cacodylatpuffer resuspendiert und für zehn Minuten inkubiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Zum Schluss wurde das Pellet ein letztes Mal in 0,1 M Cacodylatpuffer resuspendiert und bei 4°C bis zur Einbettung gelagert.

### 3.4.2 Einbettung der Proben

Die Einbettung, die Herstellung der Ultradünnschnitte und die Anfertigung der transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen gestaltete sich wie folgt:

Die Proben wurden zunächst bei 5.000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurde das Pellet in 2% Osmiumlösung resuspendiert und für eine Stunde im Dunkeln auf einer Schüttelplatte inkubiert. Hiernach erfolgte eine zweite Zentrifugation bei 5.000 rpm für 10 Minuten und eine erneute Abnahme des Überstandes. Das entstandene Pellet wurde in einem kleinvolumigen Eppendorf Tube<sup>®</sup> mit 0,1 M Cacodylatpuffer resuspendiert – gerade so, dass das Pellet mit Puffer überdeckt und somit eine hohe Konzentration der Probe gewährleistet ist. Low-Melting-Agarose wurde erwärmt und 50 µl hiervon zusammen mit 50 µl der in 0,1 M Cacodylatpuffer gelösten Probe in ein Eppendorf Tube<sup>®</sup> pipettiert und resuspendiert. Die Agarose ließ man für ca. 15 Minuten aushärten und entfernte das Agarose-Probe-Pellet aus dem Eppendorf Tube<sup>®</sup>. Mit einer Rasierklinge wurde

die Probe getrimmt. Abschließend erfolgte der Übergang zur herkömmlichen Entwässerung und die anschließende Einbettung in Araldite CY212 (Agar Scientific Ltd, Stansted, UK) (Tab. 2).

### 3.4.3 Auswertung der Proben

Die Ultradünnschnitte wurden mit dem Ultramikrotom Leica EM UC7, bestückt mit dem Diamantmesser Microstar 45° (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland), in einer Schichtstärke von 65 nm hergestellt. Die Schnitte wurden auf mit Pioloform-F beschichteten Kupferschlitzblenden der Größe 1x2 mm (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) aufgezogen. Die Kontrastierung erfolgte für sechs Minuten mit Uranylacetat und anschließend für drei Minuten mit 3%igem Bleicitrat. Die Aufnahmen wurden mit dem Transmissionselektronenmikroskop *Tecnai 12* und der Software *iTEM* gemacht. Insgesamt wurden 784 Aufnahmen angefertigt. Der Vergrößerungsfaktor lag zwischen 690–98.000, wobei der größte Anteil auf den Bereich zwischen 11.000–30.000 entfiel.

**Tab. 2: Einbettung der TEM-Proben in Araldit; RT= Raumtemperatur**

<b>1. Tag Entwässerung bis Araldit-Aceton-Gemisch (3% Beschleuniger)</b>		
Schritt Nr.	Aktion	Bedingungen
1	1 x 10 min Ethanol 50%	im <b>offenen</b> Rollrandglas, bei RT
2	2 x 10 min Ethanol 70%	„
3	2 x 10 min Ethanol 90%	„
4	2 x 10 min Ethanol 100%	„
5	2 x 20 min Aceton 100%	im <b>geschlossenen</b> Rollrandglas, bei RT unter Abzug
6	über Nacht Araldit-Aceton-Gemisch	im <b>offenen</b> Rollrandglas, bei RT, unter Abzug
<b>2. Tag Umsetzen in reines Araldit-Gemisch (2% Beschleuniger)</b>		
7	Araldit-Gemisch ansetzen	RT
8	Araldit-Gemisch in neue, beschriftete Rollrandgläser füllen	„
9	Präparate umsetzen	„
10	über Nacht	im <b>offenen</b> Rollrandglas, bei RT, unter Abzug
<b>3. Tag Umsetzen in Silikonformen mit Araldit-Gemisch (2% Beschleuniger)</b>		
11	Araldit-Gemisch ansetzen	
12	Die Vertiefungen der Einbettformen zur Hälfte mit dem Araldit-Gemisch füllen, vorsichtig die Präparate überführen. Hierbei die Anschnittseite zur Vertiefungsspitze positionieren.	
13	Zettelchen mit TEM-Nummern am unteren Vertiefungsrand schräg hinzufügen.	
14	Die Vertiefung der Einbettformen leicht überhöht mit dem Araldit-Gemisch auffüllen.	
15	Die Einbettformen für 2 Tage bei 65°C zum Auspolymerisieren in den Brutschrank stellen	

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung

Ziel der Untersuchung ist der Einfluss verschiedener Mundspüllösungen in ihrer antibakteriellen Wirkung auf die Speichelbakterien. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurde eine Negativkontrolle mit Wasser (*Aqua dest.*) und eine Positivkontrolle mit 0,2%-Chlorhexidindigluconat durchgeführt. Ziel der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung ist, zu zeigen, ob bei den Prüfsubstanzen *Chitosan*, *Hydroxylapatit* und *Tanninsäure* eine antibakterielle Wirkung vorliegt oder nicht.

Bei dem Versuch wurden insgesamt zwei Durchgänge durchgeführt, in denen die Probanden 1,8 ml Speichel zu den vier Zeitpunkten *vor*, *1 min nach*, *30 min nach* und *2 h nach dem Spülen* sammelten.

#### 4.1.1 Mundspülung mit Wasser

Auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen lässt sich qualitativ keine Veränderung der Zellvitalität feststellen (Abb. 4). Die quantitative Auswertung mittels *ImageJ* ergibt bei der Kontrolle mit Wasser eine Minute nach dem Spülen im Mittel über die Probanden hinweg eine Abnahme der Zellvitalität um etwa 5% auf 75%. Sie bleibt auf diesem Niveau und erreicht nach zwei Stunden wieder nahezu ihren Ausgangswert. Die Standardabweichung liegt zwischen ca. 15,5-18% (Tab. 3). Die Anzahl der auswertbaren Bilder betrug zwischen 68 und 74.

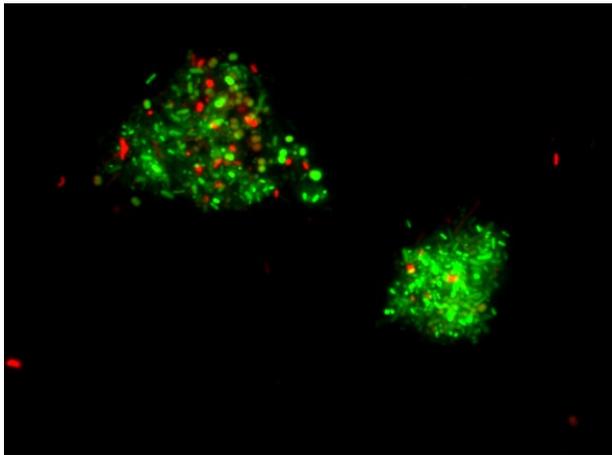
**Tab. 3: Deskriptive Statistik über die bakteriellen Zellvitalitäten in Prozent unter Anwendung der Spüllösung Wasser. Die Daten stammen von allen Probanden und aus beiden Durchgängen; n= Anzahl der Bilder**

	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std.-Abweichung
vor dem Spülen	74	33	100	79,8	16,1
1 min nach dem Spülen	68	24	100	75,3	17,0
30 min nach dem Spülen	72	32	100	73,0	18,2
2 h nach dem Spülen	74	32	100	78,5	15,6

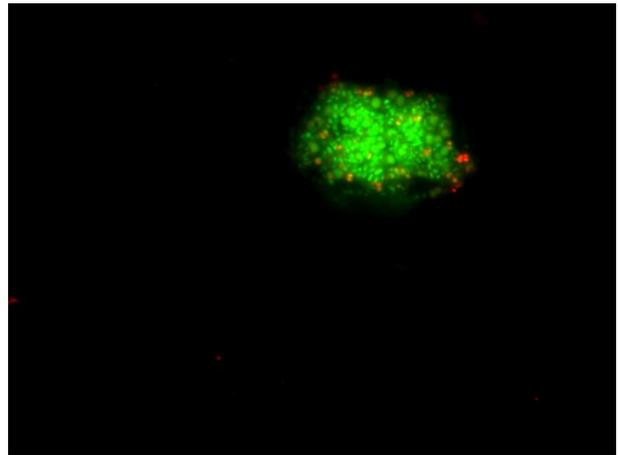
Die Medianwerte belaufen sich zu den vier Zeitpunkten auf 88, 77, 79 und 84%, das obere Quartil auf 95, 90, 89 bzw. 92% und das untere Quartil auf 68, 63, 62 und 71%. Die Maxima liegen allesamt bei 100% und die Minima fallen von 33 auf 24 % nach dem Spülen und steigen schließlich wieder auf 32%, jedoch mit zwei Ausreißern zwei Stunden nach dem Spülen bei 40 und bei 32% (Abb. 5).

Im Liniendiagramm (Abb. 6) erkennt man – aufgeschlüsselt auf die einzelnen Probanden – den Verlauf der Zellvitalität über die Zeit. Auffällig ist das allgemein reduzierte Vitalitätsniveau um etwa 15% von Proband 4 sowie der inverse Verlauf der Vitalitätswerte zwischen 30 Minuten und zwei Stunden von Proband 2.

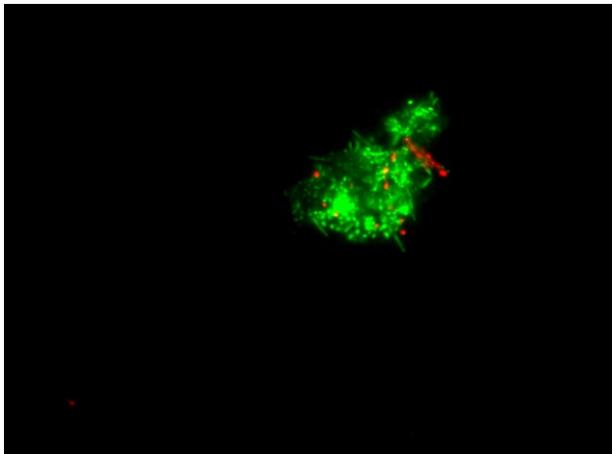
vor dem Spülen (p1)



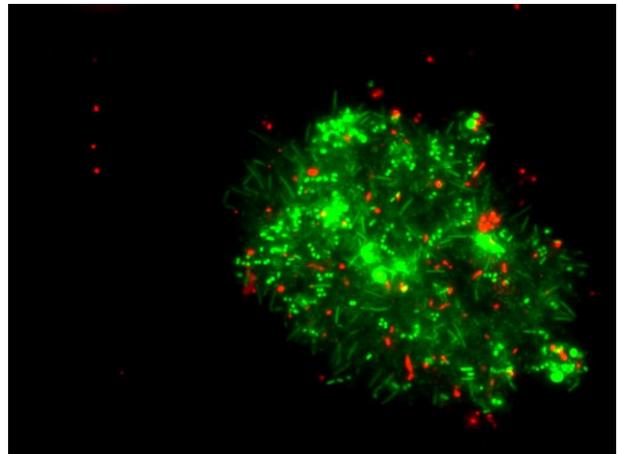
1 min nach dem Spülen (p2)



30 min nach dem Spülen (p2)



2 h nach dem Spülen mit Wasser (p5)



**Abb. 4:** Auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Speichelbakterien lässt sich nach dem Spülen mit der Spüllösung *Wasser* keine Veränderung erkennen. Lebende Speichelbakterien wurden grün angefärbt, abgestorbene rot; Vergrößerung: 1.000-fach; p=Proband.

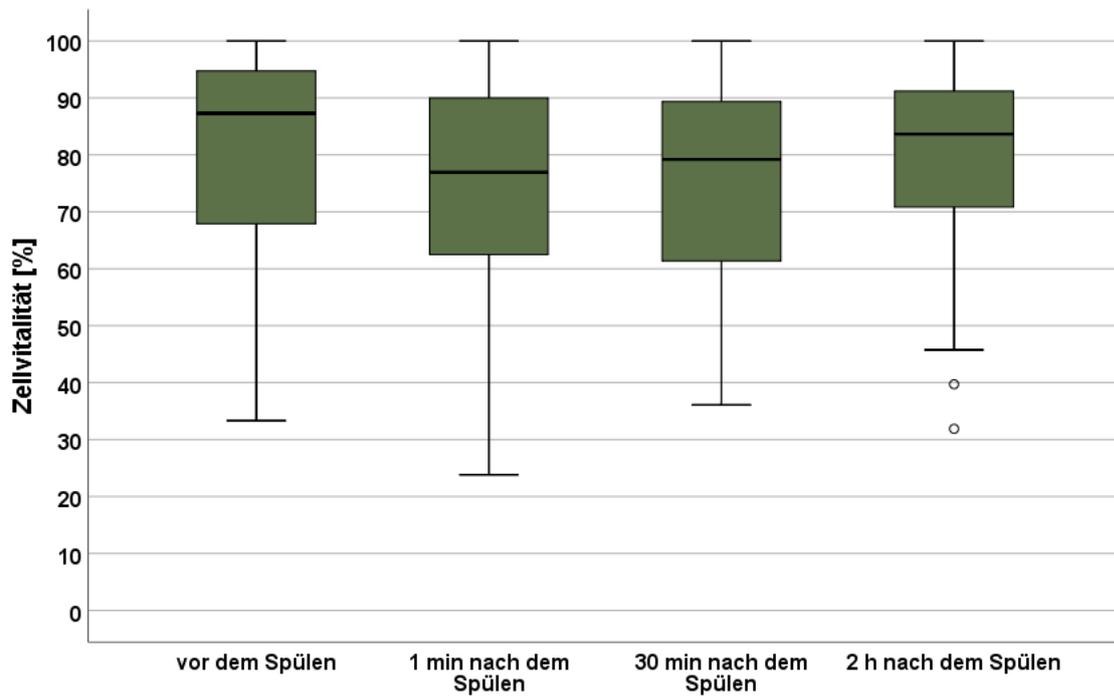


Abb. 5: Boxplot-Diagramm der bakteriellen Zellvitalitäten in Prozent unter Anwendung der Spüllösung *Wasser* aufgeschlüsselt auf die vier Zeitpunkte. Es lässt sich ein leichtes Abfallen der bakteriellen Zellvitalität mit anschließender Erholung erkennen. Die Daten stammen von allen Probanden und aus beiden Durchgängen.

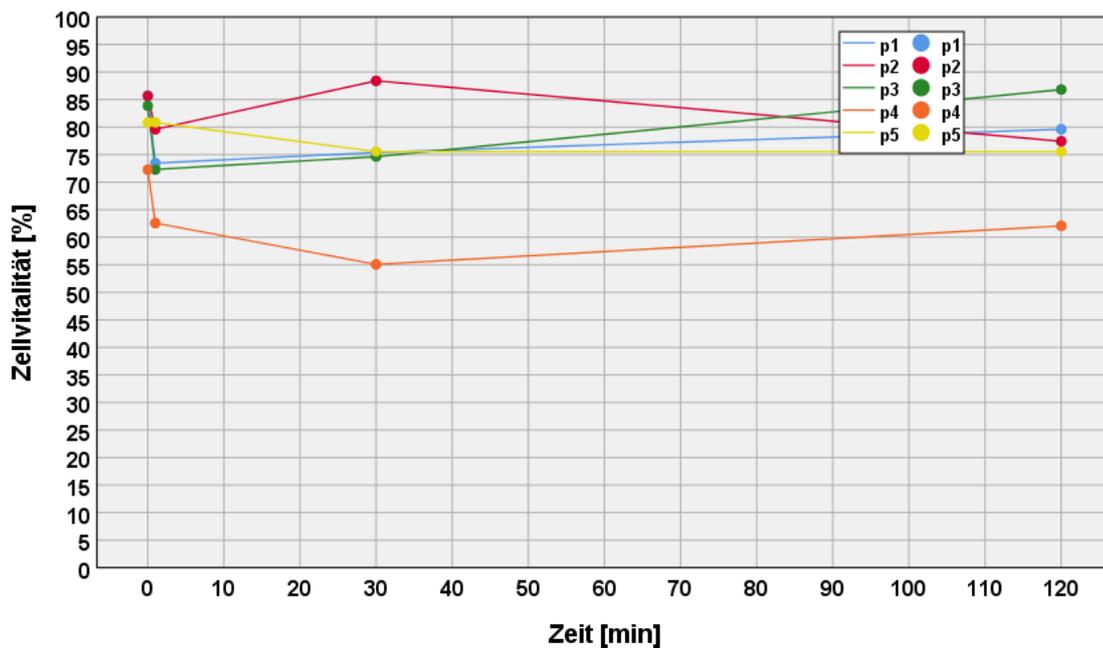


Abb. 6: Verlauf der bakteriellen Zellvitalitäten in Prozent über die Zeit unter Anwendung der Spüllösung *Wasser* aufgeschlüsselt auf die fünf Probanden (p1-p5). Man erkennt unterschiedliche Ausgangswerte der bakteriellen Zellvitalität, welche initial abfällt und sich anschließend erholt (Ausnahme: Proband 2). Die Daten stammen aus beiden Durchgängen.

#### 4.1.2 Mundspülung mit Chlorhexidin

Schon anhand der fluoreszenzmikroskopischen Bilder (Abb. 7) erkennt man eine deutliche antibakterielle Wirkung der 0,2%igen Chlorhexidin-Mundspüllösung. Von einem größtenteils grünen Bild – also grün angefärbten, d.h. lebendigen Bakterien – ändert es sich nach einer Minute in ein überwiegend oranges und schließlich in ein rot angefärbtes nach 30 Minuten. Dass sich die Zellvitalität nach zwei Stunden erholt hat, erkennt man im mehrheitlichen Vorliegen von lebenden Bakterien. Eine Restwirkung lässt sich zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zu den Bildern vor der Spülung nachweisen.

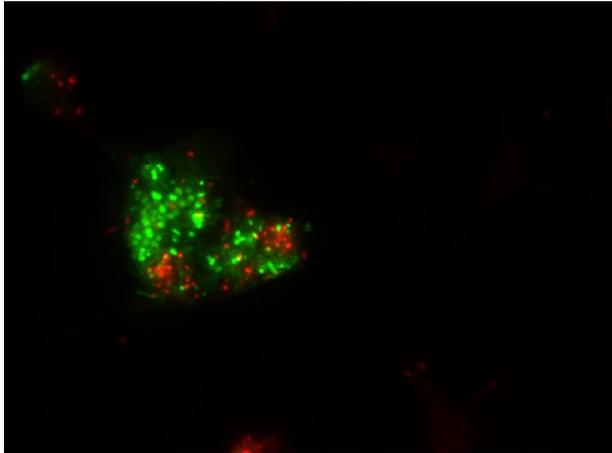
Bei der Positivkontrolle mit 0,2%-Chlorhexidindigluconat ist nach einer Minute im Mittel ein Abfall der Zellvitalität um 44% auf etwa 33% zu sehen. Auch der Wert nach einer halben Stunde liegt auf diesem Niveau. Nach zwei Stunden lässt sich ein Anstieg auf ca. 52% beobachten. Die Standardabweichung beträgt zwischen 17 und 20% zu den ersten drei Zeitpunkten und 25% zwei Stunden nach dem Spülen. Die Anzahl der ausgewerteten Bilder liegt im Bereich von 67 bis 75 (Tab. 4).

**Tab. 4: Deskriptive Statistik über die bakteriellen Zellvitalitäten in Prozent unter Anwendung der Spüllösung 0,2%-CHX. Die Daten stammen von allen Probanden und aus beiden Durchgängen; n= Anzahl der Bilder**

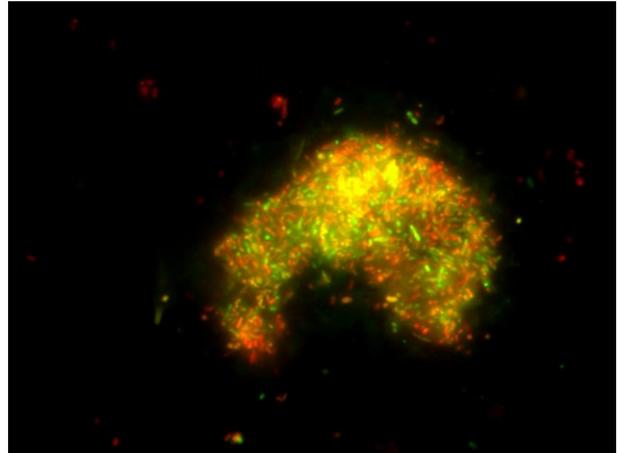
	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std.-Abweichung
vor dem Spülen	73	34	100	77,2	16,7
1 min nach dem Spülen	75	0	100	32,7	20,1
30 min nach dem Spülen	71	1	81	32,6	18,2
2 h nach dem Spülen	67	6	99	52,4	24,5

Die Medianwerte betragen zu den vier Zeitpunkten 80, 30, 30 und 49%, die oberen Quartile 92, 43, 43 bzw. 69% und die unteren 67, 21, 20 und 33%. Die Maxima liegen bei 100, 69, 75 und 99%, mit je zwei Ausreißern zum zweiten und dritten Messzeitpunkt. Bei ersterem weisen sie Werte von 100 und 96, bei zweiterem Werte von 80 und 81% auf. Die Minima erreichen 34, 0, 1 und 6% (Abb. 8).

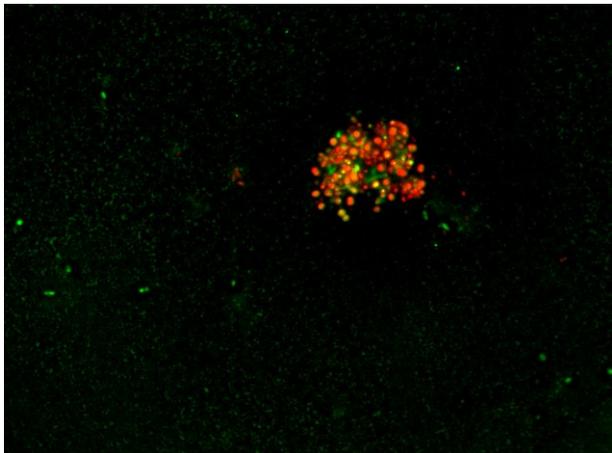
vor dem Spülen (p5)



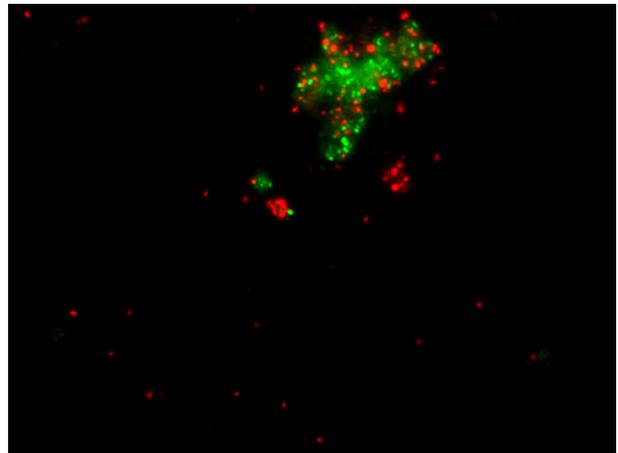
1 min nach dem Spülen (p1)



30 min nach dem Spülen (p4)



2 h nach dem Spülen (p5)



**Abb. 7:** Auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Speichelbakterien bei Anwendung der Spülösung 0,2%-CHX erkennt man eine deutliche Abnahme der bakteriellen Zellvitalität. Eine Wirkung lässt sich auch noch nach zwei Stunden beobachten. Lebende Speichelbakterien wurden grün angefärbt, abgestorbene rot; Vergrößerung: 1.000-fach; p= Proband.

Die Liniendiagramme (Abb. 9) zeigen die Zellvitalität im zeitlichen Verlauf, aufgeschlüsselt in die einzelnen Probanden. Auffällig ist hierbei die bereits vor der Spülung herabgesetzte Zellvitalität der Speichelbakterien von Proband 4 und 5.

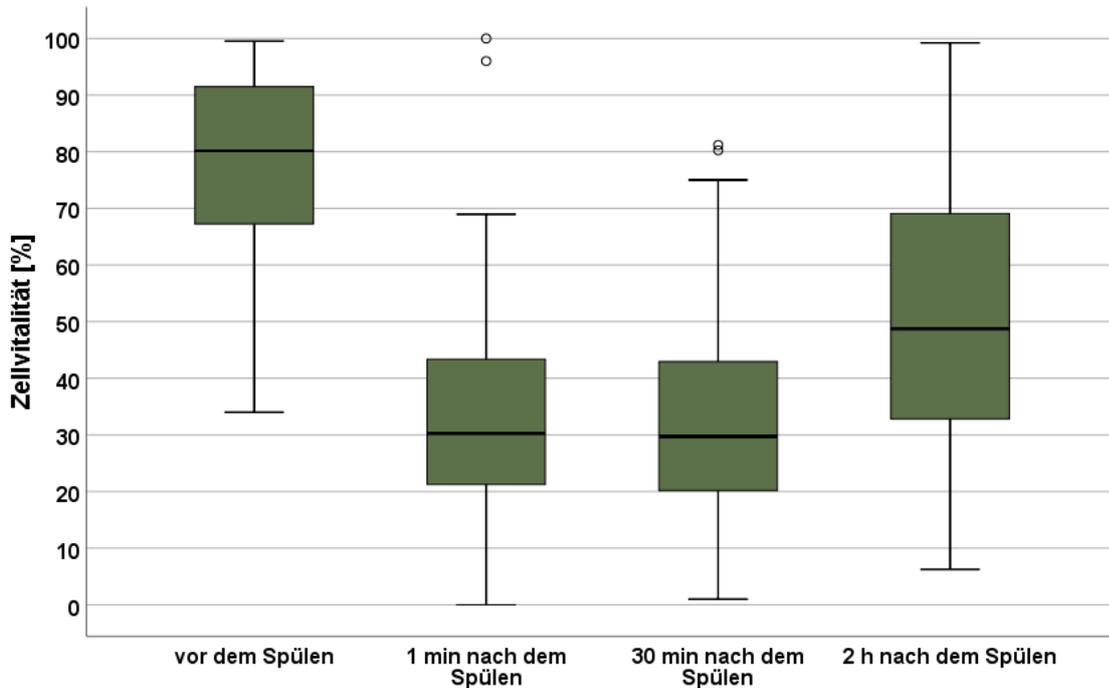


Abb. 8: Boxplot-Diagramm der bakteriellen Zellvitalitäten in Prozent unter Anwendung der Spüllösung 0,2%-CHX aufgeschlüsselt auf die vier Zeitpunkte. Es lässt sich ein deutliches Abfallen der bakteriellen Zellvitalität erkennen. Eine Erholung derselben ist erst zum letzten Zeitpunkt, zwei Stunden nach dem Spülen, festzustellen. Die Daten stammen von allen Probanden und aus beiden Durchgängen.

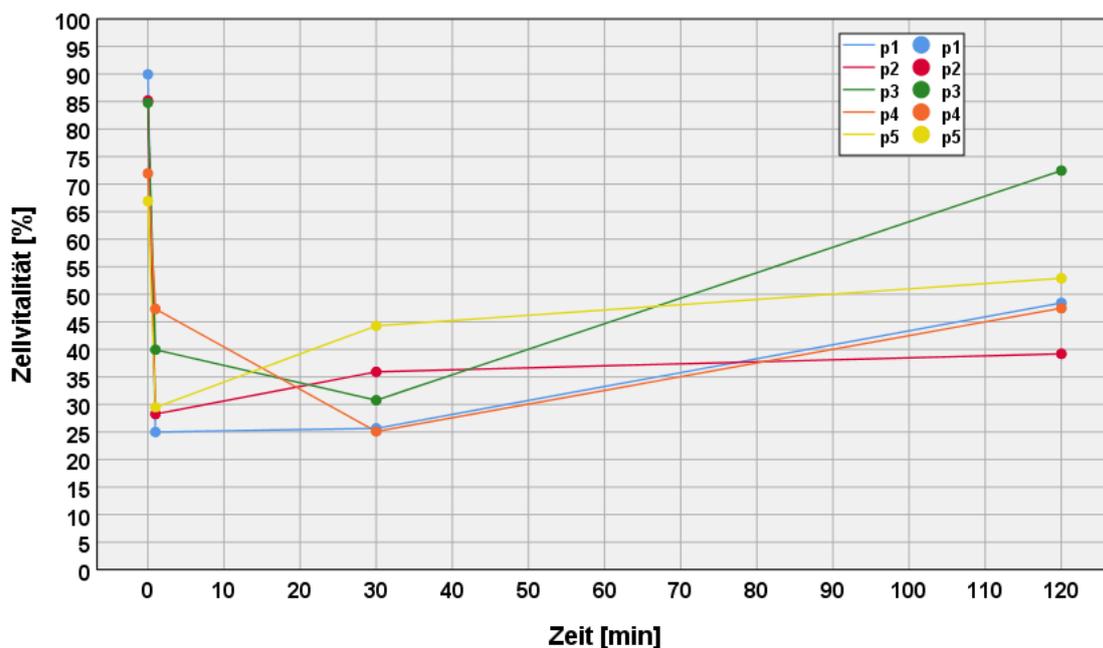


Abb. 9: Verlauf der bakteriellen Zellvitalitäten in Prozent über die Zeit unter Anwendung der Spüllösung 0,2%-CHX aufgeschlüsselt auf die fünf Probanden (p1-p5). Man erkennt initial einen deutlichen Abfall der bakteriellen Zellvitalität und eine anschließende Erholung. Die Daten stammen aus beiden Durchgängen.

### 4.1.3 Mundspülung mit Chitosan

Auf den fluoreszenzmikroskopischen Bildern lässt sich ein sehr deutlicher Wirkungseintritt nach dem Spülen erkennen (Abb. 10). Dieser hat sich nach einer halben Stunde bereits relativiert; nach zwei Stunden ist keine antibakterielle Wirkung mehr feststellbar.

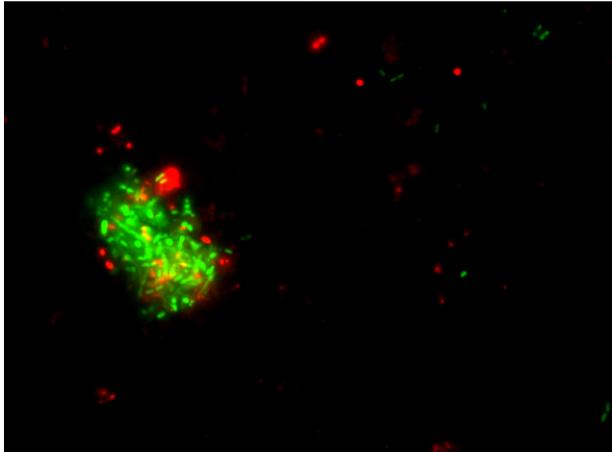
Die Mundspüllösung *Chitosan* zeigt eine Minute nach dem Spülen einen Abfall der Zellvitalität um 40% auf etwa 44%. Nach einer halben Stunde erholt sich dieser Wert auf 62% und liegt nach zwei Stunden mit 75% fast wieder auf dem Ausgangswert. Die Standardabweichung beträgt vor dem Spülen 13%, nach dem Spülen liegt sie zwischen 20 bis 25%. Die Anzahl der ausgewerteten Bilder liegt zwischen 67 bis 73 (Tab. 5).

**Tab. 5: Deskriptive Statistik über die bakteriellen Zellvitalitäten in Prozent unter Anwendung der Spüllösung 0,5%-Chitosan. Die Daten stammen von allen Probanden und aus beiden Durchgängen; n= Anzahl der Bilder**

	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std.-Abweichung
vor dem Spülen	73	49	100	83,9	12,9
1 min nach dem Spülen	67	0	85	43,6	24,0
30 min nach dem Spülen	70	0	100	62,1	25,2
2 h nach dem Spülen	69	4	100	75,4	20,1

Die Medianwerte betragen zu den vier Zeitpunkten 89, 52, 63 und 78%, die oberen Quartile 94, 64, 83 bzw. 92% und die unteren 77, 23, 46 und 64%. Die Maxima liegen bei 100, 85, 100 und 100%, die Minima bei 50, 0, 0 und 28% mit zwei Ausreißern. Ersterer liegt beim ersten Messzeitpunkt bei 49%, der andere beim letzten Zeitpunkt bei 4% (Abb. 11).

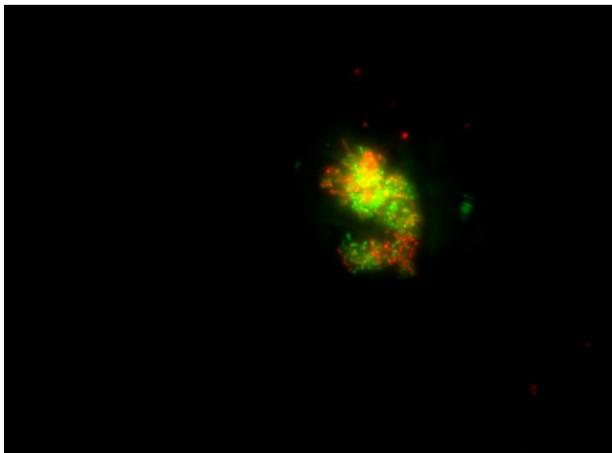
vor dem Spülen (p3)



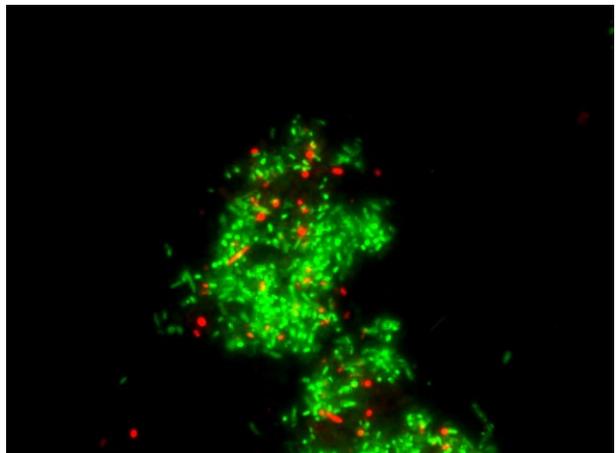
1 min nach dem Spülen (p1)



30 min nach dem Spülen (p1)



2 h nach dem Spülen (p5)



**Abb. 10:** Auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Speichelbakterien unter Anwendung der Spüllösung *0,5%-Chitosan* lässt sich nach einer Minute eine sehr deutliche Abnahme der bakteriellen Zellvitalität feststellen. Nach 30 Minuten ist der antibakterielle Effekt nur noch schwach ausgeprägt und nach zwei Stunden lässt sich keine antibakterielle Wirkung mehr feststellen. Lebende Speichelbakterien wurden grün angefärbt, abgestorbene rot; Vergrößerung: 1.000-fach; p= Proband.

Auffallend bei den Liniendiagrammen (Abb. 12), welche den Verlauf der Zellvitalität über der Zeit darstellen, ist wieder der relativ hohe interindividuelle Abstand des Ausgangswertes der Bakterienvitalität. Proband 2 erreicht mit 90% den höchsten, Proband 4 mit 73% den geringsten Wert. Die Mundspüllösung *Chitosan* wirkt bei den Probanden 1 und 3 auch nach 30 Minuten mit 41 bzw. 46% noch relativ gut. Bei den anderen Probanden lässt sich dies nicht behaupten. Bei Proband 4 scheint die Spüllösung überhaupt nicht zu wirken, betrachtet man den flachen Linienvverlauf.

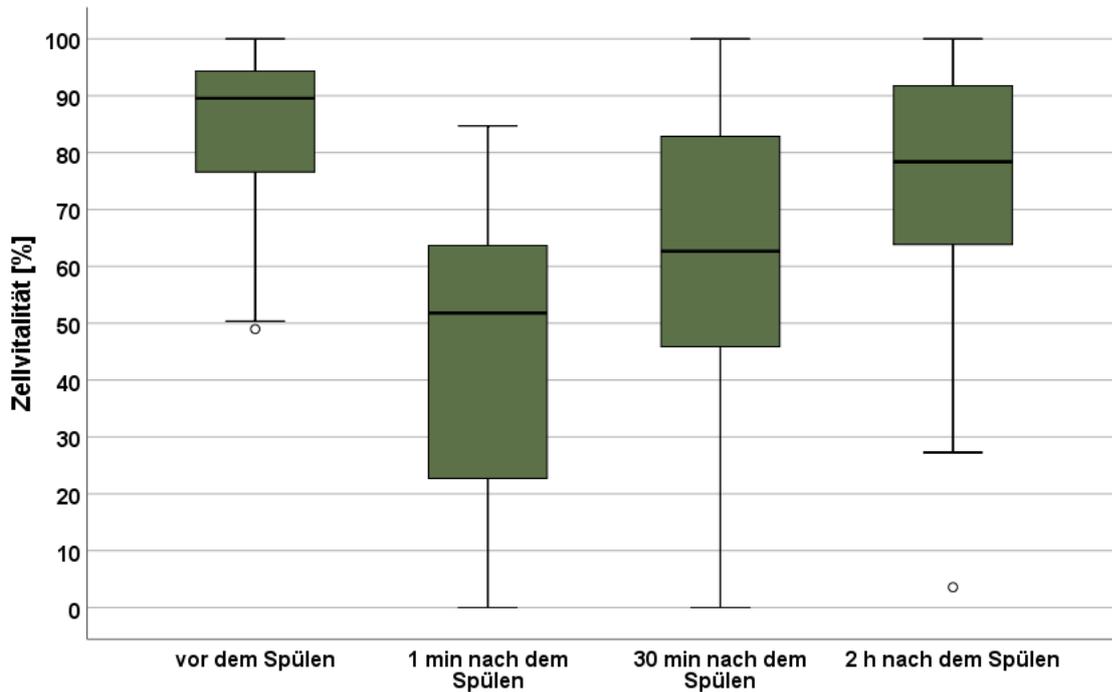


Abb. 11: Boxplot-Diagramm der bakteriellen Zellvitalitäten in Prozent unter Anwendung der Spüllösung 0,5%-Chitosan aufgeschlüsselt auf die vier Zeitpunkte. Es lässt sich ein deutliches Abfallen der bakteriellen Zellvitalität mit anschließender Erholung erkennen. Die Daten stammen von allen Probanden und aus beiden Durchgängen.

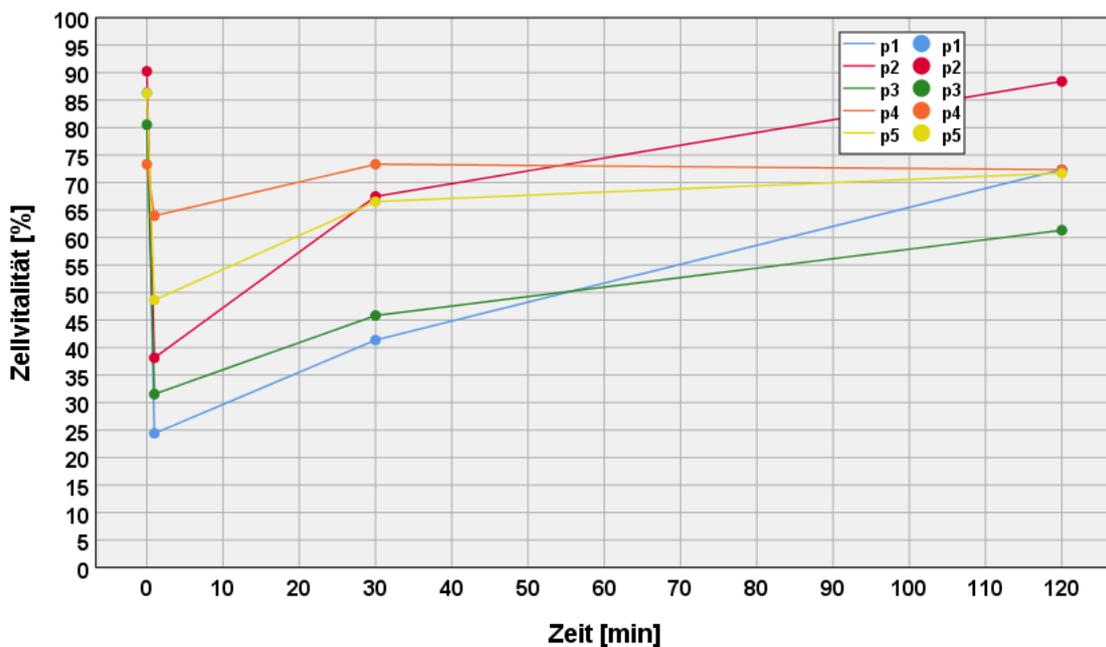


Abb. 12: Verlauf der bakteriellen Zellvitalitäten in Prozent über die Zeit unter Anwendung der Spüllösung 0,5%-Chitosan aufgeschlüsselt auf die fünf Probanden (p1-p5). Man kann bei allen Probanden einen starken initialen Abfall der bakteriellen Zellvitalität und eine anschließende rasche Erholung feststellen. Die Daten stammen aus beiden Durchgängen.

#### 4.1.4 Mundspülung mit Hydroxylapatit

Auf den fluoreszenzmikroskopischen Bildern lässt sich visuell ein leichter Rückgang der Zellvitalität nach einer Minute erahnen. Nach 30 Minuten bzw. nach zwei Stunden ist rein optisch kein Effekt mehr feststellbar (Abb. 13).

Hydroxylapatit zeigt nach einer Minute im Mittel einen Abfall der Zellvitalität um 14% auf 64%. Dieser Wert erholt sich nach 30 Minuten und nach zwei Stunden um jeweils 6% und erreicht damit wieder annähernd den Ausgangswert von 78%. Die Standardabweichungen liegen im Bereich von 18 bis 19,5% (Tab. 6). Die Anzahl der ausgewerteten Bilder beträgt 73 bis 77.

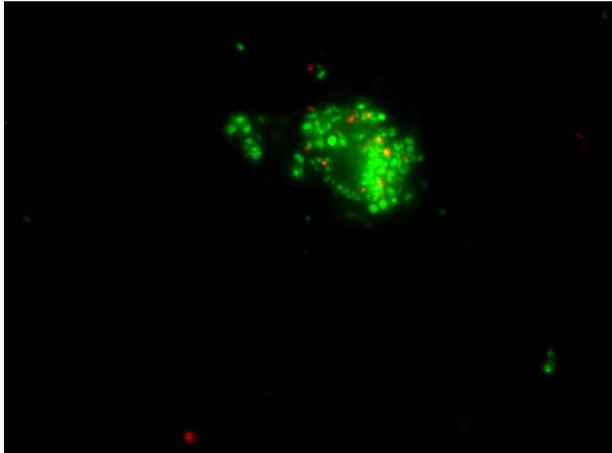
**Tab. 6: Deskriptive Statistik über die bakteriellen Zellvitalitäten in Prozent unter Anwendung der Spüllösung 5%-Hydroxylapatit. Die Daten stammen von allen Probanden und aus beiden Durchgängen; n= Anzahl der Bilder**

	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std.-Abweichung
vor dem Spülen	77	31	100	78,0	17,8
1 min nach dem Spülen	73	29	100	63,6	18,2
30 min nach dem Spülen	75	21	100	70,1	18,8
2 h nach dem Spülen	77	10	100	75,8	19,5

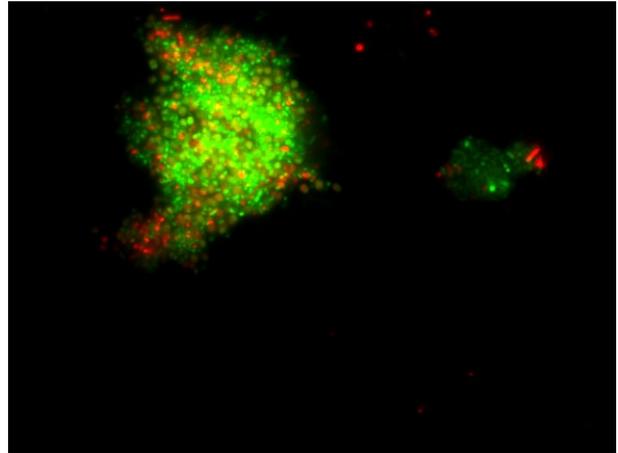
Die Medianwerte betragen zu den vier Zeitpunkten 85, 65, 75 und 79%, die oberen Quartile 94, 78, 85 bzw. 93% und die unteren 66, 50, 60 und 63%. Die Maxima liegen alle bei 100%, die Minima bei 31, 29, 25 und 26% mit zwei Ausreißern. Ersterer liegt beim dritten Messzeitpunkt bei 21%, der andere beim letzten Zeitpunkt bei 10% (Abb. 14).

Das Liniendiagramm in Abb. 15 zeigt erneut eindrücklich die interindividuellen Unterschiede der Ausgangszellvitalität, welche sich um annähernd 20% unterscheiden. Proband 4 weist als einziger einen inversen Linienverlauf zwischen dem zweiten und dritten Messzeitpunkt auf und hat den höchsten Wert nach einer Minute und den niedrigsten nach einer halben Stunde. Insgesamt wirkt sich die Spüllösung *Hydroxylapatit* nur wenig auf die Vitalität der Bakterien aus.

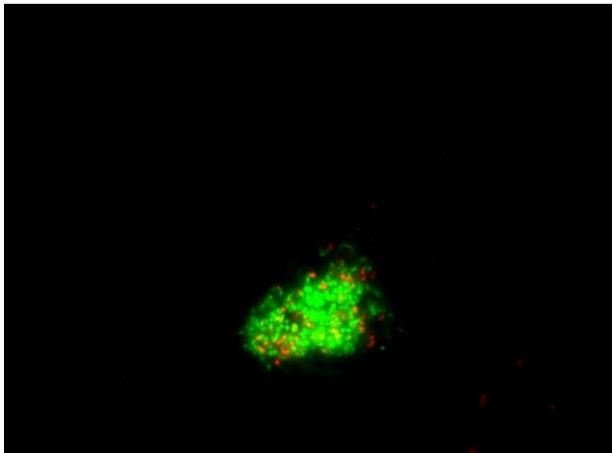
vor dem Spülen (p1)



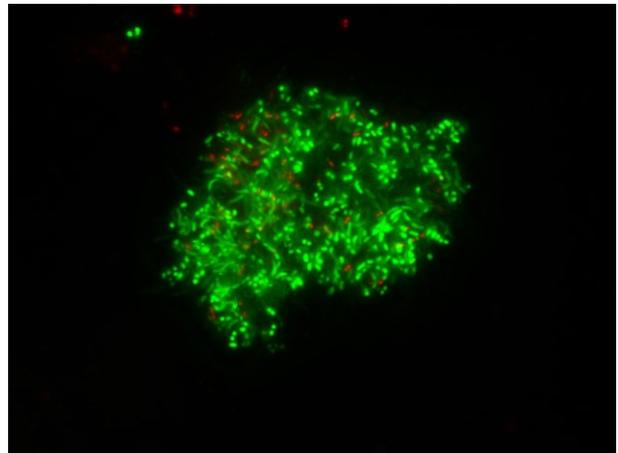
1 min nach dem Spülen (p4)



30 min nach dem Spülen (p5)



2 h nach dem Spülen (p2)



**Abb. 13:** Auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Speichelbakterien unter Anwendung der Spüllösung 5%-*Hydroxylapatit* lässt sich nur nach einer Minute ein schwacher antibakterieller Effekt beobachten. Lebende Speichelbakterien wurden grün angefärbt, abgestorbene rot; Vergrößerung: 1.000-fach; p= Proband.

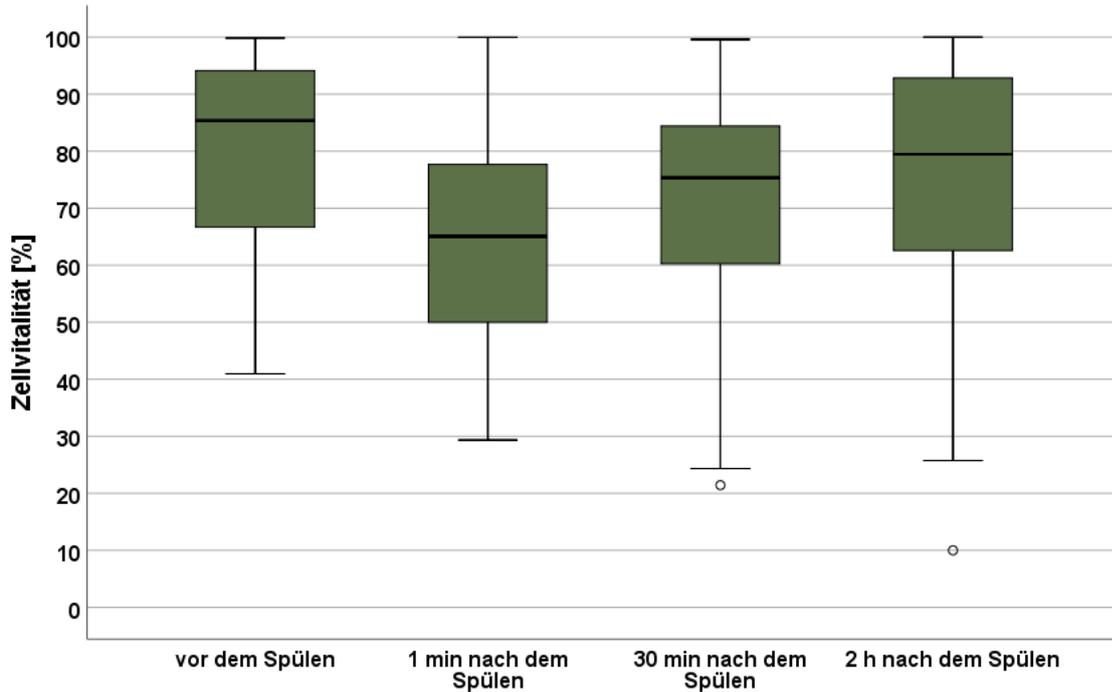


Abb. 14: Boxplot-Diagramm der bakteriellen Zellvitalität in Prozent unter Anwendung der Spüllösung 5%-Hydroxylapatit aufgeschlüsselt auf die vier Zeitpunkte. Es lässt sich ein Abfallen der bakteriellen Zellvitalität mit anschließender Erholung erkennen. Die Daten stammen von allen Probanden und aus beiden Durchgängen.

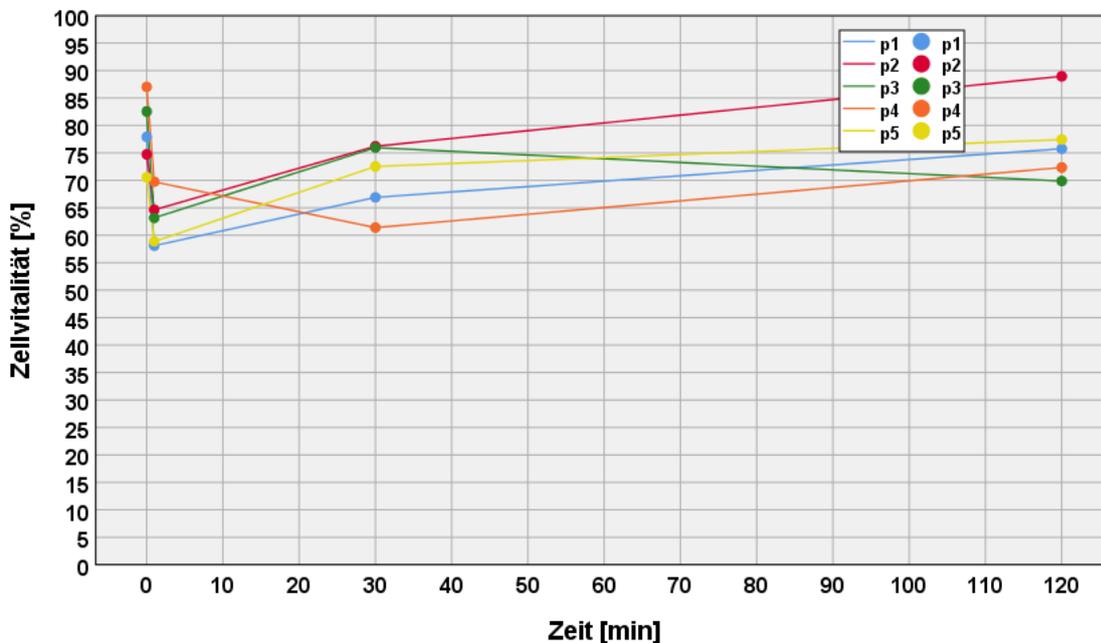


Abb. 15: Verlauf der bakteriellen Zellvitalitäten in Prozent über die Zeit unter Anwendung der Spüllösung 5%-Hydroxylapatit aufgeschlüsselt auf die fünf Probanden (p1-p5). Es ist ein initialer schwacher Abfall der bakteriellen Zellvitalität zu erkennen, welcher sich im Zeitverlauf wieder normalisiert (Ausnahme: Proband 4). Die Daten stammen aus beiden Durchgängen.

### 4.1.5 Mundspülung mit Tanninsäure

Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder zeigen nach einer Minute einen deutlichen, nach einer halben Stunde immerhin noch einen leichten Rückgang der Zellvitalität (Abb. 16).

Die Spüllösung *Tanninsäure* weist eine Minute nach dem Spülen eine Bakterienzellvitalität von 51% auf, welche somit um 29% gefallen ist. Nach einer halben Stunde erholt sich diese um 9%, nach zwei um 17% und erreicht somit wieder annähernd den Ausgangswert von 80%. Die Standardabweichungen liegen mit den Messzeitpunkten zunehmend bei 17, 21,5, 28,5 und 20%. Die Anzahl der ausgewerteten Aufnahmen beträgt 71 bis 80 (Tab. 7).

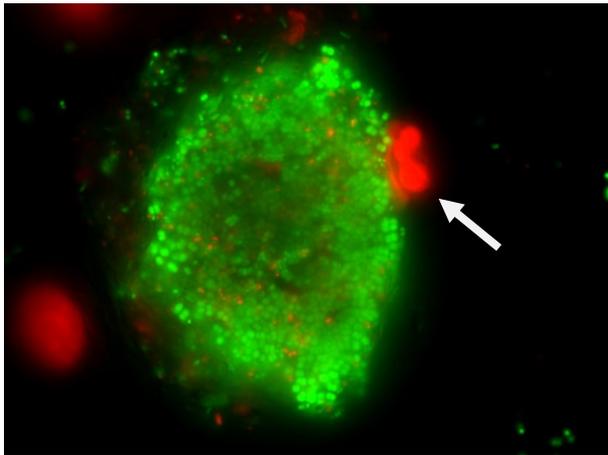
**Tab. 7: Deskriptive Statistik über die bakteriellen Zellvitalitäten in Prozent unter Anwendung der Spüllösung 5%-Tanninsäure. Die Daten stammen von allen Probanden und aus beiden Durchgängen; n= Anzahl der Bilder**

	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std.-Abweichung
vor dem Spülen	76	27	100	79,8	16,9
1 min nach dem Spülen	71	0	99	50,7	21,5
30 min nach dem Spülen	80	0	100	60,5	28,4
2 h nach dem Spülen	74	21	100	77,4	19,9

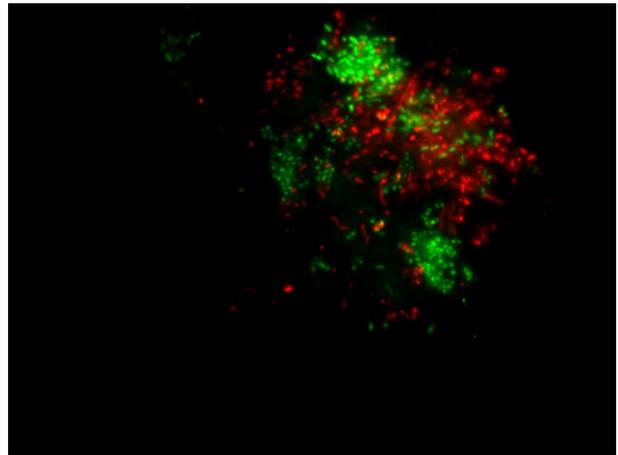
Die Medianwerte betragen zu den vier Zeitpunkten 85, 49, 60 und 82%, die oberen Quartile 96, 63, 81 bzw. 94% und die unteren 70, 38, 39 und 68%. Die Maxima liegen alle bei ca. 100%, die Minima bei 33, 0, 0 und 31% mit vier Ausreißern. Ersterer liegt zum ersten Messzeitpunkt bei 27%, die anderen drei zum letzten Zeitpunkt bei 21, 29 und 30% (Abb. 17).

Das Liniendiagramm auf Abb. 18 zeigt erneut, dass bei Probanden mit niedrigen Ausgangswerten der Zellvitalität – in diesem Fall Proband 3 und 5 – die Effektstärke weniger stark ausgeprägt ist und umgekehrt. Proband 1 weist nach 30 Minuten die tiefsten Vitalitätswerte auf, wohingegen Proband 3 zu diesem Zeitpunkt die Bakterienvitalität betreffend sogar über dem Ausgangswert liegt.

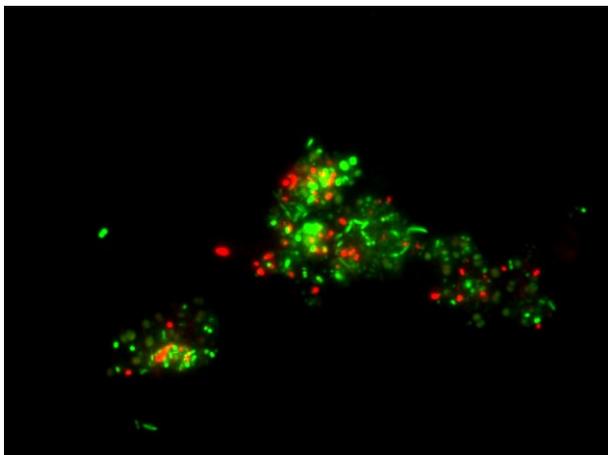
vor dem Spülen (p3)



1 min nach dem Spülen (p2)



30 min nach dem Spülen (p4)



2 h nach dem Spülen (p4)

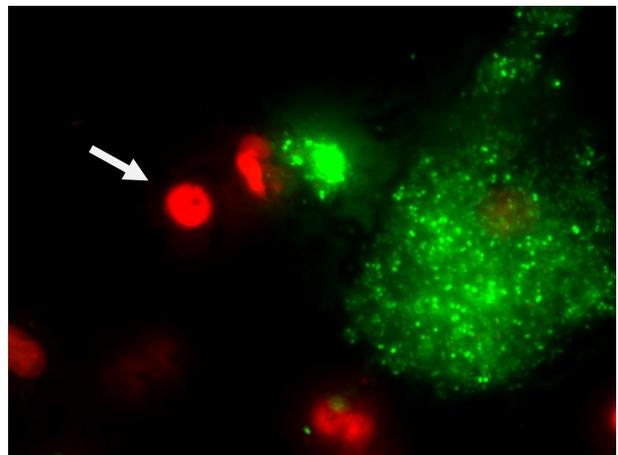


Abb. 16: Auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Speichelbakterien bei Anwendung der Spüllösung 5%-Tanninsäure erkennt man eine Minute nach dem Spülen eine starke Abnahme der bakteriellen Zellvitalität. Nach 30 Minuten ist nur noch ein schwacher antibakterieller Effekt sichtbar. Die weißen Pfeile zeigen auf Epithelzellen. Lebende Speichelbakterien wurden grün angefärbt, abgestorbene rot; Vergrößerung: 1.000-fach; p= Proband.

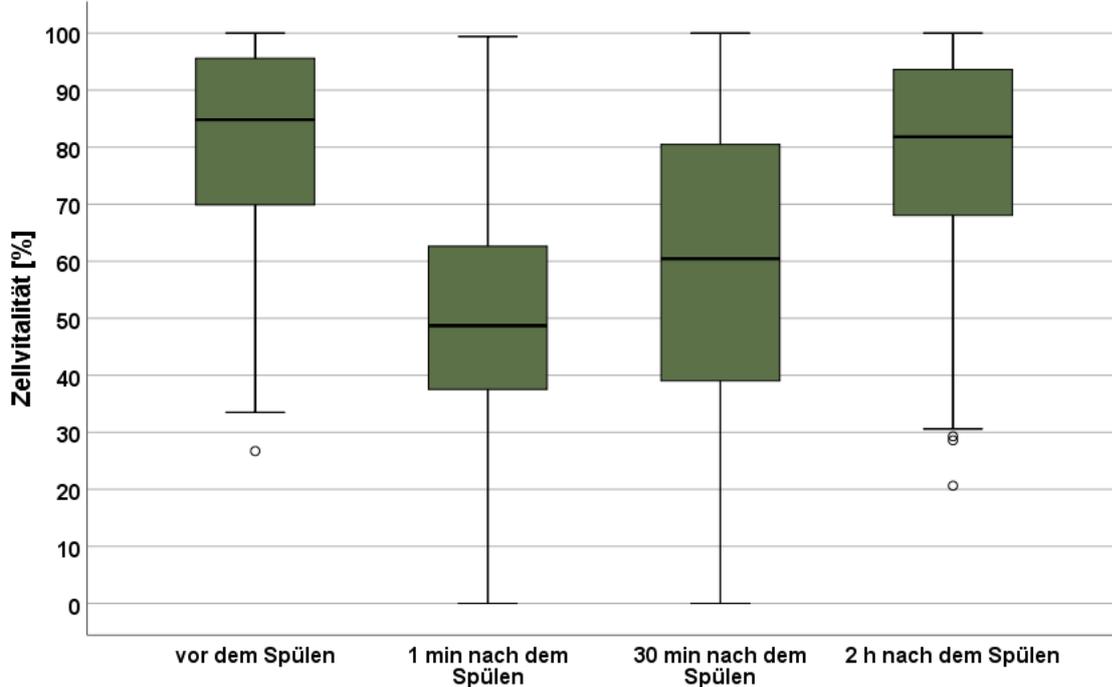


Abb. 17: Boxplot-Diagramm der bakteriellen Zellvitalitäten in Prozent unter Anwendung der Spüllösung 5%-Tanninsäure aufgeschlüsselt auf die vier Zeitpunkte. Es lässt sich ein deutliches Abfallen der bakteriellen Zellvitalität mit anschließender Erholung erkennen. Die Daten stammen von allen Probanden und aus beiden Durchgängen.

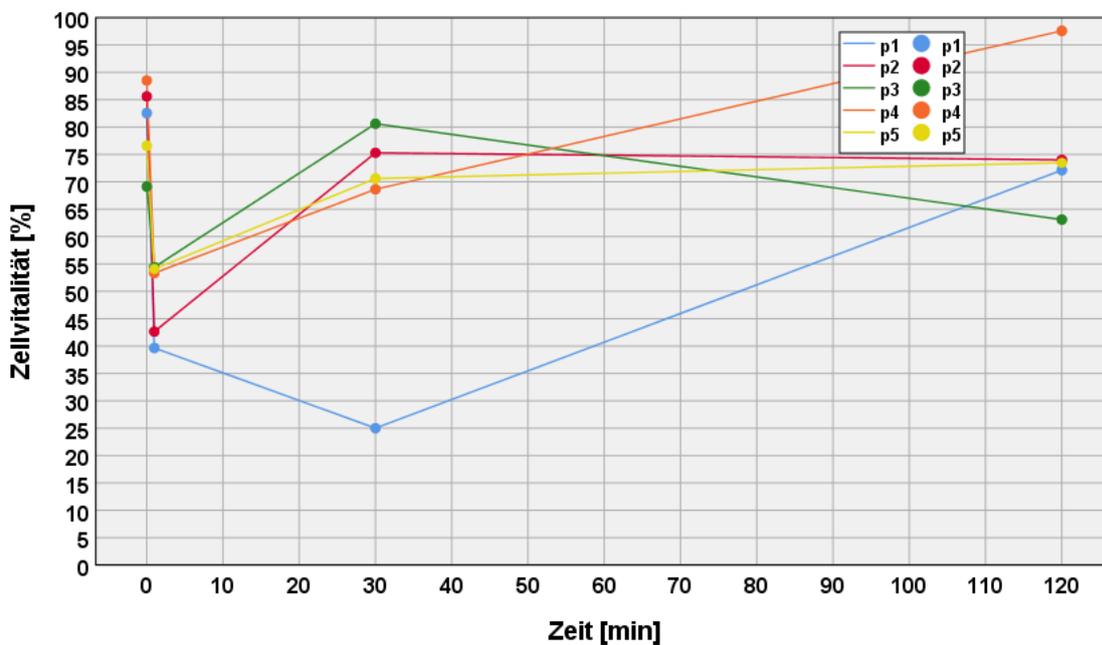


Abb. 18: Verlauf der bakteriellen Zellvitalitäten in Prozent über die Zeit unter Anwendung der Spüllösung 5%-Tanninsäure aufgeschlüsselt auf die fünf Probanden (p1-p5). Die bakterielle Zellvitalität fällt eine Minute nach dem Spülen und normalisiert sich anschließend wieder auf den Ausgangswert (Ausnahme: Proband 1). Die Daten stammen aus beiden Durchgängen.

#### 4.1.6 pH-Einfluss auf Tanninsäure

Dieser Versuch wurde lediglich von Proband 1 durchgeführt. Man erkennt bei den drei pH-Werten 2,5, 5 und 7 der 5%igen Tanninsäure ein Abfallen der Zellvitalität eine Minute nach dem Spülen um je ca. 27%. Die Spüllösung *Salzsäure* mit einem pH-Wert von 2,5 zeigt lediglich einen Abfall um 3%. Nach 30 Minuten ist bei der Tanninsäure mit dem pH-Wert von 2,5 eine Stagnation zu beobachten, bei der mit dem pH-Wert von 5 eine Erholung auf den Ausgangswert und bei der mit dem pH-Wert 7 ein Wiederanstieg um 16%. Die Zellvitalität der Spüllösung *Salzsäure* verhält sich weiterhin konstant auf einem hohen Niveau (Abb. 19 und Tab. 8). Es wurden jeweils acht Bilder ausgewertet.

**Tab. 8: Deskriptive Statistik über die bakteriellen Zellvitalitäten in Prozent unter Anwendung der Spüllösungen 5%-Tanninsäure (pH 2,5; pH 5; pH 7) sowie Salzsäure (pH 2,5). Die Zeitpunkte betragen:  $t_0$  vor dem Spülen,  $t_1$  = 1 min nach dem Spülen,  $t_2$  = 30 min nach dem Spülen; n= Anzahl der Bilder**

	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std.-Abweichung
Tanninsäure pH 2,5 ( $t_0$ )	8	85	98	95,1	4,1
Tanninsäure pH 2,5 ( $t_1$ )	8	45	88	67,9	15,8
Tanninsäure pH 2,5 ( $t_2$ )	8	55	86	69,4	13,8
Tanninsäure pH 5 ( $t_0$ )	8	70	93	84,5	8,8
Tanninsäure pH 5 ( $t_1$ )	8	28	91	57,9	20,1
Tanninsäure pH 5 ( $t_2$ )	8	76	94	85,0	6,6
Tanninsäure pH 7 ( $t_0$ )	8	71	96	87,4	8,9
Tanninsäure pH 7 ( $t_1$ )	8	36	83	58,6	14,0
Tanninsäure pH 7 ( $t_2$ )	8	64	90	74,9	9,0
Salzsäure pH 2,5 ( $t_0$ )	8	89	97	93,0	3,0
Salzsäure pH 2,5 ( $t_1$ )	8	79	96	90,1	6,1
Salzsäure pH 2,5 ( $t_2$ )	8	72	99	90,9	9,2

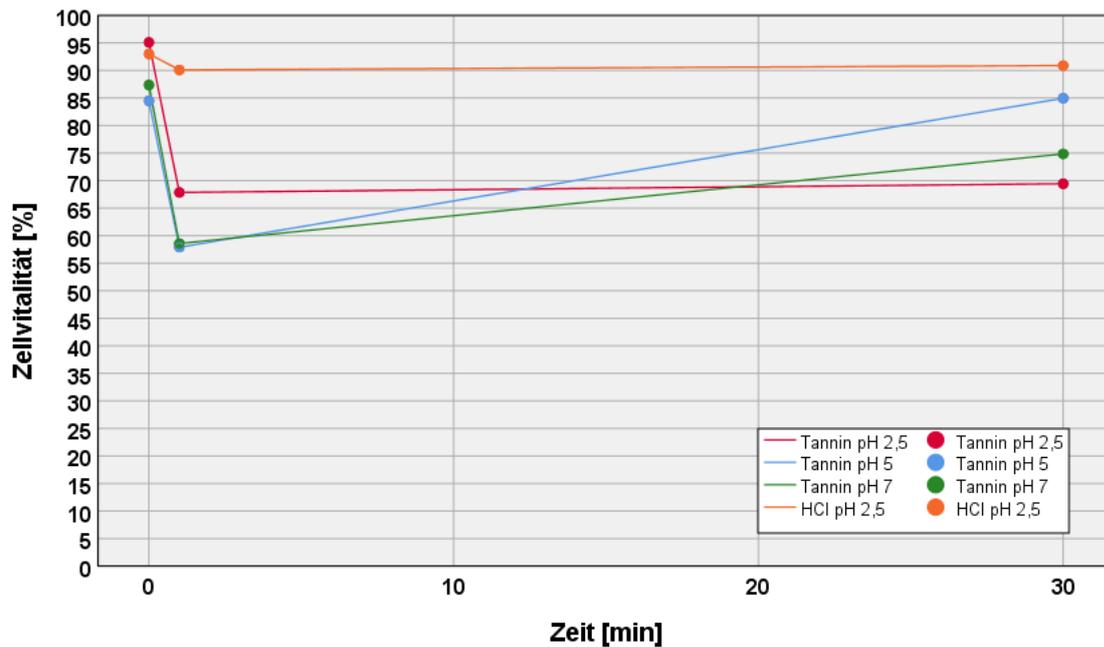
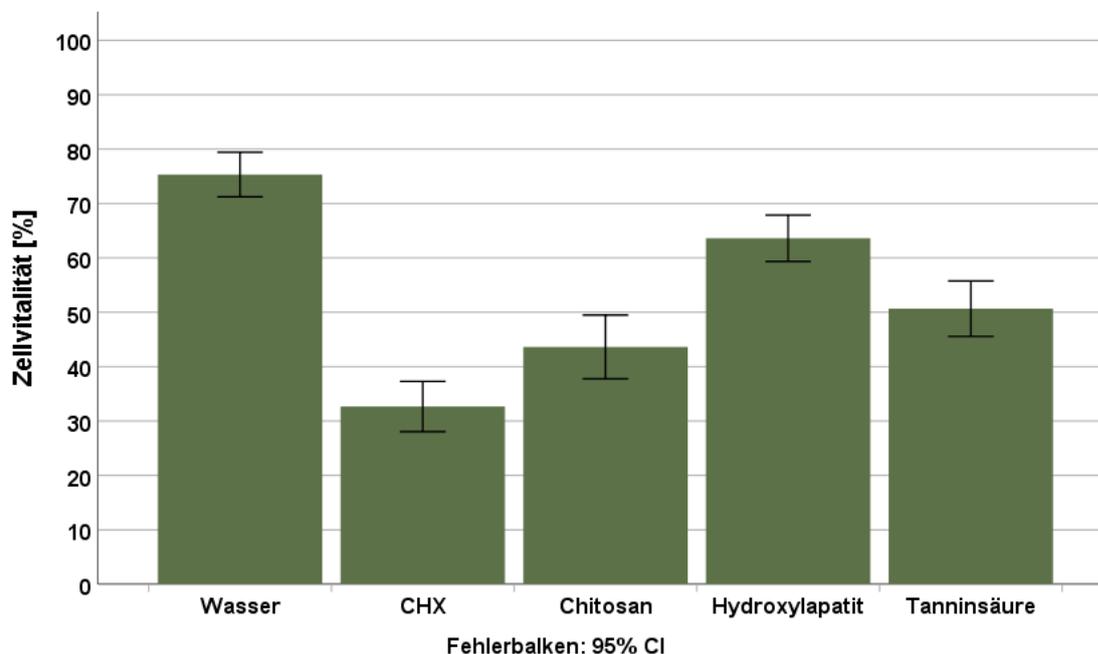


Abb. 19: Verlauf der bakteriellen Zellvitalitäten in Prozent über die Zeit unter Anwendung der Spüllösungen 5%-Tanninsäure mit den drei pH-Werten 2,5, 5 und 7 sowie der Spüllösung *HCl*. Man kann bei den drei Tanninsäure-Spüllösungen eine antibakterielle Wirkung eine Minute nach dem Spülen feststellen. Anschließend erfolgt eine Erholung auf den Initialwert (Ausnahme: Tanninsäure mit pH-Wert 2,5). Die Spüllösung *HCl* zeigt nahezu keinen Effekt auf die bakterielle Zellvitalität. Die Daten stammen lediglich von Proband 1 und aus einem Durchgang.

### 4.1.7 Überblick

#### a. Eine Minute nach dem Spülen



**Abb. 20:** Bakterielle Zellvitalitäten in Prozent 1 min nach dem Spülen mit den getesteten Spüllösungen im Vergleich, gemittelt über alle Probanden und über beide Durchgänge; Konfidenzintervall: 95%.

In Abb. 20 lassen sich die Zellvitalitäten in Abhängigkeit der verschiedenen Spüllösung eine Minute nach dem Spülen ablesen. Die Werte sind gemittelt über alle Probanden und über beide Durchgänge. Das Konfidenzintervall beträgt 95%.

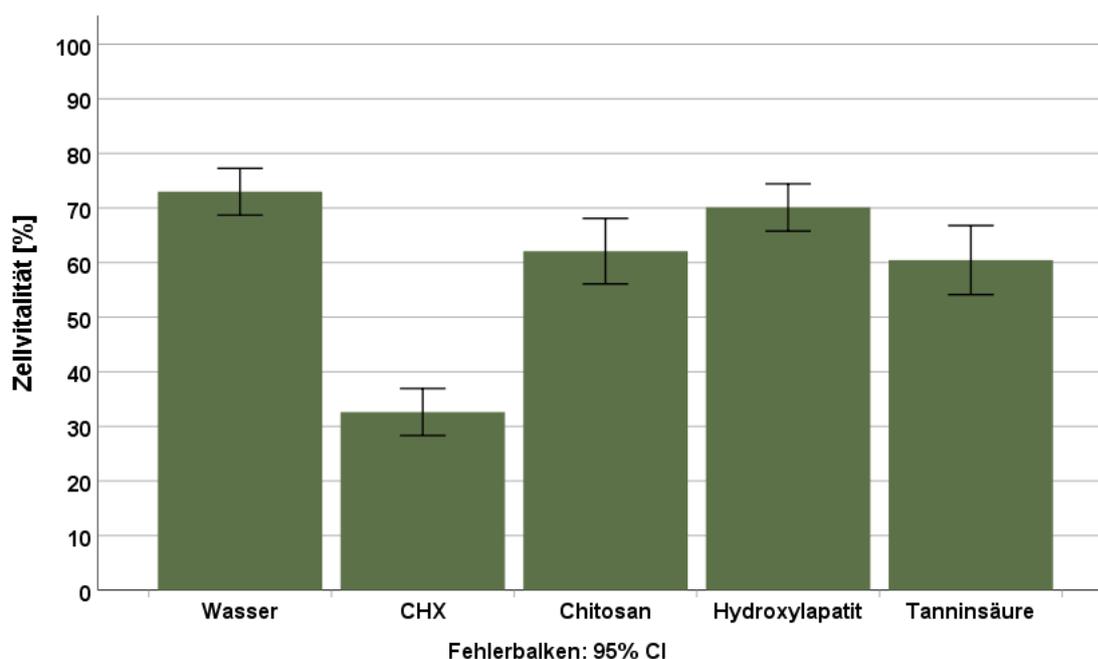
Den niedrigsten Mittelwert weist die Spüllösung *Chlorhexidin* mit 33% auf. Die Spüllösungen *Chitosan* und *Tanninsäure* folgen mit 44% bzw. 51%. *Wasser* stellt mit 75% durchschnittlicher Zellvitalität den höchsten Wert dar. Die Spüllösung *Hydroxylapatit* liegt mit 64% nur wenig darunter.

Eine Minute nach dem Spülen liegen alle getesteten Mundspüllösungen mit dem Mann-Whitney-U-Test im paarweisen Vergleich mit Wasser bei einem Signifikanzniveau  $p$  von unter 0,05 (Tab. 9).

**Tabelle 9: Übersicht über das Signifikanzniveau der getesteten Prüfsubstanzen im paarweisen Vergleich mit Wasser 1 min nach dem Spülen unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests**

Prüfsubstanz	Signifikanz	Signifikanzniveau
0,2%-CHX	signifikant	$p < 0,05$
0,5%-Chitosan	signifikant	$p < 0,05$
5%-Hydroxylapatit	signifikant	$p < 0,05$
5%-Tanninsäure	signifikant	$p < 0,05$

b. 30 Minuten nach dem Spülen



**Abb. 21: Bakterielle Zellvitalitäten in Prozent 30 min nach dem Spülen mit den getesteten Spüllösungen im Vergleich, gemittelt über alle Probanden und über beide Durchgänge; Konfidenzintervall: 95%.**

In Abb. 21 lassen sich die Zellvitalitäten in Abhängigkeit der verschiedenen Spüllösung 30 Minuten nach dem Spülen ablesen. Die Werte sind gemittelt über alle Probanden und über beide Durchgänge. Das Konfidenzintervall beträgt 95%.

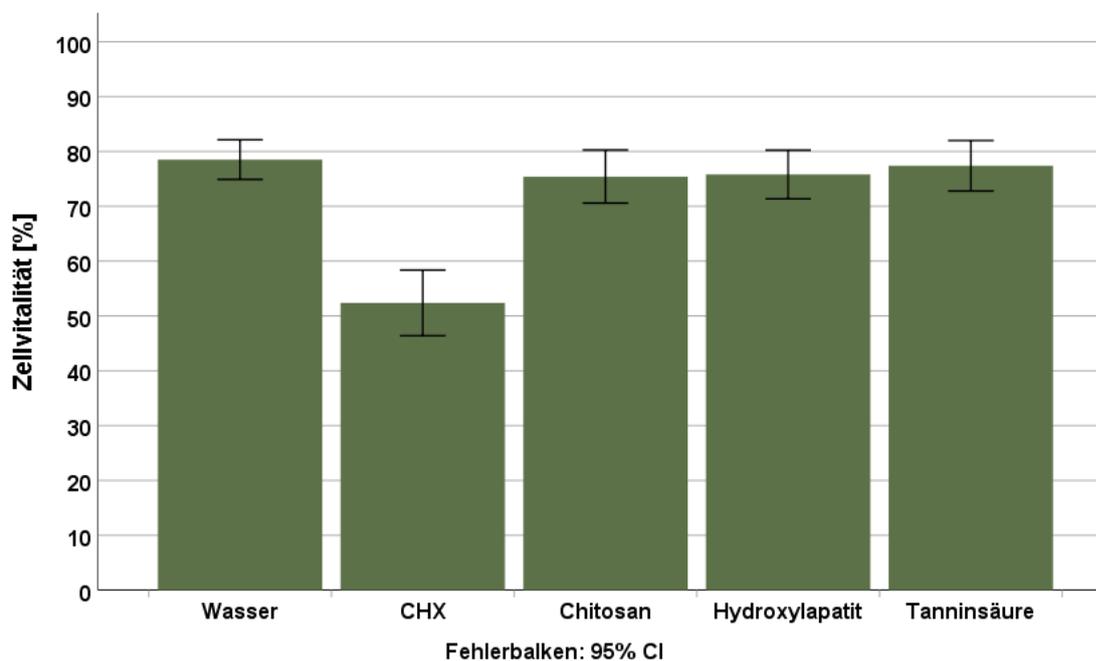
Den niedrigsten Mittelwert weist die Spüllösung *Chlorhexidin* mit 33% auf. Die Spüllösungen *Tanninsäure* und *Chitosan* folgen mit 61% bzw. 62%. *Wasser* stellt mit 73% durchschnittlicher Zellvitalität den höchsten Wert dar. Die Spüllösung *Hydroxylapatit* liegt mit 70% nur knapp darunter.

30 Minuten nach dem Spülen liegen außer der Spüllösung *Hydroxylapatit* alle getesteten Mundspüllösungen mit dem Mann-Whitney-U-Test im paarweisen Vergleich mit Wasser bei einem Signifikanzniveau  $p$  von unter 0,05. Das Signifikanzniveau der Spüllösung *Hydroxylapatit* im Vergleich zur Spüllösung mit Wasser beträgt 0,345 (Tab. 10).

**Tabelle 10:** Übersicht über das Signifikanzniveau der getesteten Prüfsubstanzen im paarweisen Vergleich mit Wasser 30 min nach dem Spülen unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests

Prüfsubstanz	Signifikanz	Signifikanzniveau
0,2%-CHX	signifikant	$p < 0,05$
0,5%-Chitosan	signifikant	$p < 0,05$
5%-Hydroxylapatit	nicht signifikant	$p = 0,345$
5%-Tanninsäure	signifikant	$p < 0,05$

c. Zwei Stunden nach dem Spülen



**Abb. 22:** Bakterielle Zellvitalitäten in Prozent 2 h nach dem Spülen mit den getesteten Spüllösungen im Vergleich, gemittelt über alle Probanden und über beide Durchgänge; Konfidenzintervall: 95%.

In Abb. 22 lassen sich die Zellvitalitäten in Abhängigkeit der verschiedenen Spüllösung zwei Stunden nach dem Spülen ablesen. Die Werte sind gemittelt über alle Probanden und über beide Durchgänge. Das Konfidenzintervall beträgt 95%.

Den niedrigsten Mittelwert weist die Spüllösung *Chlorhexidin* mit 52% auf. Die restlichen Spüllösungen *Chitosan*, *Hydroxylapatit*, *Tanninsäure* und *Wasser* folgen mit den dicht beieinander liegenden Werten von 75%, 76%, 77% bzw. 79%.

Zwei Stunden nach dem Spülen weist lediglich die Spüllösung *Chlorhexidin* mit dem Mann-Whitney-U-Test im paarweisen Vergleich mit Wasser ein Signifikanzniveau  $p$  von unter 0,05 auf und liefert ein signifikantes Ergebnis. Die Werte für die Spüllösungen *Chitosan*, *Hydroxylapatit* und *Tanninsäure* betragen 0,63, 0,62 und 0,92 (Tab. 11).

**Tabelle 11: Übersicht über das Signifikanzniveau der getesteten Prüfsubstanzen im paarweisen Vergleich mit Wasser 2 h nach dem Spülen unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests**

Prüfsubstanz	Signifikanz	Signifikanzniveau
0,2%-CHX	signifikant	$p < 0,05$
0,5%-Chitosan	nicht signifikant	$p = 0,63$
5%-Hydroxylapatit	nicht signifikant	$p = 0,62$
5%-Tanninsäure	nicht signifikant	$p = 0,92$

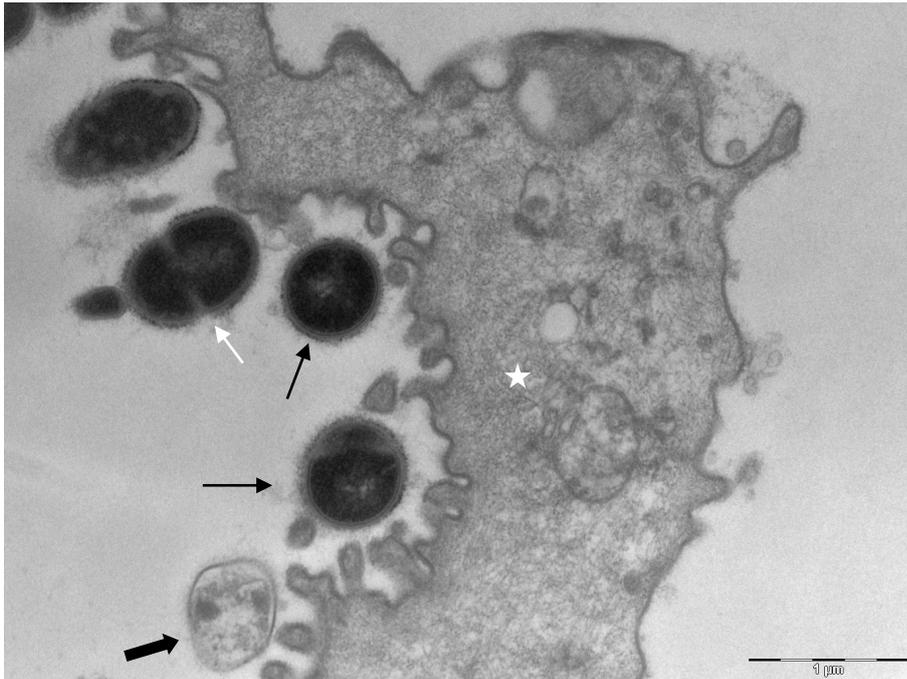
## 4.2 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung

Um ultrastrukturelle Veränderungen der Speichelbakterien visualisieren zu können, wurde in dieser Untersuchung die Transmissionselektronenmikroskopie angewandt. Ziel der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung ist der Einfluss verschiedener Mundspüllösungen auf die Ultrastruktur des Speichels und der Speichelbakterien. Die Proben wurden sowohl hinsichtlich ultrastruktureller Veränderungen an den Speichelbakterien als auch hinsichtlich agglomerierender Effekte von Speichelproteinen untersucht.

Zwei Versuchspersonen sammelten zu den vier Zeitpunkten *vor dem Spülen, 1 min, 30 min* und *2 h nach dem Spülen* 1,8 ml Speichelproben, welche anschließend aufbereitet und fixiert wurden.

#### 4.2.1 Mundspülung mit Wasser

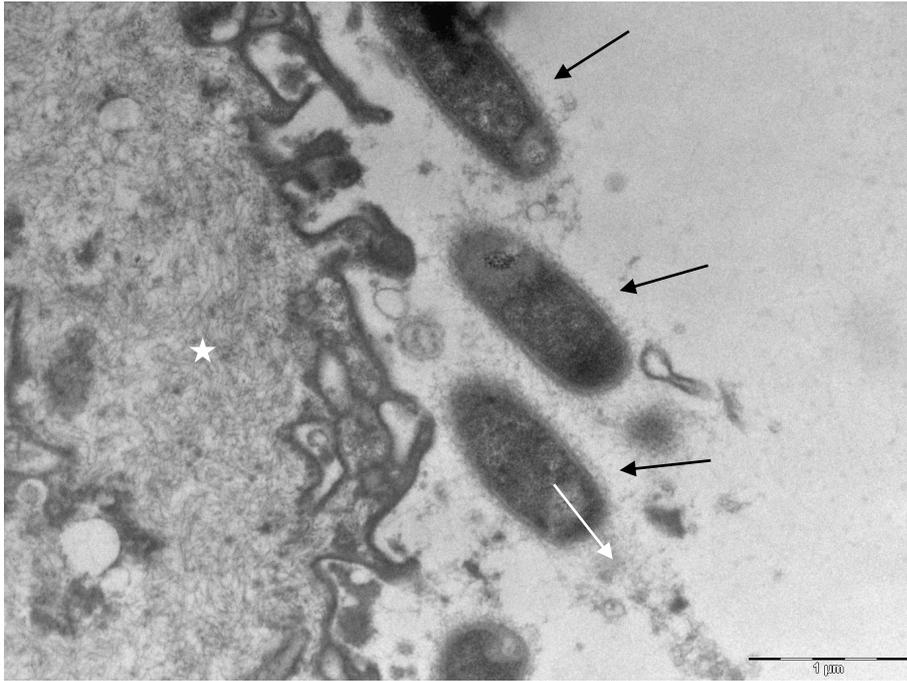
Auf den Kontrollproben des Speichels mit der Mundspülung *Wasser* sind qualitativ keine ultrastrukturellen Unterschiede zu allen vier Zeitpunkten (vor dem Spülen sowie 1 min, 30 min und 2 h nach dem Spülen) auszumachen. Zu allen vier Zeitpunkten sind größtenteils intakte Kokken erkennbar (Abb. 23 – Abb. 28). Die Bakterien sind auf den TEM-Aufnahmen aufgrund ihrer Elektronendichte und ihrer typischen Form leicht zu identifizieren. Auf den Bakterien sind die Fimbrien oft gut erkennbar. Dabei handelt es sich um eine auf der Zellwand der Prokaryonten aus Proteinen bestehende Struktur, welche zur Anheftung an andere Bakterien oder Zellen dient. Häufig lassen sich auf den Kontrollaufnahmen bei den Bakterien auch Teilungsfurchen ausfindig machen. Es lässt sich daher der Rückschluss ziehen, dass sich diese Bakterien zum Zeitpunkt der Fixierung im Stadium der Zellteilung befanden. Auf den meisten Bildern sieht man Proteinaggregate. Diese sind an ihrer filamentären bzw. netzwerkartigen Struktur auszumachen. Mizellen erkennt man auf den Kontrollaufnahmen seltener. Charakteristisch für diese ist ihre globuläre Struktur, ihre homogene Elektronendichte und ihre Größe von ca. 100–200 nm.



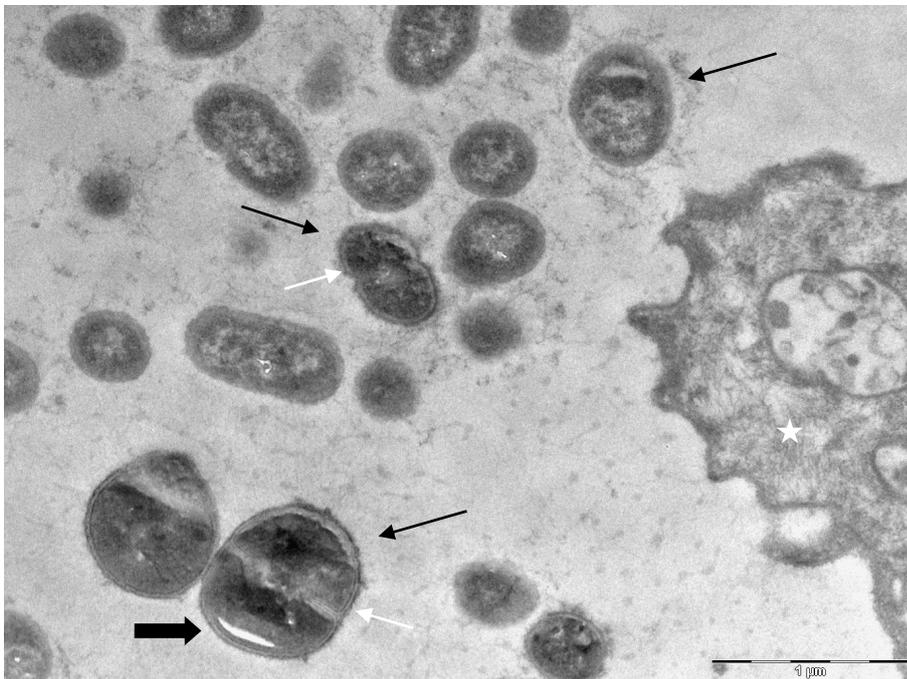
**Abb. 23:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme vor dem Spülen mit der Spüllösung *Wasser*: Es sind mehrere intakte Kokken (schwarze Pfeile) zu sehen. Auf einem Bakterium erkennt man die Teilungsfurche (weißer Pfeil). Alle Speichelbakterien adhären primär an eine Epithelzelle (weißer Stern). Der breite schwarze Pfeil zeigt auf eine bakterielle „ghost cell“. Es handelt sich hierbei um die leere Hülle eines toten Bakteriums. Vergrößerung: 18.500-fach; Proband 2.



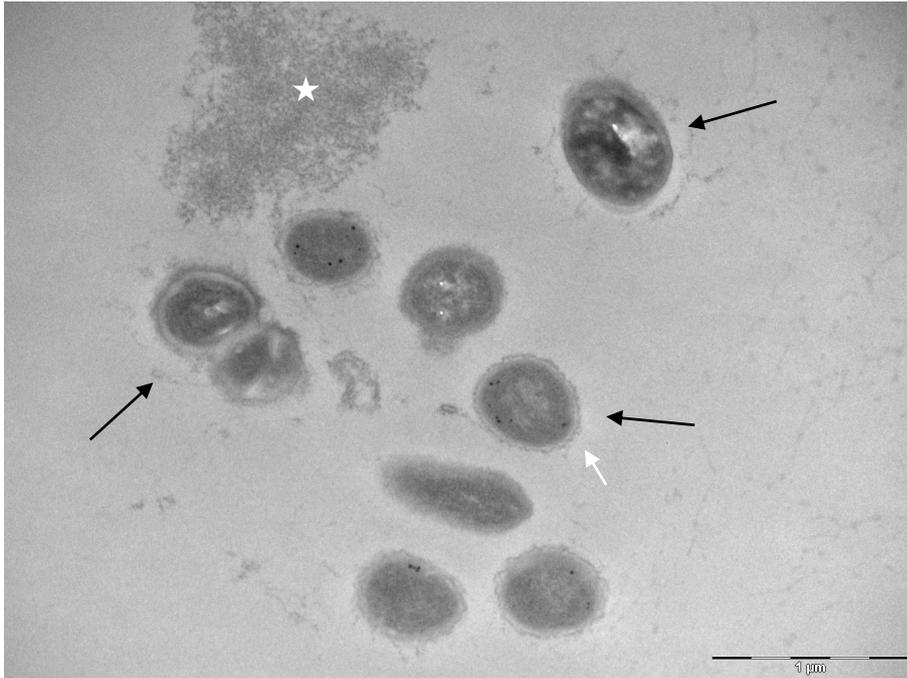
**Abb. 24:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme vor dem Spülen mit der Spüllösung *Wasser*: Es lässt sich ein abgestorbenes Speichelbakterium (schwarzer Stern) erkennen, welches primär an eine Epithelzelle (weißer Stern) adhärirt. An das tote Bakterium ist wiederum eine intakte Kokke (schwarzer Pfeil) angelagert. Vergrößerung: 30.000-fach; Proband 1.



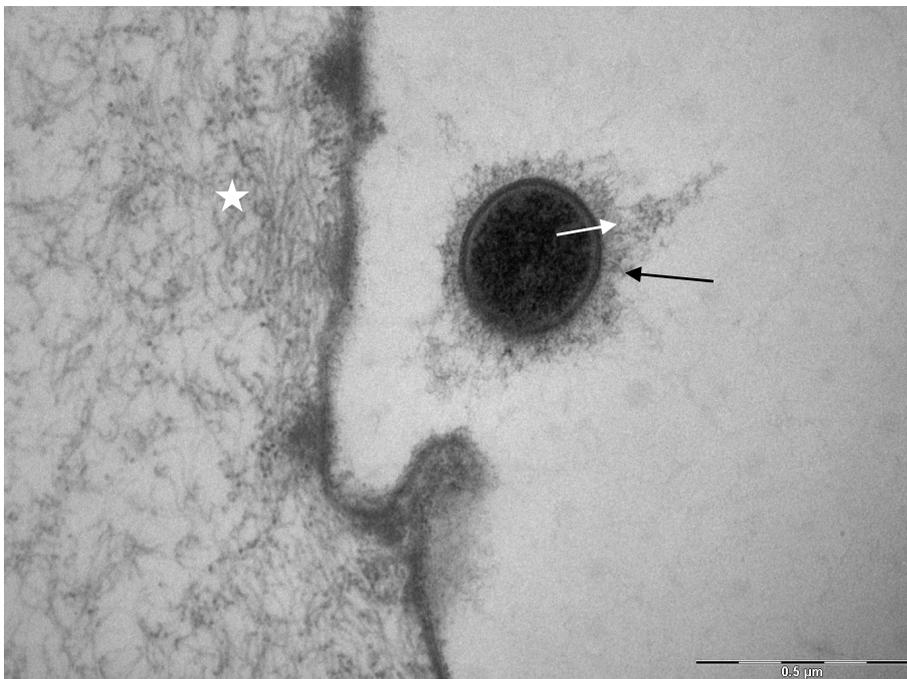
**Abb. 25:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 1 min nach dem Spülen mit der Spüllösung *Wasser*: Es sind mehrere stäbchenförmige Speichelbakterien abgebildet (schwarze Pfeile), welche primär an einer Epithelzelle adhären (weißer Stern). Der weiße Pfeil markiert die Proteinaggregate. Vergrößerung: 18.500-fach; Proband 1.



**Abb. 26:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 30 min nach dem Spülen mit der Spüllösung *Wasser*: Es sind mehrere Speichelbakterien abgebildet (schwarze Pfeile). Anhand der Teilungsfurchen (weiße Pfeile) erkennt man, dass sie sich zum Zeitpunkt der Einbettung im Stadium der Zellteilung befanden. Weiterhin ist eine Epithelzelle zu sehen (weißer Stern). Zwischen den Bakterien finden sich hauptsächlich Proteinaggregate oder Muzinfäden (Proteinnetzwerke). Die weißen Anteile innerhalb der Bakterien (breiter schwarzer Pfeil) sind Artefakte, welche sich beim Einbettungs- und Schneideprozess gebildet haben. Vergrößerung: 23.000-fach; Proband 1.



**Abb. 27:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 30 min nach dem Spülen mit der Spüllösung *Wasser*: Es sind mehrere Speichelbakterien (schwarze Pfeile) abgebildet. Die Glykokalyx lässt sich sehr gut erkennen (weißer Pfeil). Ebenfalls im Bild sind Proteinaggregate (weißer Stern). Vergrößerung: 23.000-fach; Proband 1.



**Abb. 28:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme zwei Stunden nach dem Spülen mit der Spüllösung *Wasser*: Abgebildet ist eine intakte Kokke (schwarzer Pfeil), an welcher Proteinaggregate angelagert sind (weißer Pfeil). Der weiße Stern kennzeichnet eine Epithelzelle. Vergrößerung: 49.000-fach; Proband 1.

#### 4.2.2 Mundspülung mit Chlorhexidin

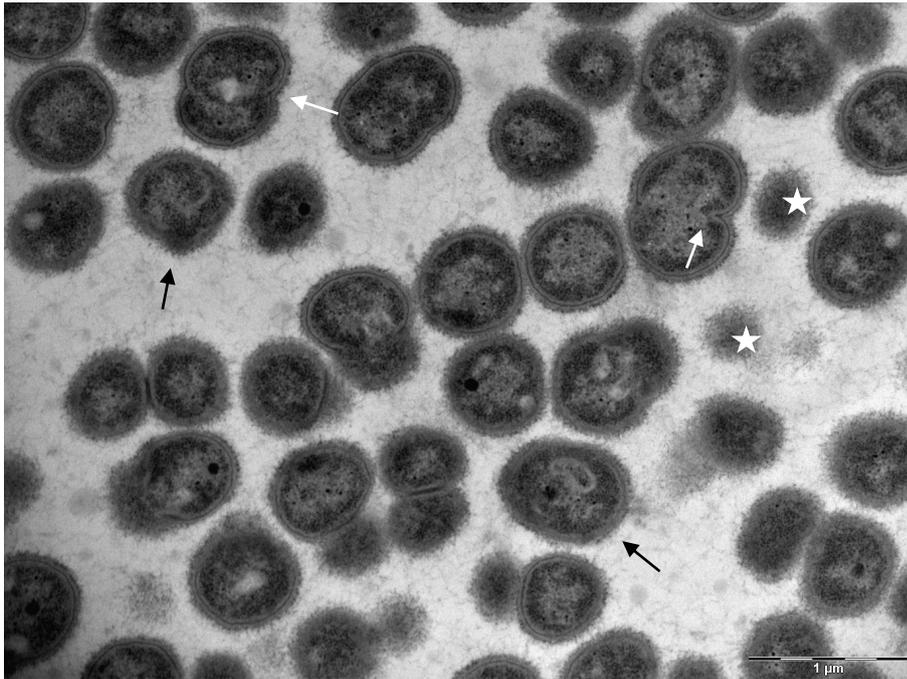
Die Spüllösung mit 0,2%-Chlorhexidindigluconat dient auch in der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung als Positivkontrolle. Die Aufnahmen vor dem Spülen gleichen denen der Negativkontrolle *Wasser* (Abb. 29). Besonders eine Minute und 30 Minuten nach dem Spülen sind überwiegend lytische Bakterien zu erkennen (Abb. 30, Abb. 31 und Abb. 33). Unter Lyse versteht man die Schädigung resp. den Zerfall der äußeren Zellwand und den damit einhergehenden Zelltod. Die Zellwand kann bei diesen nicht mehr ihre Barrierefunktion erfüllen, Wasser dringt, durch den osmotischen Gradienten angetrieben, in die Zelle ein und bringt sie zum Platzen.

Auf einigen Bakterien findet man angelagerte globuläre Strukturen (Abb. 31). Diese lassen sich durch die Wirkweise des Chlorhexidins erklären, welches bakteriostatisch wirken kann, indem es durch Anlagerung an die Zellwand die Zellteilung verhindert.

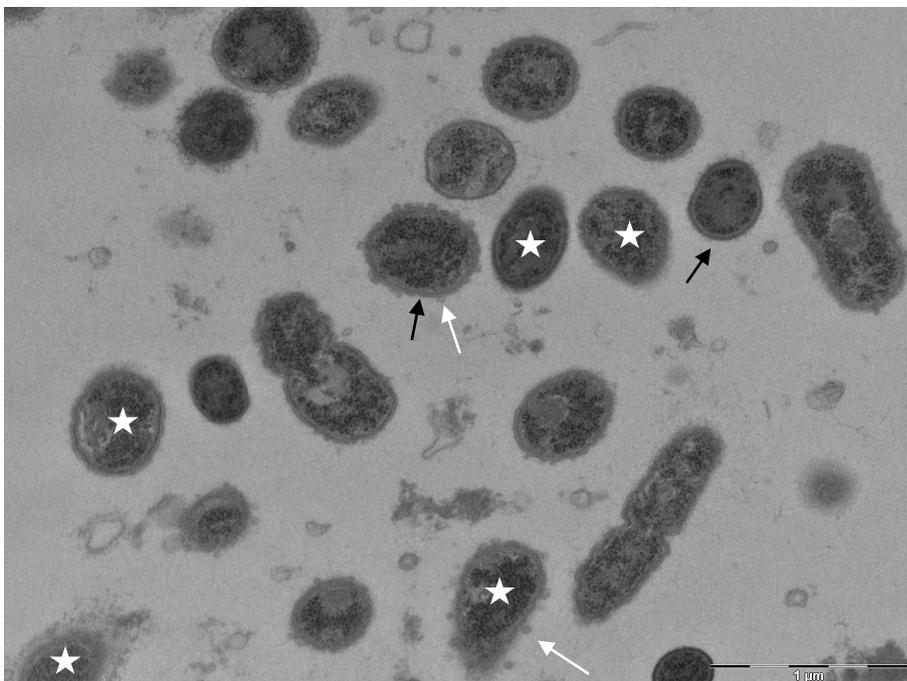
Abb. 32 zeigt Proteinaggregate 30 Minuten nach dem Spülen mit 0,2%iger Chlorhexidin-Spüllösung. Unter diesem Einfluss hat sich die ursprünglich netzartige Struktur der Proteinaggregate zu einer elektronendichten Agglomeratbildung gewandelt.

Zwei Stunden nach dem Spülen sind insgesamt deutlich weniger lytische Bakterien zu sehen (Abb. 34 – Abb. 36) als zu früheren Zeitpunkten.

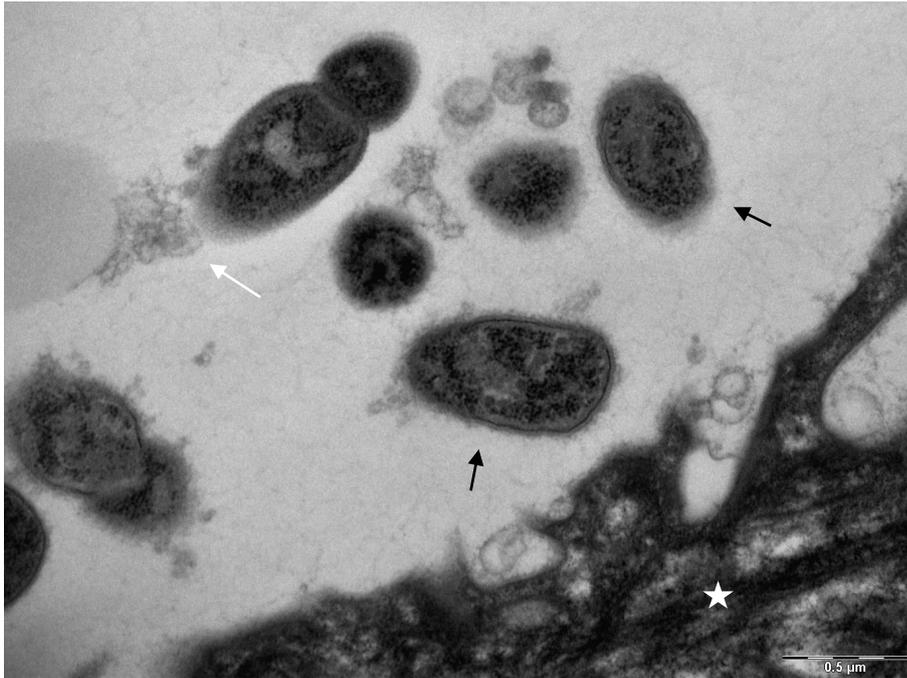
Insgesamt lassen sich auf den Aufnahmen der Positivkontrolle 0,2%-CHX wie auch auf denen der Negativkontrolle vergleichsweise wenig Proteinaggregate lokalisieren. Im Gegensatz zur Spülung mit Wasser findet man hingegen nach einer und nach 30 Minuten fast ausschließlich tote Bakterien und auch nach zwei Stunden ist noch ein nennenswerter antibakterieller Effekt festzustellen. Anlagerungen der Bakterien finden größtenteils nur an Epithelzellen oder untereinander statt.



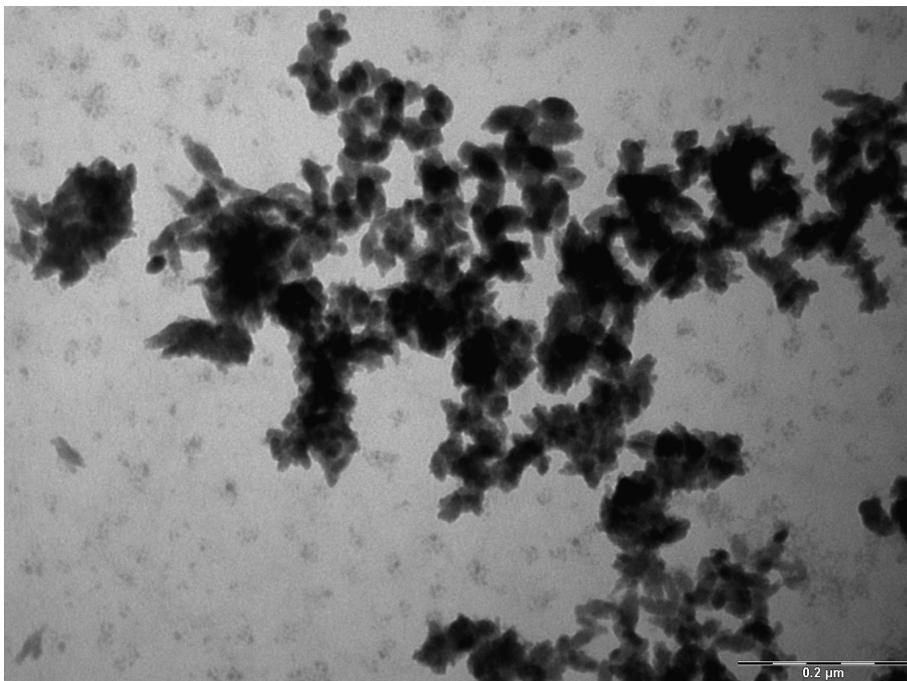
**Abb. 29:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme vor dem Spülen mit der Spüllösung 0,2%-CHX: Es sind sehr viele größtenteils intakte Kokken abgebildet (schwarze Pfeile). An mehreren Speichelbakterien kann man Teilungsfurchen erkennen (weiße Pfeile). Die schattenartigen Strukturen (weiße Sterne) sind Bakterien, welche peripher (d.h. nicht im Bereich der größten Zirkumferenz) angeschnitten wurden und daher nicht komplett sichtbar sind. Vergrößerung: 18.500-fach; Proband 1.



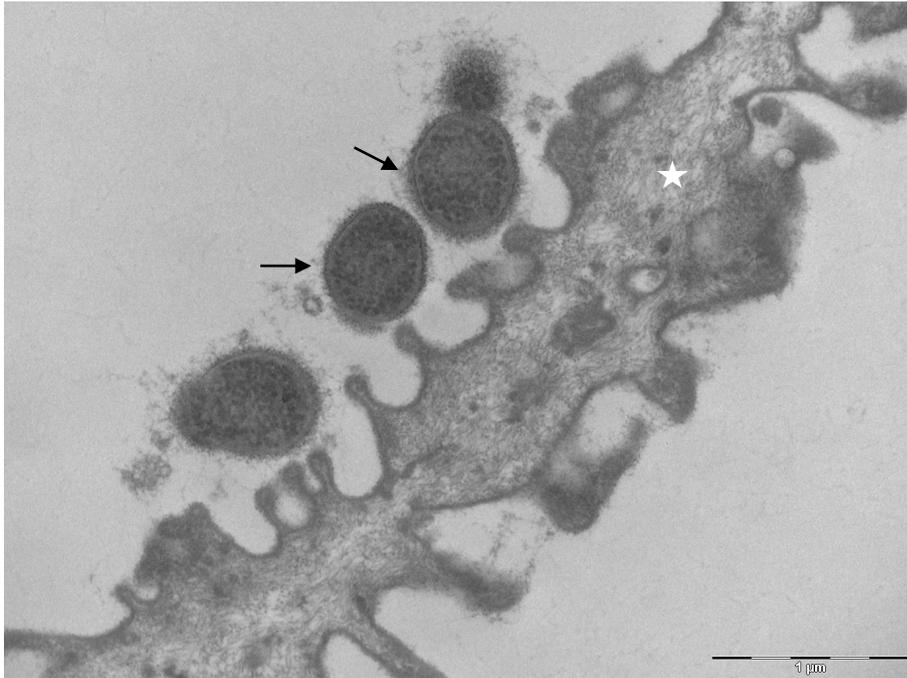
**Abb. 30:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 1 min nach dem Spülen mit der Spüllösung 0,2%-CHX: Von den vielen abgebildeten Kokken (schwarze Pfeile) befinden sich die meisten im Zustand der Lyse (weiße Sterne). Es sind kleine globuläre Strukturen auf der Oberfläche der Bakterienzellwände zu erkennen (weiße Pfeile). Zwischen den Bakterien befinden sich Überreste von Zellen und Proteinaggregaten. Vergrößerung: 23.000-fach; Proband 1.



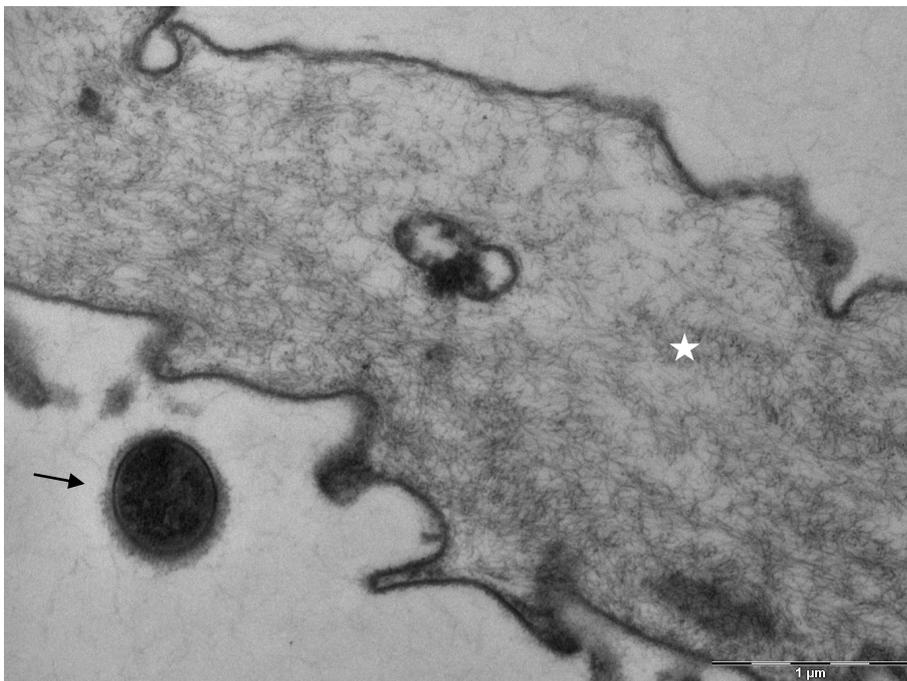
**Abb. 31:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 1 min nach dem Spülen mit der Spüllösung 0,2% CHX: Alle abgebildeten Bakterien befinden sich im Zustand der Lyse (schwarze Pfeile). Ebenfalls mit abgebildet sind eine Epithelzelle (weißer Stern) und Proteinaggregate (weißer Pfeil). Vergrößerung: 30.000-fach; Proband 2.



**Abb. 32:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 30 min nach dem Spülen mit der Spüllösung 0,2% CHX: Detailaufnahme von Proteinaggregaten unter dem Einfluss von Chlorhexidin. Vergrößerung: 96.000-fach; Proband 1.



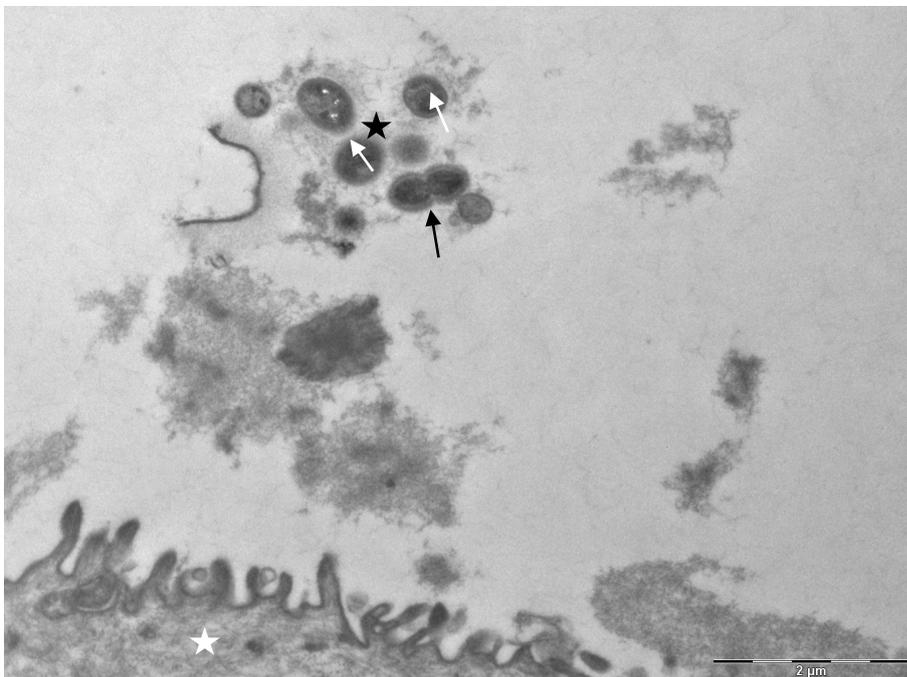
**Abb. 33:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 30 min nach dem Spülen mit der Spüllösung 0,2% CHX: Die Bakterien (schwarze Pfeile) befinden sich im Zustand der beginnenden Lyse. Ebenfalls mit abgebildet ist eine Epithelzelle (weißer Stern). Vergrößerung: 23.000-fach; Proband 2.



**Abb. 34:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 2 h nach dem Spülen mit der Spüllösung 0,2%-CHX: Man erkennt eine intakte Kokke mit deutlich sichtbarer Glykokalyx (schwarzer Pfeil). Ebenfalls im Bild befindet sich eine Epithelzelle (weißer Stern). Vergrößerung: 23.000-fach; Proband 2.



**Abb. 35:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 2 h nach dem Spülen mit der Spüllösung 0,2%-CHX: Es sind viele verschiedene Bakterienarten erkennbar, darunter mehrheitlich Kokken (schwarze Pfeile) und auch ein stäbchenförmiges Bakterium (weißer Pfeil). Etwa jedes zweite Bakterium erscheint intakt. Zwischen den Bakterien und der Epithelzelle (weißer Stern) befinden sich Proteinaggregate. Vergrößerung: 11.000-fach; Proband 1.



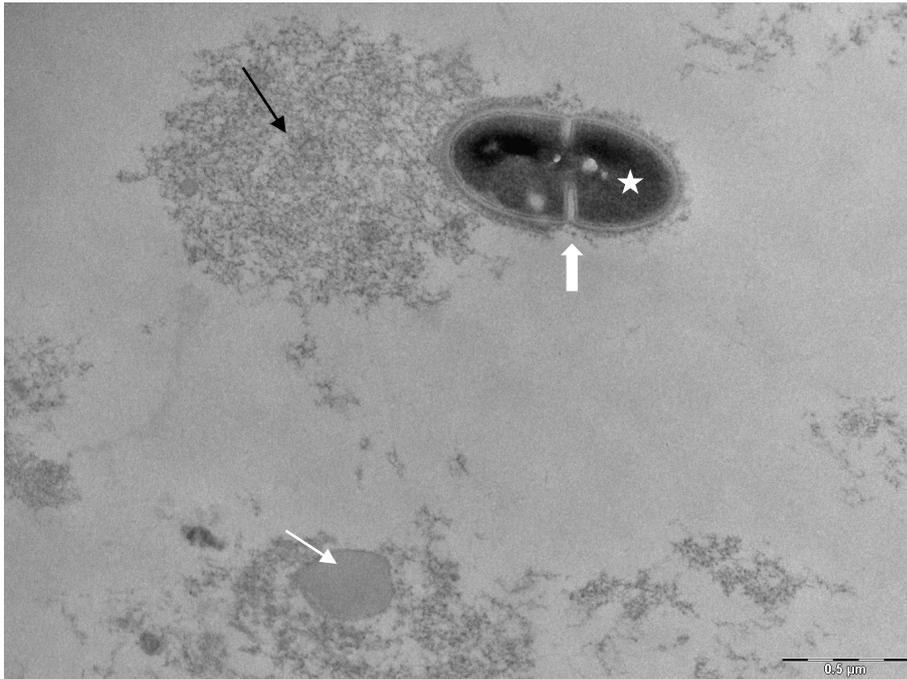
**Abb. 36:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 2 h nach dem Spülen mit der Spüllösung 0,2%-CHX: Es ist eine Gruppe von Kokken zu sehen (schwarzer Stern). Es sind ebenfalls die Teilungsfurche eines vitalen Bakteriums (schwarzer Pfeil) und poröse Zellwände lytischer Bakterien (weiße Pfeile) zu erkennen. Zwischen den Bakterien und der Epithelzelle (weißer Stern) befinden sich Proteinaggregate. Vergrößerung: 11.000-fach; Proband 2.

### 4.2.3 Mundspülung mit Chitosan

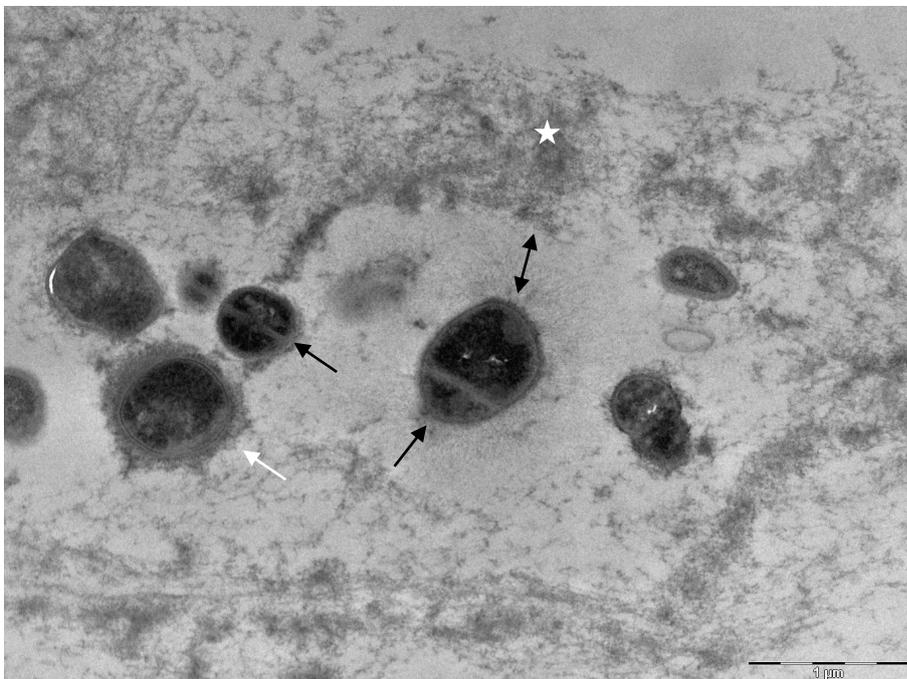
Vor dem Spülen sind morphologisch keine Besonderheiten zu beobachten (Abb. 37). Eine Minute nach dem Spülen mit der Spüllösung *0,5%-Chitosan* zeigen sich deutliche Koagulationseffekte (Abb. 38 – Abb. 39). Auf den Bildern lassen sich mehrere teilweise lytische Kokken erkennen, welche sich in einem Netz aus Proteinaggregaten bzw. Muzinfäden befinden.

Es lassen sich auch nach 30 Minuten noch deutlich ausgeprägte Agglutinationseffekte feststellen – auch wenn diese etwas weniger häufig auftreten als nach einer Minute (Abb. 40 – Abb. 42). Sowohl eine Minute als auch 30 Minuten nach dem Spülen liegt der Anteil der toten Bakterien bei etwa der Hälfte. Auffällig ist, dass zu den beiden Zeitpunkten im Vergleich mit den Aufnahmen der Negativkontrolle vermehrt Proteinaggregate zu sehen sind.

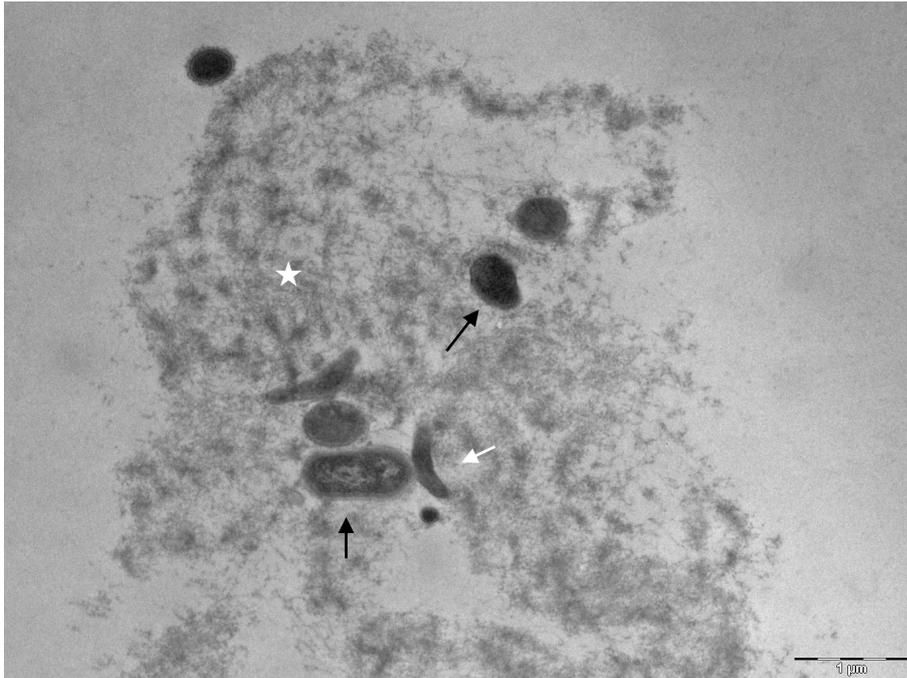
Zwei Stunden nach dem Spülen ist in der Gesamtheit sowohl kein antibakterieller als auch kein agglutinierender Effekt mehr erkennbar (Abb. 43 – Abb. 44).



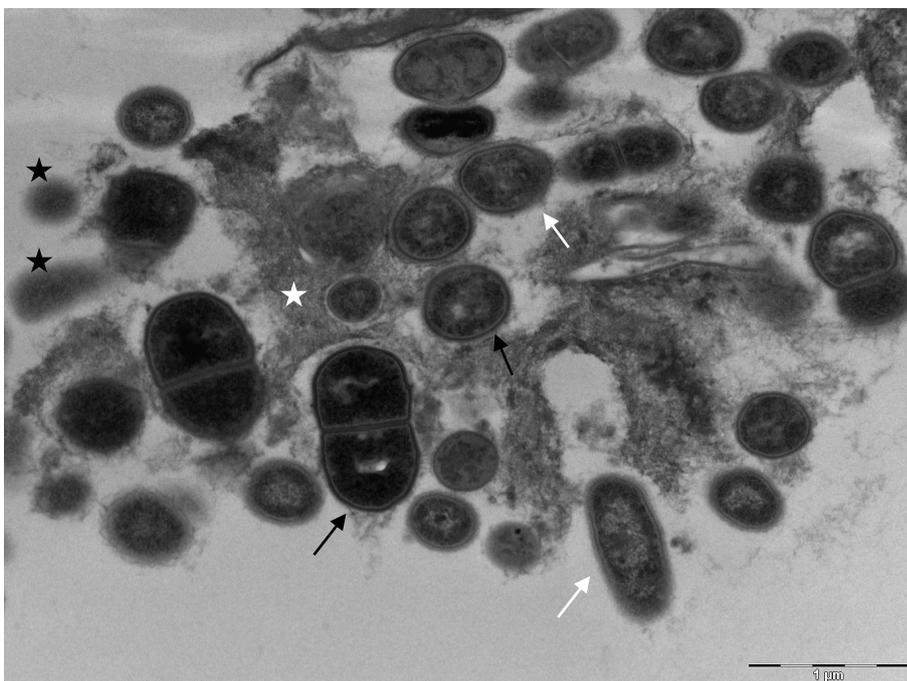
**Abb. 37:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme vor dem Spülen mit der Spüllösung *Chitosan* (0,5%): Es sind Proteinaggregate (schwarzer Pfeil) zu sehen, an welche ein Bakterium (weißer Stern) angelagert ist. Am angelagerten Bakterium ist eine Teilungsfurche (breiter weißer Pfeil) zu erkennen. Ebenfalls in Proteinaggregate eingelagert finden sich Zellreste eines abgestorbenen Speichelbakteriums (schmaler weißer Pfeil). Vergrößerung: 30.000-fach; Proband 2.



**Abb. 38:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 1 min nach dem Spülen mit der Spüllösung *Chitosan* (0,5%): Es ist eine Agglutination aus mehreren Speichelbakterien (schwarze Pfeile) und Proteinaggregaten (weißer Stern) zu erkennen. Der Doppelpfeil verdeutlicht die räumliche Dimension des Fimbriensaumes. Ebenfalls ist die Glykokalyx einer intakten Kokke zu identifizieren (weißer Pfeil). Vergrößerung: 18.500-fach; Proband 1.



**Abb. 39:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 1 min nach dem Spülen mit der Spüllösung *Chitosan* (0,5%): Es sind mehrere Bakterien (schwarze Pfeile) eingebettet in ein Netz aus Proteinaggregaten (weißer Stern) zu erkennen. Bei den länglichen Bakterien handelt es sich vermutlich um Stäbchen (weißer Pfeil). Vergrößerung: 13.000-fach; Proband 1.



**Abb. 40:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 30 min nach dem Spülen mit der Spüllösung *Chitosan* (0,5%): Es sind viele Bakterien (schwarze Pfeile) eingebettet in ein elektronendichtes Netz aus Proteinaggregaten (weißer Stern) zu erkennen. Die weißen Pfeile zeigen auf lytische Bakterien. Es sind auch mehrere Anschnitte von Bakterien zu sehen (schwarze Sterne). Vergrößerung: 18.500-fach; Proband 1.

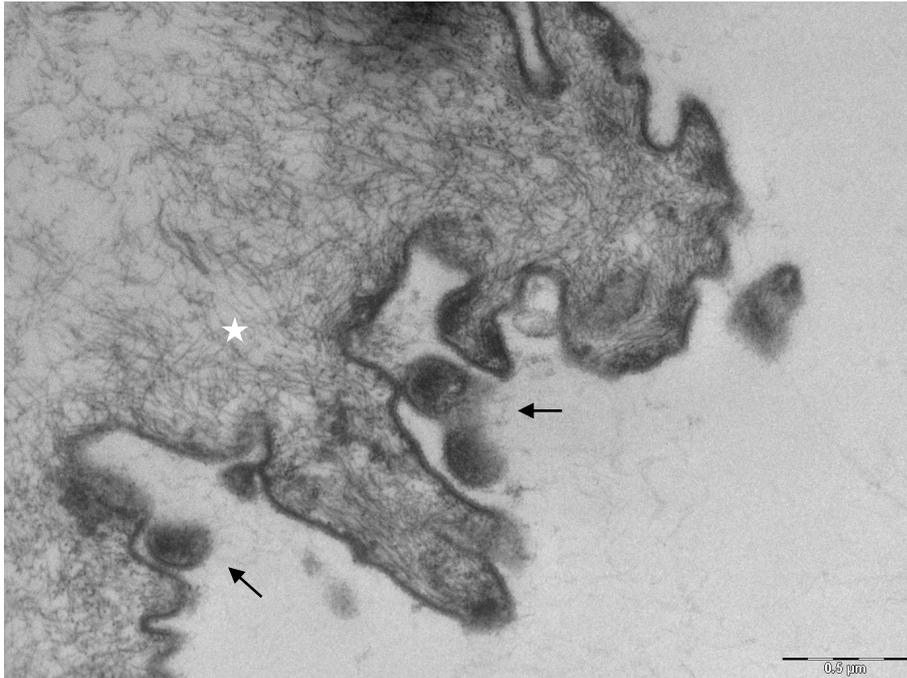


Abb. 41: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 30 min nach dem Spülen mit der Spüllösung *Chitosan* (0,5%): Es sind mehrere lytische Bakterien (schwarze Pfeile) sichtbar, welche an eine Epithelzelle angelagert sind (weißer Stern). Vergrößerung: 30.000-fach; Proband 1.

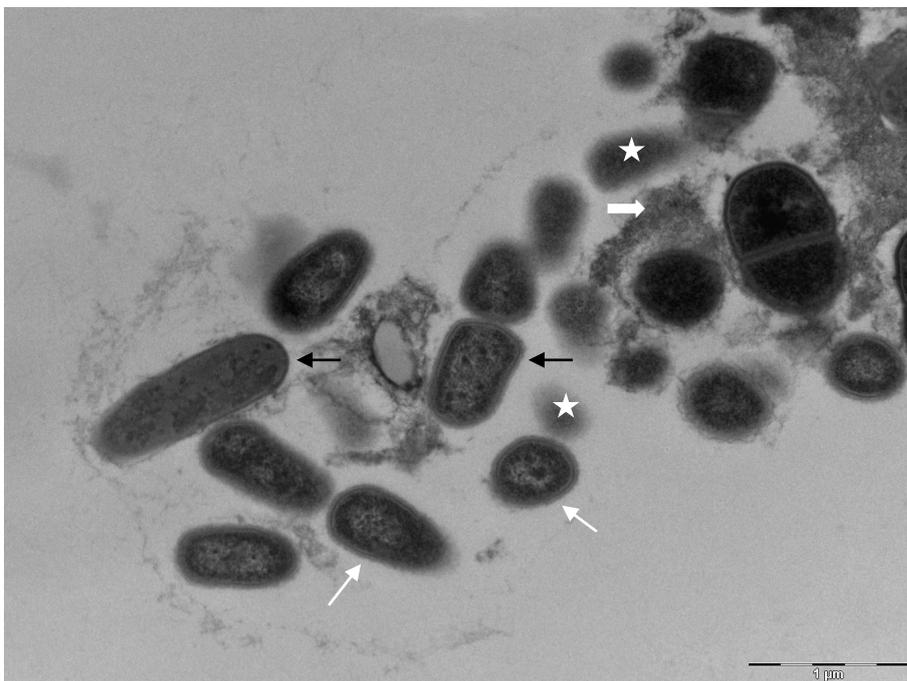


Abb. 42: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 30 min nach dem Spülen mit der Spüllösung *Chitosan* (0,5%): Es sind mehrere intakte und lytische Bakterien (schwarze, bzw. weiße Pfeile) und Bakterienzellanschnitte (weißer Stern) zu erkennen. Die Bakterien liegen dicht gepackt in einem Netz aus Proteinaggregaten (breiter weißer Pfeil) vor. Vergrößerung: 18.500-fach; Proband 1.

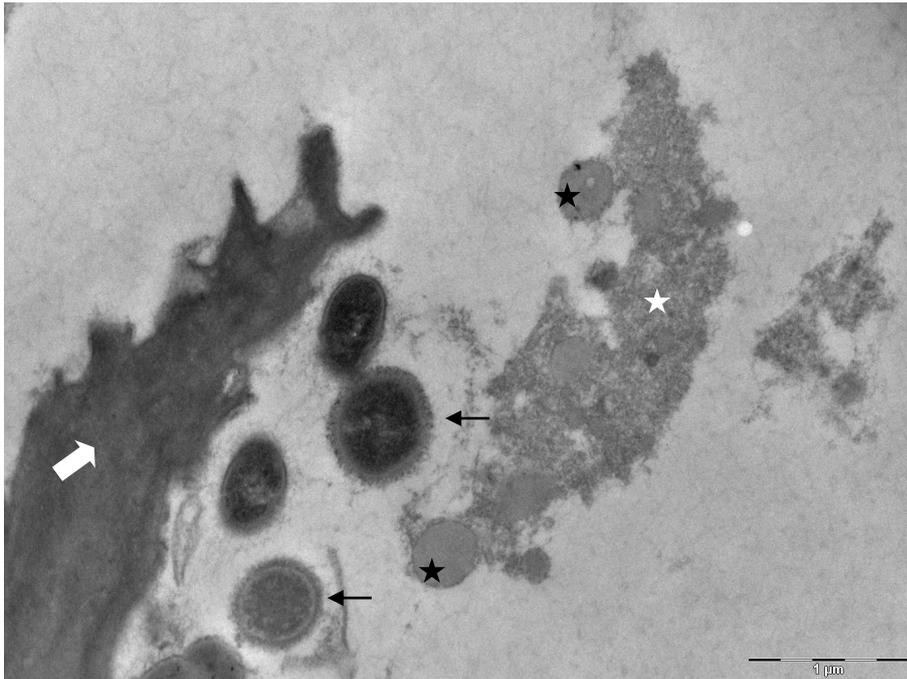


Abb. 43: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 2 h nach dem Spülen mit der Spüllösung *Chitosan* (0,5%): Es sind intakte Bakterien (schwarze Pfeile) zu erkennen. In den Proteinaggregaten (weißer Stern) befinden sich Zellreste abgestorbener Speichelbakterien (schwarze Sterne). Der breite weiße Pfeil zeigt auf eine Epithelzelle. Vergrößerung: 18.500-fach; Proband 1.

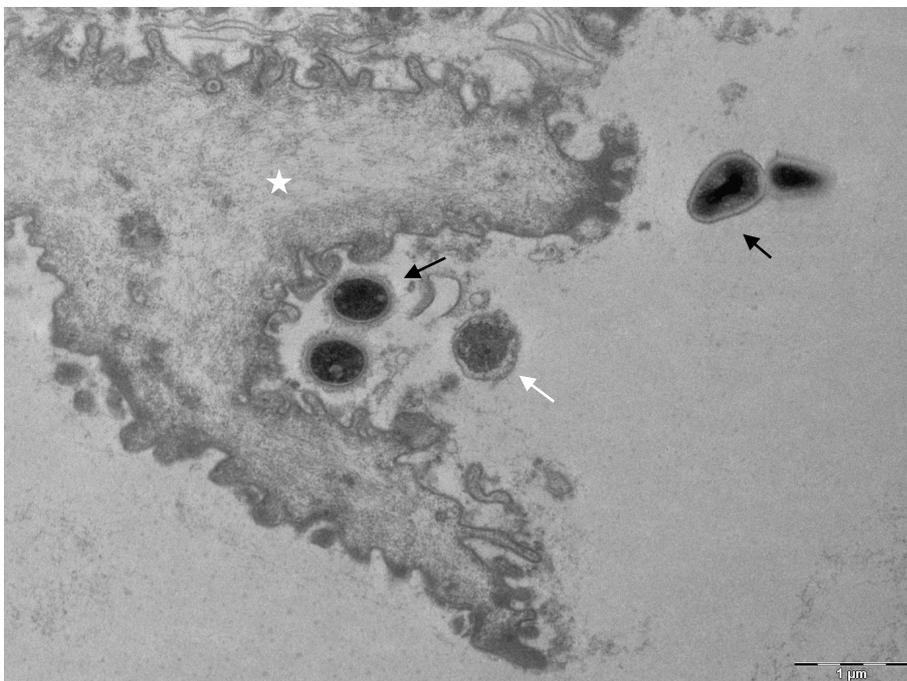


Abb. 44: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 2 h nach dem Spülen mit der Spüllösung *Chitosan* (0,5%): Man findet mehrere intakte Bakterien (schwarze Pfeile), welche primär an eine Epithelzelle (weißer Stern) angelagert sind. Es ist auch eine „Ghost cell“ abgebildet (weißer Pfeil). Vergrößerung: 13.000-fach; Proband 2.

#### 4.2.4 Mundspülung mit Hydroxylapatit

Die Kontrollaufnahmen vor dem Spülen mit der experimentellen Spüllösung *Hydroxylapatit* (5%) weisen keine Besonderheiten auf und sind mit den Aufnahmen der Negativkontrolle übereinstimmend (Abb. 45). Auf vielen Abbildungen sowohl eine Minute als auch 30 Minuten nach dem Spülen finden sich Anlagerungen von Hydroxylapatitkristallen an die Fimbrien der Speichelbakterien (Abb. 46 – Abb. 50). Darüber hinaus kann man häufig Aggregatbildungen aus Hydroxylapatitkristallen, Speichelbakterien sowie Proteinaggregaten feststellen. Proteinaggregate sind eine und 30 Minuten nach dem Spülen im Vergleich mit den Kontrollbildern kaum zu sehen.

Häufig haben sich bei der Anfertigung des Ultradünnschnitts durch Herausbrechen von Hydroxylapatitkristallen Loch-Artefakte gebildet. Diese sind in den Abbildungen als weiße Löcher unschwer zu erkennen (Abb. 46 und Abb. 49).

Zwei Stunden nach dem Spülen mit der Spüllösung *Hydroxylapatit* zeigt sich ein unauffälliges Bild (Abb. 51), welches ähnlich dem der Kontrolle ist. Lediglich kleine Hydroxylapatitpartikel, welche auf manchen Aufnahmen zu sehen sind, weisen noch auf den Einfluss der Spüllösung hin. Die abgebildeten Bakterien sind größtenteils vital.

Die Detailaufnahme der Hydroxylapatitkristalle veranschaulicht deren unterschiedliche Partikelgrößen von durchschnittlich 100 nm im Durchmesser und deren verschiedene Kristallstrukturen (Abb. 52).

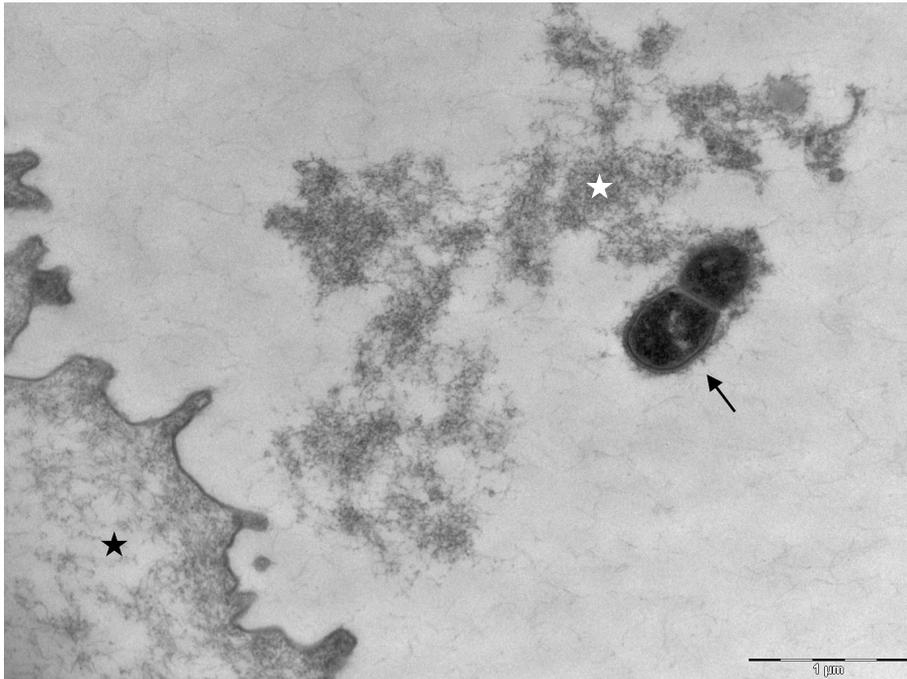


Abb. 45: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme vor dem Spülen mit der Spüllösung *Hydroxylapatit* (5%): Es ist eine intakte Kokke (schwarzer Pfeil) abgebildet. Es handelt sich hierbei um eine Kokke, welche sich zum Zeitpunkt der Fixation im Zustand der Zellteilung befand. Ebenfalls mit abgebildet sind Proteinaggregate (weißer Stern) und eine Epithelzelle (schwarzer Stern). Vergrößerung: 18.500-fach; Proband 2.

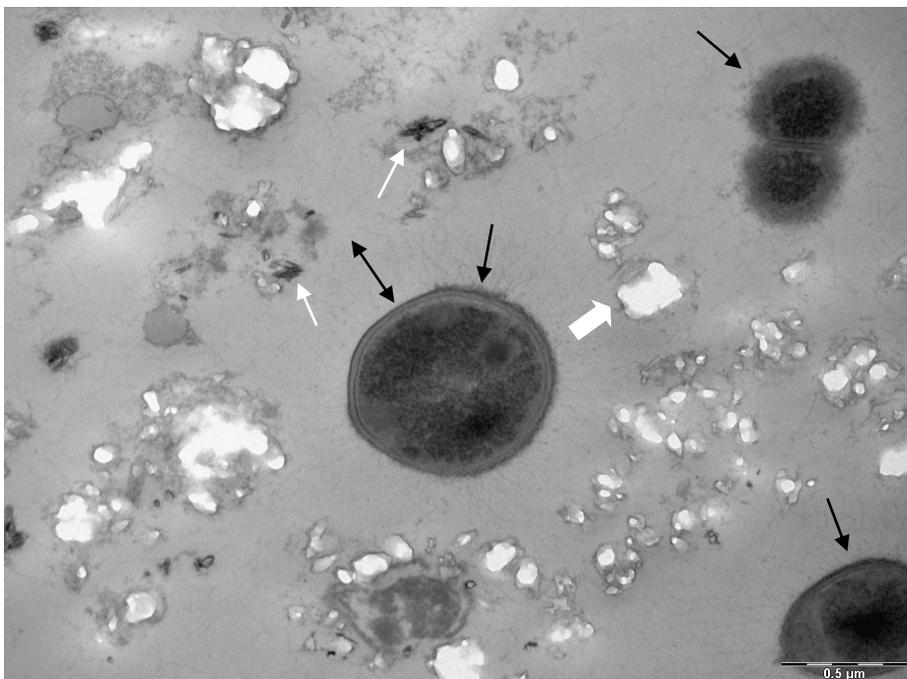
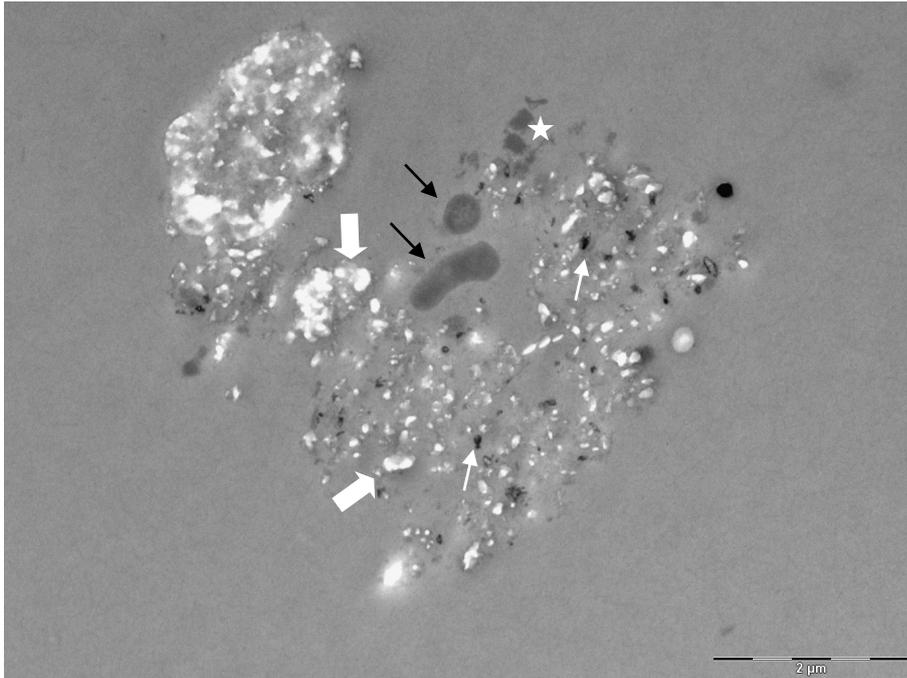
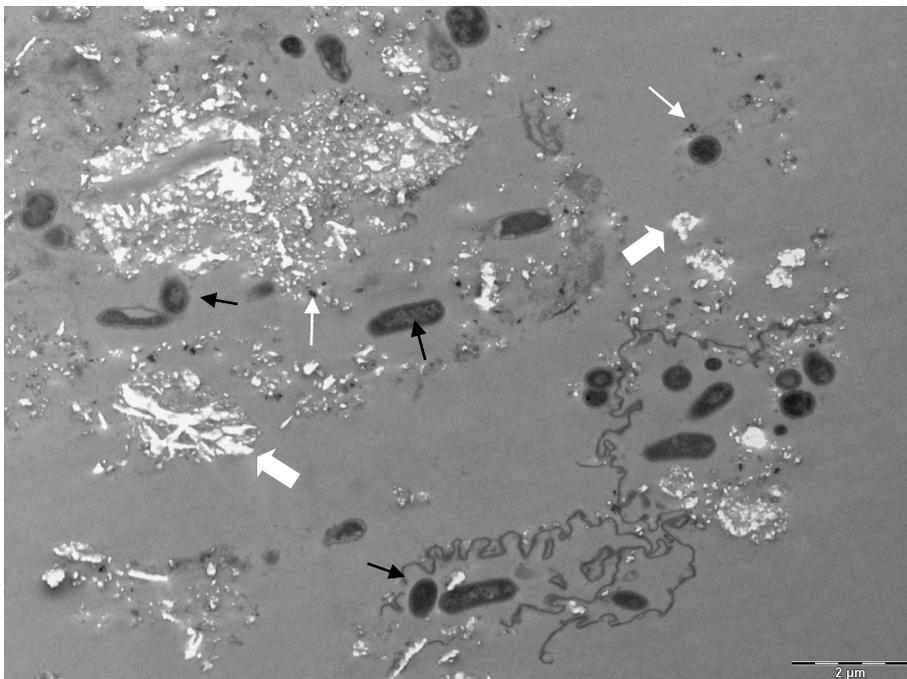


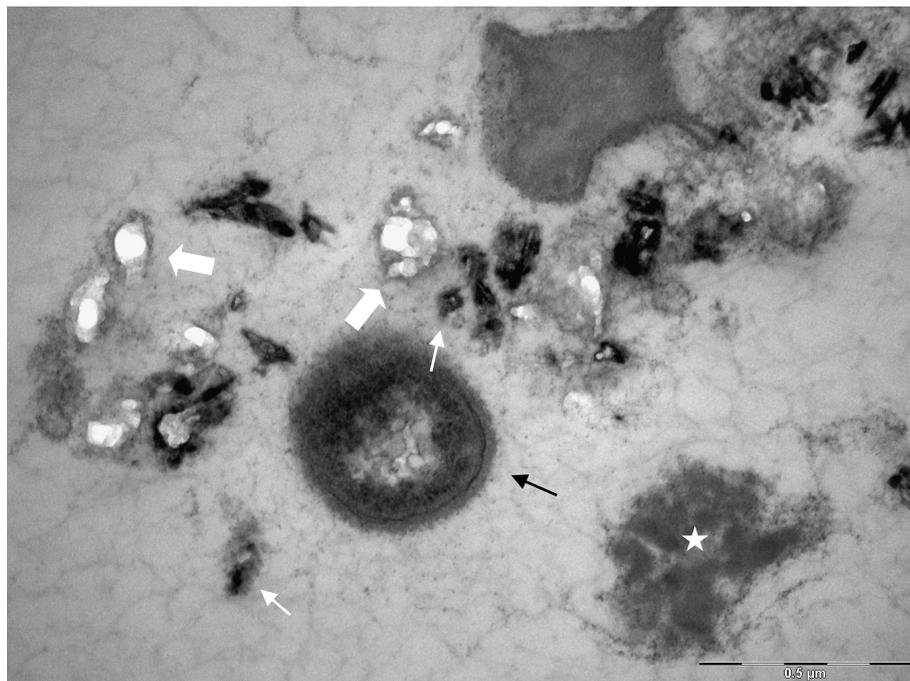
Abb. 46: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 1 min nach dem Spülen mit der Spüllösung *Hydroxylapatit* (5%): Es sind mehrere intakte Bakterien (schwarze Pfeile) zu erkennen. Der Doppelpfeil kennzeichnet die Ausdehnung des Fimbriensaums, an welchen Hydroxylapatitkristalle (weißer Pfeil) angelagert sind. Die Hydroxylapatitkristalle sind hauptsächlich in Form weißer Artefakte zu sehen, welche sich durch den Schneidevorgang gebildet haben (breiter weißer Pfeil). Vergrößerung: 30.000-fach; Proband 1.



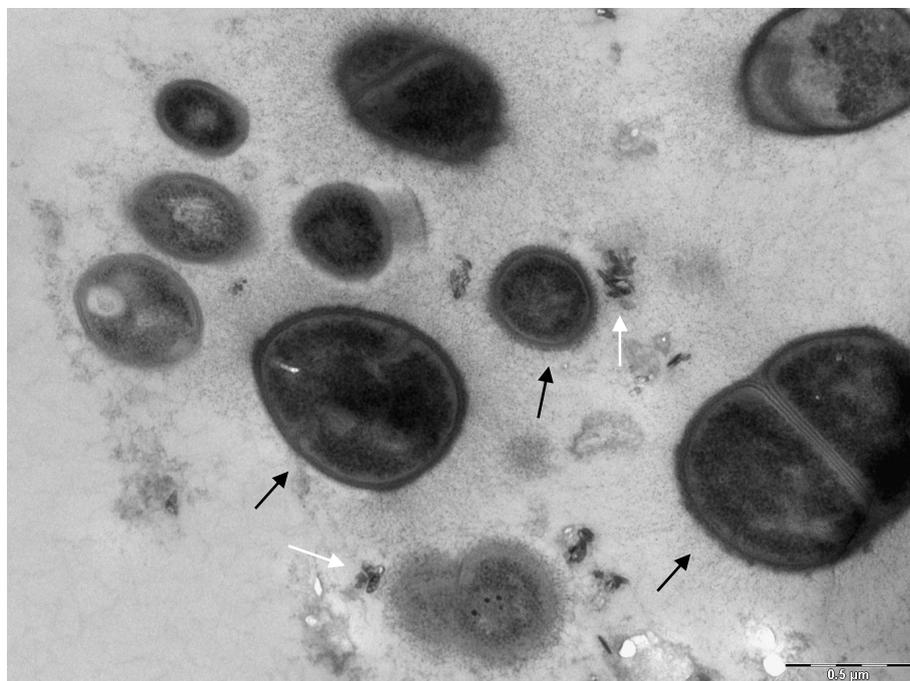
**Abb. 47:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 1 min nach dem Spülen mit der Spüllösung *Hydroxylapatit* (5%): In der Übersichtsaufnahme lässt sich eine Aggregation aus Hydroxylapatitkristallen (weiße Pfeile) und Speichelbakterien (schwarze Pfeile) erkennen. Der überwiegende Teil der Kristalle hat sich beim Schneidevorgang aus der Probe gelöst und erscheint weiß (breite weiße Pfeile). Es sind außerdem Proteinaggregate angelagert (weißer Stern). Vergrößerung: 11.000-fach; Proband 2.



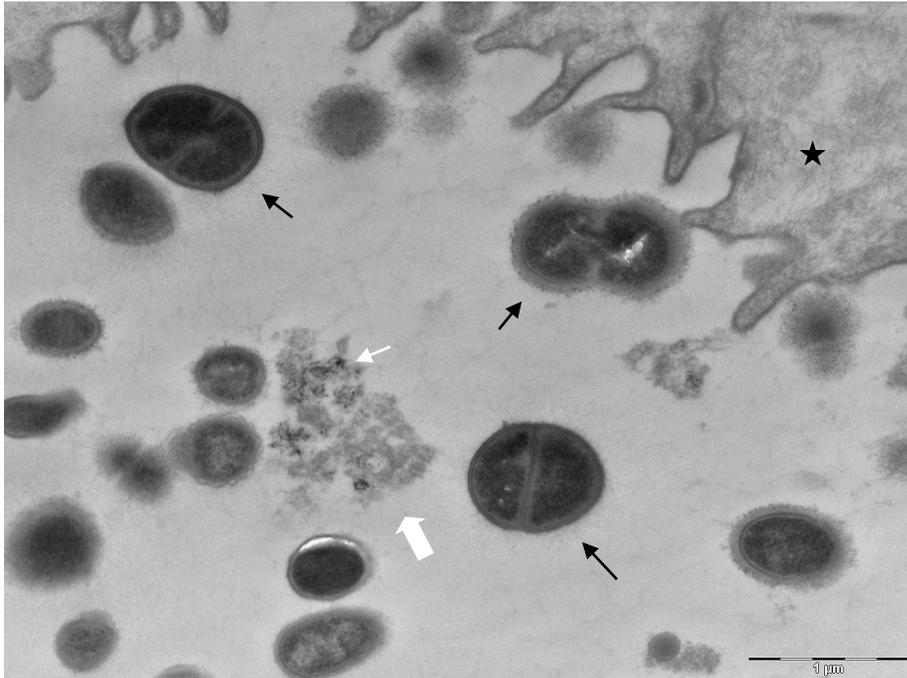
**Abb. 48:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 1 min nach dem Spülen mit der Spüllösung *Hydroxylapatit* (5%): Es lässt sich ein Aggregat aus Hydroxylapatitkristallen (weiße Pfeile) und Speichelbakterien (schwarze Pfeile) erkennen. Der überwiegende Teil der Kristalle hat sich beim Schneidevorgang aus der Probe gelöst und erscheint weiß (breite weiße Pfeile). Vergrößerung: 6.800-fach; Proband 1.



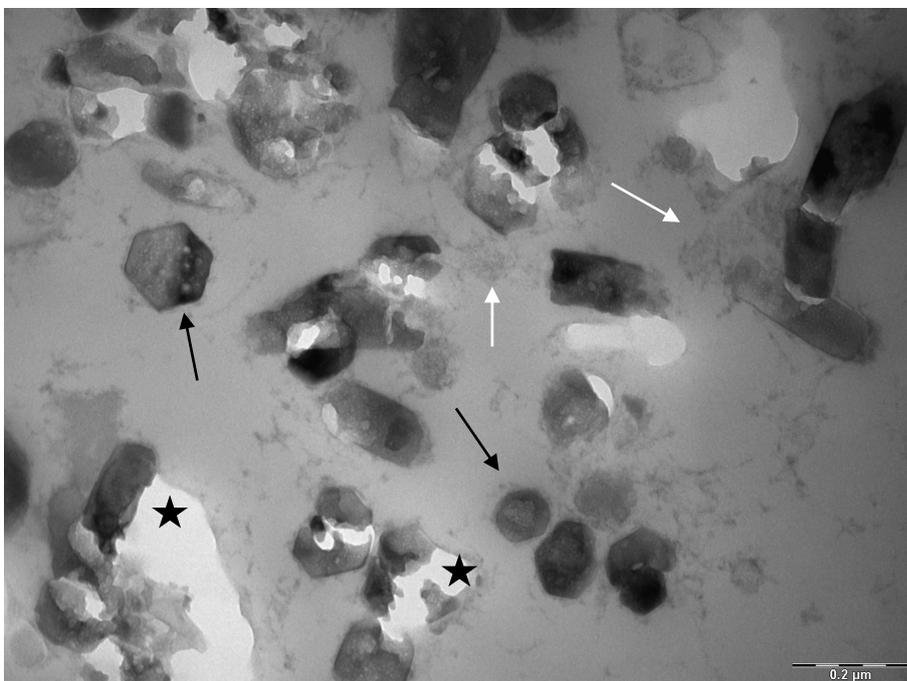
**Abb. 49:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 30 min nach dem Spülen mit der Spüllösung *Hydroxylapatit* (5%): Es ist eine lytische Kokke abgebildet (schwarzer Pfeil), an welcher Hydroxylapatitkristalle angelagert sind (weiße Pfeile). Teilweise haben sich die Kristalle beim Schneidvorgang aus der Probe gelöst (breiter weißer Pfeil). Außerdem sind Proteinaggregate zu erkennen (weißer Stern). Vergrößerung: 49.000-fach; Proband 1.



**Abb. 50:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 30 min nach dem Spülen mit der Spüllösung *Hydroxylapatit* (5%): Mehrere Kokken (schwarze Pfeile) sind mit dazwischen eingelagerten Hydroxylapatitkristallen (weiße Pfeile) abgebildet. Vergrößerung: 30.000-fach; Proband 1.



**Abb. 51:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 2 h nach dem Spülen mit der Spüllösung *Hydroxylapatit* (5%): Es sind größtenteils intakte Kokken dargestellt (schwarze Pfeile). Erkennbar sind auch Proteinaggregate (breiter weißer Pfeil), in welche Hydroxylapatitkristalle eingelagert sind (weißer Pfeil). Mehrere Speichelbakterien adhäreren primär an eine Epithelzelle (schwarzer Stern). Vergrößerung: 18.500-fach; Proband 1.



**Abb. 52:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 2 h nach dem Spülen mit der Spüllösung *Hydroxylapatit* (5%): Auf dieser Aufnahme sind unterschiedlich angeschnittene Hydroxylapatitkristalle abgebildet (schwarze Pfeile). Bei den weißen Stellen handelt es sich um Artefakte, die sich durch Herausbrechen der Hydroxylapatitkristalle beim Schneidevorgang gebildet haben (schwarze Sterne). Zwischen den Kristallen befinden sich Proteinaggregate (weiße Pfeile). Vergrößerung: 68.000-fach; Proband 2.

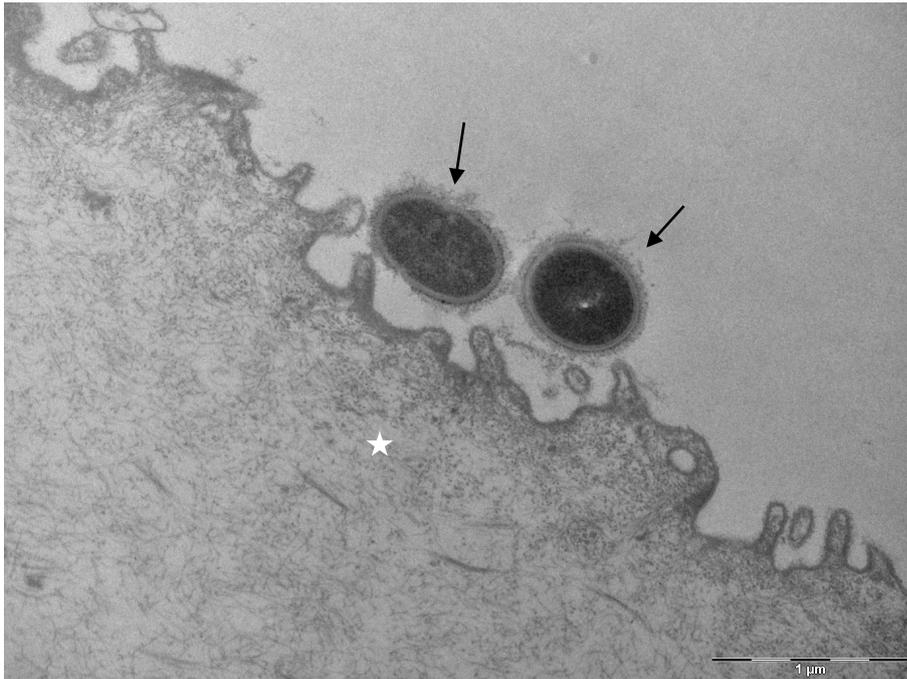
#### 4.2.5 Mundspülung mit Tanninsäure

Vor dem Spülen sind anhand der transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen keine Besonderheiten (Abb. 53) festzustellen. Die Aufnahmen sind mit denen der Negativkontrolle *Wasser* vergleichbar (Kap. 4.2.1).

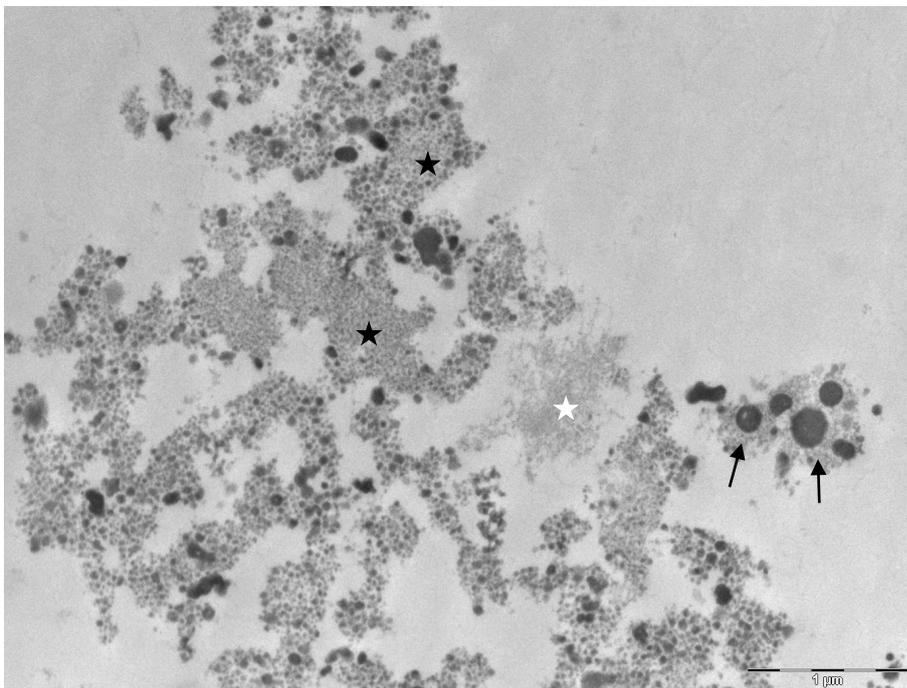
Eine Minute nach dem Spülen mit der Spüllösung *Tanninsäure (5%)* hat sich die Anzahl der Speichelbakterien deutlich reduziert. Sie liegen in der Regel aggregiert vor; an etwa der Hälfte kann man lytische Prozesse feststellen (Abb. 54 – Abb. 55). Es sind ebenfalls deutliche elektronendichte Aggregationen sichtbar, welche überwiegend aus Tannin-Protein-Aggregaten und Bakterien bestehen. Die Tannin-Protein-Aggregate sind durch ihre globuläre Struktur und ihre Aggregation gut differenzierbar. Sie sind zudem deutlich kleiner als die ebenfalls globulär vorkommenden Mizellen, welche eine Größe von 100–200 nm aufweisen. Unveränderte Proteinaggregate sind seltener zu sehen als in den Aufnahmen vor dem Spülen (Abb. 56).

Es lässt sich feststellen, dass man eine halbe Stunde nach dem Spülen sowohl deutlich weniger tote Bakterien als auch deutlich weniger elektronendichte Aggregationen im Vergleich zu den Aufnahmen eine Minute nach dem Spülen (Abb. 57 – Abb. 59) findet. Ebenso treten denaturierte Proteinaggregate nach 30 Minuten weniger gehäuft auf als nach einer Minute.

Zwei Stunden nach dem Spülen mit der 5%igen Tanninsäure-Spüllösung lassen sich deskriptiv keine Veränderungen mehr ausmachen (Abb. 60). Die abgebildeten Kokken sind größtenteils vital und oftmals untereinander aggregiert. Zwischen den Bakterien finden sich wie auch auf den Kontrollaufnahmen vor dem Spülen immer wieder netzartige Proteinaggregate.



**Abb. 53:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme vor dem Spülen mit der Spüllösung *Tanninsäure* (5%): Es sind zwei intakte Speichelbakterien sichtbar (schwarze Pfeile), welche sich in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander befinden und primär an eine Epithelzelle (weißer Stern) adhäreren. Vergrößerung: 23.000-fach; Proband 2.



**Abb. 54:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 1 min nach dem Spülen mit der Spüllösung *Tanninsäure* (5%): Es lassen sich Speichelbakterien erkennen (schwarze Pfeile), welche in ein Netz aus denaturierten Proteinaggregaten, den sog. *Tannin-Protein-Aggregaten* (schwarzer Stern) eingebettet sind. Nur noch ein kleiner Teil an Proteinaggregaten liegt in seiner nicht-denaturierten Form vor (weißer Stern). Vergrößerung: 18.500-fach; Proband 1.

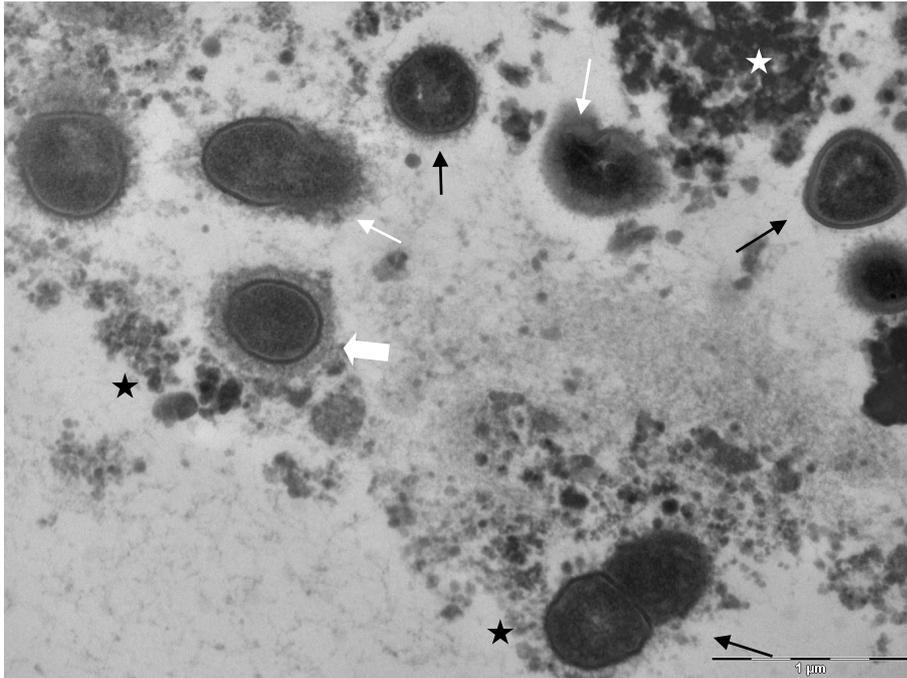


Abb. 55: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 1 min nach dem Spülen mit der Spüllösung *Tanninsäure* (5%): Nur etwa jedes zweite abgebildete Speichelbakterium ist intakt (schwarze Pfeile). Aus den lytischen Bakterien ist austretendes Cytoplasma identifizierbar (weiße Pfeile). An die Glykokalyx (breiter weißer Pfeil) angelagert befinden sich denaturierte Tannin-Protein-Aggregate (schwarze Sterne). Vergrößerung: 23.000-fach; Proband 2.

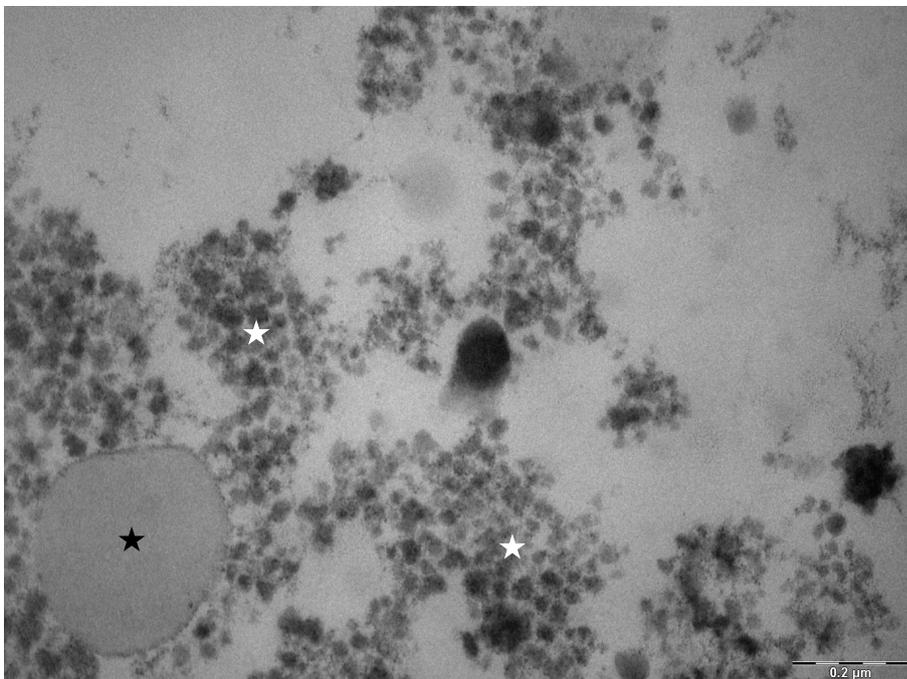
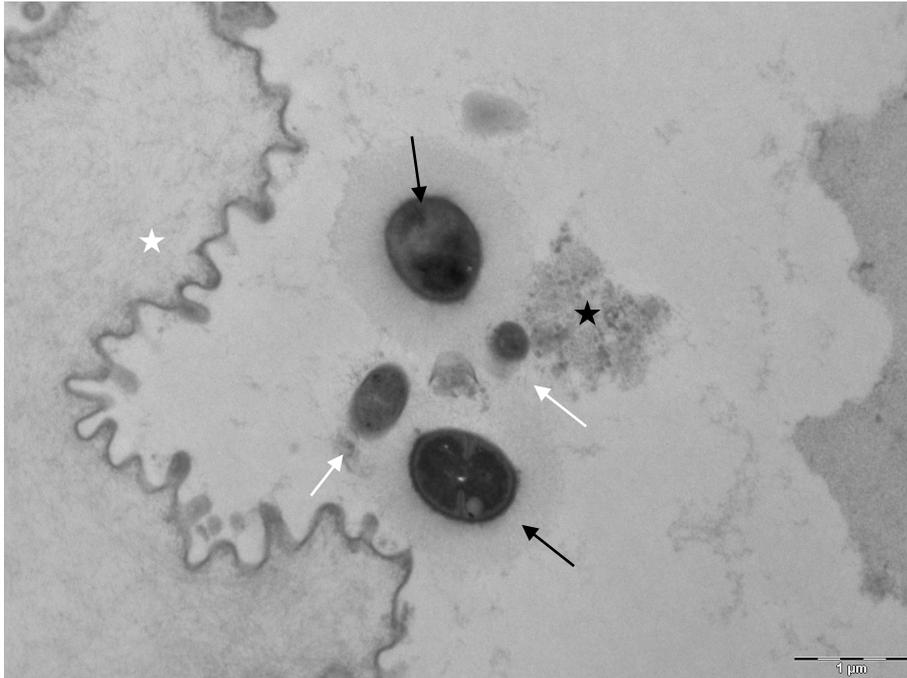
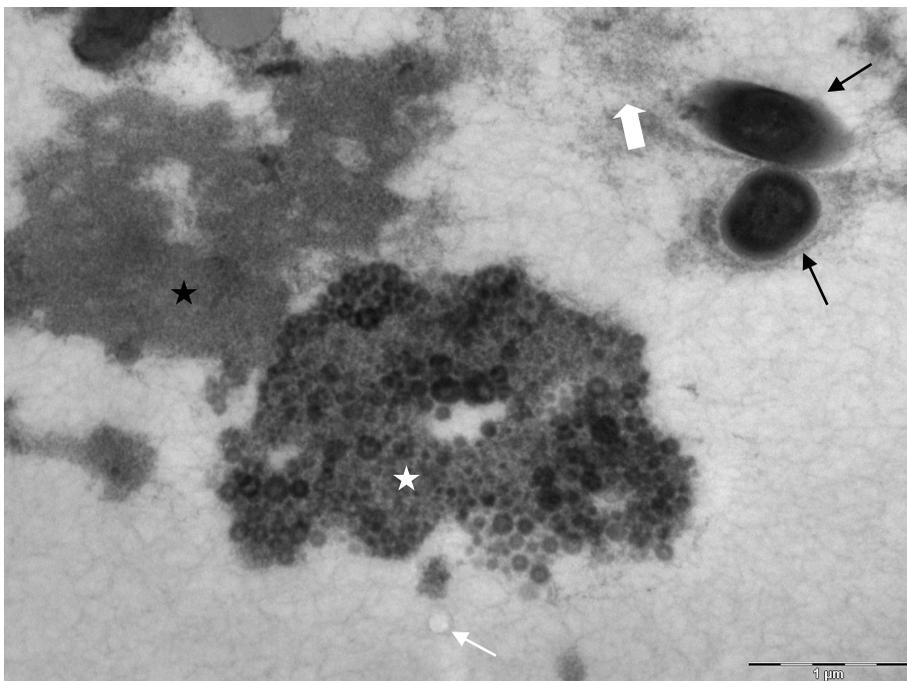


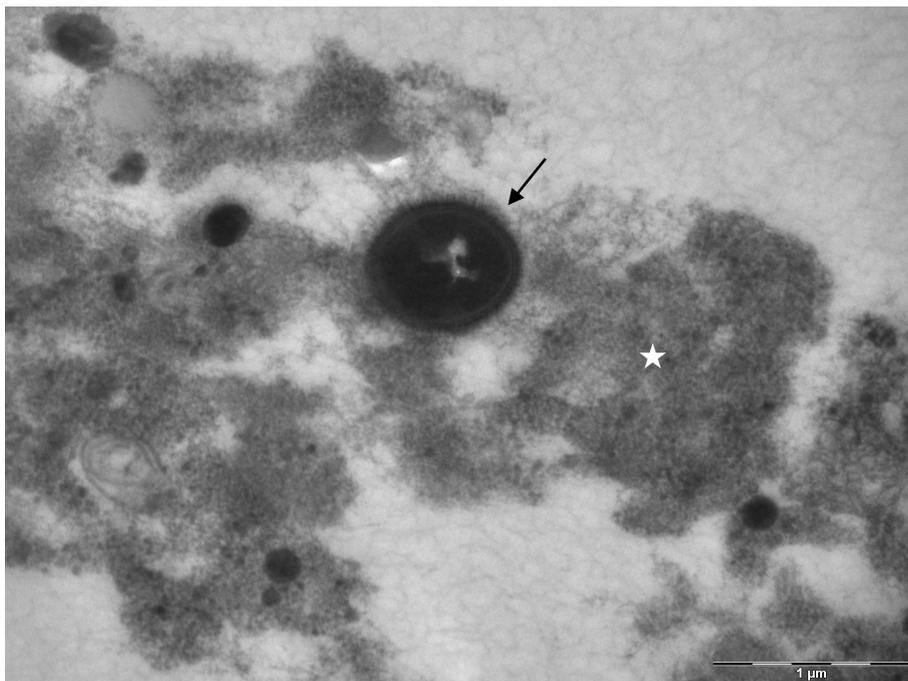
Abb. 56: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 1 min nach dem Spülen mit der Spüllösung *Tanninsäure* (5%): In dieser Detailaufnahme sind größtenteils Tannin-Proteinaggregate abgebildet (weiße Sterne). Hierin eingelagert ist der Zellrest eines abgestorbenen Speichelbakteriums zu sehen (schwarzer Stern). Vergrößerung: 68.000-fach; Proband 1.



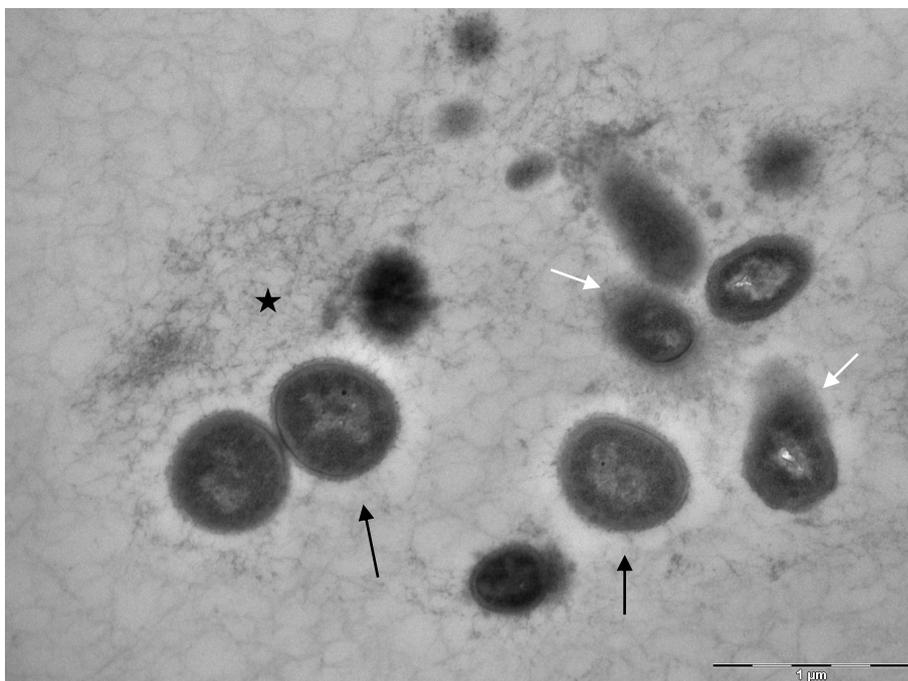
**Abb. 57:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 30 min nach dem Spülen mit der Spüllösung *Tanninsäure* (5%): Intakte (schwarze Pfeile) und lytische Speichelbakterien (weiße Pfeile) kommen auf dieser Abbildung jeweils zur Hälfte vor. Es sind ebenfalls eine Epithelzelle (weißer Stern) und Proteinaggregate (schwarzer Stern) abgebildet. Vergrößerung: 13.000-fach; Proband 2.



**Abb. 58:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 30 min nach dem Spülen mit der Spüllösung *Tanninsäure* (5%): Diese Abbildung verdeutlicht die verschiedenen Stadien, welche Proteinaggregate unter dem denaturierenden Einfluss von Tanninsäure durchlaufen. Neben einer globulären Struktur (weißer Stern) existiert zum anderen eine dichte und netzwerkartige Struktur (schwarzer Stern). Unverändert scheinende Proteinaggregate sind ebenfalls zu sehen (breiter weißer Pfeil). Weiterhin sind Speichelbakterien (schwarze Pfeile) und eine Mizelle abgebildet (weißer Pfeil). Vergrößerung: 18.500-fach; Proband 1.



**Abb. 59:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 30 min nach dem Spülen mit der Spüllösung *Tanninsäure* (5%): Auf dieser Abbildung erkennt man ein Speichelbakterium (schwarzer Pfeil), welches sich in einem Netz aus denaturierten Proteinaggregaten befindet (weißer Stern). Vergrößerung: 23.000-fach; Proband 1.



**Abb. 60:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme 2 h nach dem Spülen mit der Spüllösung *Tanninsäure* (5%): Man erkennt mehrere Speichelbakterien, von denen der überwiegende Teil intakt ist (schwarze Pfeile). Lytische Bakterien mit austretendem Cytoplasma sind ebenfalls zu sehen (weiße Pfeile). Zwischen den Bakterien befindet sich ein dünnes Netz aus Proteinaggregaten (schwarzer Stern). Vergrößerung: 23.000-fach; Proband 2.

## 5 Diskussion

### 5.1 Kritische Betrachtung der eigenen Untersuchung

#### 5.1.1 Materialien

Mit den getesteten experimentellen Spüllösungen wurden Substanzen in die Studie einbezogen, welche natürlichen Ursprungs sind und ein antibakterielles bzw. antiadhärentes Potential besitzen. Diese Stoffe erfahren schon seit vielen Jahren ein großes wissenschaftliches Interesse, was sie zum Gegenstand zahlreicher Experimente und Studien werden ließ (Hannig, C. *et al.*, 2013; Hertel *et al.*, 2017; Kong *et al.*, 2010; Radafshar *et al.*, 2017).

Die Konzentration der als Positivkontrolle eingesetzten Chlorhexidindigluconat-Lösung sollte einerseits möglichst gering ausfallen, um die Nebenwirkungen zu minimieren (Flötra *et al.*, 1971), andererseits sollte aber dennoch sichergestellt werden, dass bei einer Spülung mit 10 ml die volle Wirkung entfaltet werden kann. Nach Mendieta *et al.* wirkt eine 0,12%ige Chlorhexidindigluconat-Lösung nur dann ebenso gut wie eine 0,2%ige, wenn die Menge der Spüllösung auf 15 ml erhöht wird (Mendieta *et al.*, 1994). Die Wahl fiel in dieser Studie daher auf die 0,2%ige Konzentration.

Bei Chitosan wird vor allem die Möglichkeit des Einsatzes als Vehikel für die Freisetzung therapeutischer Mittel untersucht (Bhattarai *et al.*, 2010). Auch seine antibakterielle und antimykotische Wirksamkeit sowie die koagulierende Wirkung sind Gegenstand zahlreicher medizinischer Untersuchungen (Bae *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2013).

Hydroxylapatit wird inzwischen in vielen kommerziell erhältlichen Zahnpflegeprodukten eingesetzt z.B. *Karex* und *Biorepair* (Dr. Kurt Wolff GmbH & Co. KG, Bielefeld, Deutschland) und weist eine durch mehrere Untersuchungen belegte Remineralisationseigenschaft auf (Huang *et al.*, 2009; Tschoppe *et al.*, 2011). Als Hauptbestandteil des Zahnschmelzes ist es eine natürliche Substanz, von der bei bestimmungsgemäßem Gebrauch keine unerwünschten Nebenwirkungen zu erwarten sind.

Tanninsäure schließlich wurde als Bestandteil von polyphenolhaltigen Getränken wie z.B. schwarzem und grünem Tee oder in Rotwein oft auf seine antioxidativen und kardioprotektiven Eigenschaften auf den menschlichen Körper hin untersucht (Das *et al.*, 1999; Zern und Fernandez, 2005). Auch im Bereich der Zahnmedizin gibt es verschiedene Studien zum Einfluss der Tanninsäure. So zeigten Kirsch *et al.*, dass unter Anwendung tanninsäurehaltiger Tees die Glukanformation der Plaque reduziert wird und so die Anlagerung von Speichelbakterien verringert werden konnte (Kirsch *et al.*, 2020). Hertel *et al.* kommen zu denselben Ergebnissen und weisen darüber hinaus karies- und erosionsprotektive Eigenschaften der Tanninsäure nach. Diese Eigenschaften erklären sich aus einer Modifizierung der Pellikelschicht (Hertel *et al.*, 2017). Für tanninsäurehaltigen grünen Tee ließen sich plaque- und entzündungshemmende Eigenschaften nachweisen (Radafshar *et al.*, 2017). Nachteilig an der 5%igen Tanninsäure-Spüllösung ist seine unangenehme Adstringenz, welche bei Anwendung in der Mundhöhle einen bitteren und pelzigen Nachgeschmack hinterlässt. Eine Pufferung der sauren Tanninsäure-Spüllösung auf einen neutralen pH-Wert scheint diese Adstringenz aufzuheben (Lawless *et al.*, 1996).

Um einen pH-Einfluss der Spüllösung *Tanninsäure*, welche mit einem pH-Wert von 2,5 in einem relativ sauren Bereich liegt, auszuschließen, wurde in einem Nebenversuch zusätzlich die Spüllösung *Salzsäure* eingesetzt, welche ebenfalls einen pH-Wert von 2,5 aufwies (Kap. 4.1.6). Aufgrund der Puffereigenschaften des Speichels ist von keinem antibakteriellen Effekt auf die Speichelbakterien auszugehen.

### 5.1.2 Methoden

#### a. Studiendesign

Mit fünf Versuchspersonen liegt die Arbeit für eine klinisch experimentelle Studie in einem üblichen Bereich. Eine kleine Anzahl an Probanden und eine größere Anzahl an getesteten Substanzen ist in vergleichbaren *In-vivo*-Studien die Regel (Hannig, C. *et al.*, 2013; Hertel *et al.*, 2017). Dass alle Probanden aufgrund ihres Zahnmedizinstudiums eine überdurchschnittlich gute Mundhygiene aufweisen, vermindert jedoch die Repräsentativität.

#### b. BacLight™-Zellvitalität

Bei einem Großteil der bisherigen Untersuchungen über die antibakterielle Wirksamkeit von Mundspüllösungen auf die Speichelbakterien handelt es sich um *in-vitro*-Studien, welche auf

der Untersuchung von Bakterien beruhen (Roberts und Addy, 1981; Latimer *et al.*, 2015). Die Aussagekraft dieser Studien ist limitiert, da nicht alle Bakterien in der Kultur angezüchtet werden können (Joux und Lebaron, 2000). Hinzu kommen viele weitere äußere Einflüsse wie beispielsweise die Dauer der Inkubation, die Umgebungstemperatur oder der Luftdruck, welche nicht genau wiedergegeben werden können und so die Reproduzierbarkeit einschränken (Boulos *et al.*, 1999). Eine weitere Einschränkung der Vergleichbarkeit von *in-vitro*-Studien mit *in-vivo*-Studien liegt darin, dass die physiologischen und metabolischen Bedingungen, welche der Speichel in der Mundhöhle vorfindet, im Rahmen einer Bakterienkultur nur sehr unzureichend nachgeahmt werden können (Biggerstaff *et al.*, 2006). Viele dieser Nachteile lassen sich durch eine relativ direkte Auswertung bei Anwendung fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen vermeiden.

Die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie beinhaltet jedoch auch mögliche Fehlerquellen. So besteht die Möglichkeit einer nicht gleichmäßigen Gewichtung der Anfärbung toter und lebender Zellen. Nach Tawakoli *et al.* ist hiervon jedoch nicht auszugehen (Tawakoli *et al.*, 2013). Unter gewissen Bedingungen können Bakterien mit beschädigter Membran auch in der Lage sein, diese wiederherzustellen und sich zu vermehren – solche Bakterien können als ‚tot‘ gezählt werden. Umgekehrt können manche Bakterien mit intakter Membran nicht in der Lage sein, sich in einem Nährmedium zu vermehren und trotzdem können sie als ‚lebend‘ gezählt werden (Roszak und Colwell, 1987).

Dennoch ist die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung das beste Mittel zur Untersuchung der Zellvitalität und findet Anwendung in zahlreichen Studien (Weiger *et al.*, 1998; Tahan, 2018; Kirsch *et al.*, 2020). Sie zeichnet sich gegenüber anderen Methoden durch bestimmte Vorteile aus. Diese liegen im vergleichsweise geringen Zeitaufwand und der simplen Handhabung zur Erlangung einer Übersicht über die Zellvitalitäten (Boulos *et al.*, 1999), der Möglichkeit, mittels SYTO-9/PI-Doppelfärbung lebende und tote Bakterien gleichzeitig auszuzählen (Boulos *et al.*, 1999), und im Erkennen von Bakterien, die auf einer Kulturplatte nicht angezüchtet werden können (Joux und Lebaron, 2000).

### c. Transmissionselektronenmikroskopie

Zur Darstellung ultrastruktureller Veränderungen ist die Transmissionselektronenmikroskopie ein sehr geeignetes Mittel und wird in vielen Untersuchungen angewandt. Es können in biomolekularen Untersuchungen Auflösungen von wenigen Nanometern erreicht werden (Jin, 2008). Die Darstellung der Ultrastrukturen biologischer Proben erfordert vor allem eine aus-

reichende Kontrastierung, ohne welche die Elektronenstreuung der leichten Elemente *C*, *H*, *O* und *N* zu schwach ist und kein scharfes Bild erzeugt werden kann (Jin, 2008). Um den geringen Kontrast in der Transmissionselektronenmikroskopie zu erhöhen, wurden Färbemethoden mit Schwermetallen, v.a. mit Osmiumtetroxid, entwickelt, welche bis heute eingesetzt werden (Porter *et al.*, 1945). In dieser Studie wurde 3%iges Bleicitrat verwendet, da es die Elektronenstreuung erhöht und somit zu einem höheren Kontrast führt (Reynolds, 1963). Bis vor mehreren Jahren wurde in der Transmissionselektronenmikroskopie bei biologischen Proben zur Kontrastierung gewöhnlicherweise Uranylacetat angewandt. Da es sich bei Uranylacetat um ein radioaktives und toxisches Kontrastmittel handelt, gelten bei dessen Anwendung und Entsorgung hohe Anforderungen an die Arbeitssicherheit und den Umweltschutz. Mittlerweile lässt sich Uranylacetat mit *UranylLess*, einer neuen nicht-radioaktiven und weniger toxischen Kontrastierungsreagenz, welche auch in der vorliegenden Untersuchung Anwendung gefunden hat, substituieren. *UranylLess* besteht aus den Lanthanoiden *Lanthan*, *Dysprosium* und *Gadolinium* (Benmeradi *et al.*, 2015).

Die Transmissionselektronenmikroskopie ist ein sehr geeignetes Verfahren zur ultrastrukturellen Analytik und findet in vielen Gebieten der Medizin Anwendung. Zur Analytik von Speichel und Speichelbakterien mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie gibt es ebenfalls mehrere Untersuchungen (Kensche *et al.*, 2017; Kirsch *et al.*, 2020). Die genannten Untersuchungen haben sich v.a. mit dem Einfluss verschiedener Substanzen auf die Pellikelschicht beschäftigt. Kelstrup *et al.* erforschten – ebenfalls mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie – die Oberflächenultrastruktur verschiedener Bakterien der Mundhöhle (Kelstrup *et al.*, 1979). Die in der vorliegenden Arbeit im Speichel gefundenen Aggregationen aus Hydroxylapatitkristallen und Speichelbakterien konnten auch in anderen Untersuchungen entdeckt werden (Tahan, 2018).

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden die antibakteriellen Effekte der reinen Substanzen *Chitosan*, *Hydroxylapatit* und *Tanninsäure* in Form von Spüllösungen auf den Speichel untersucht. Den Einfluss auf die Speichelbakterien und etwaige ultrastrukturelle Veränderungen des Speichels unter Anwendung einer Spüllösung mit Hydroxylapatit untersuchte 2018 bereits Tahan (Tahan, 2018). In der zitierten Arbeit wurde die Spüllösung *Biorepair* (Dr. Kurt Wolff GmbH, Bielefeld, Deutschland) eingesetzt. Hierin sind jedoch auch andere Wirkstoffe, wie z.B. die Zuckeralkohole *Xylitol* und *Sorbitol* oder das anionische Tensid *Natriumlaurylsulfat* enthalten, weswegen ein direkter Vergleich nicht möglich ist.

Antibakterielle Effekte ließen sich besonders für die Spüllösungen *Chitosan* und *Tanninsäure* bestätigen – auch wenn sie zeitlich beschränkt waren.

Eine interessante Beobachtung, die allen Ergebnissen der drei wirksamen Spüllösungen *CHX*, *Chitosan* und *Tanninsäure* zugrunde liegt, ist das Phänomen, dass hohe initiale Werte der bakteriellen Zellvitalität mit starken Wirkungen der jeweilige Spüllösungen korrelieren *et vice versa* (Abb. 9, Abb. 12 und Abb. 18). Bei den antibakteriell unwirksamen Spüllösungen *Wasser* und *Hydroxylapatit* ist dieser Zusammenhang nicht zu beobachten.

Die Werte der bakteriellen Zellvitalitäten vor dem Spülen, bzw. nach dem Spülen mit Wasser liegen im Bereich von ca. 80–90 Prozent, die nach dem Spülen mit den antibakteriell wirksamen Spüllösungen *Chlorhexidin*, *Chitosan* und *Tanninsäure* zwischen ca. 35–50 Prozent. Dieser Verlauf der Zellvitalitäten der Speichelbakterien nach Anwendung von Mundspüllösungen deckt sich auch mit den Ergebnissen einer ähnlichen Untersuchung von Weiger *et al.* (Weiger *et al.*, 1998).

### 5.2.1 Mundspülung mit den Kontrollen

Die Zellvitalitäten bei den Kontrollspüllösungen *Wasser* und *Chlorhexidin* zeigten erwartbare Ergebnisse. Bei der Spüllösung *Wasser* kann man initial lediglich einen geringen „Clearance-Effekt“ um etwa 5% registrieren. Anschließend ist ein Wiederanstieg auf das Ausgangsniveau zu beobachten. Zu allen Zeitpunkten in den TEM-Aufnahmen der Negativkontrolle *Wasser* sowie in den Aufnahmen zu den Zeitpunkten vor dem Spülen und zwei Stunden nach dem

Spülen unter Anwendung der übrigen Spüllösungen sind oftmals Bakterienzellen im Stadium der Zellteilung zu erkennen. Man kann hieraus schließen, dass das Milieu kurz vor der Fixierung der Speichelproben für die Speichelbakterien sehr geeignet war (Abb. 23 und Abb. 29). Die Positivkontrolle *Chlorhexidin* kann als einzige Spüllösung eine langandauernde antibakterielle Wirkung aufweisen. Selbst nach zwei Stunden liegt die Reduktion der Zellvitalität bei über einem Drittel (Abb. 22). Chlorhexidin ist auch noch nach drei bzw. sieben Stunden antibakteriell aktiv, wie Ergebnisse anderer *in vivo* und *in vitro* Studien zeigen (Addy und Wright, 1978; Tomás *et al.*, 2009; Yates *et al.*, 1997). Dies liegt daran, dass Chlorhexidin sehr gut an oralen Oberflächen haftet und in der Mundhöhle noch nach elf Stunden in einem Bereich von mehreren Mikrogramm pro Milliliter nachweisbar ist (Reda *et al.*, 2020). Die kurzfristigen Ergebnisse nach einer bzw. nach 30 Minuten zeigen mit einer Reduktion der Zellvitalität *in vivo* um mehr als die Hälfte eine sehr gute antibakterielle Wirkung. Das Wirkungsmaximum der CHX-Mundspüllösung liegt vermutlich im Bereich zwischen einer bis 30 Minuten, da zwei Probanden fallende, zwei steigende Zellvitalitäten aufweisen (Abb. 9). Andere Untersuchungen kommen hier zu unterschiedlichen Ergebnissen: einmal liegt das Wirkungsmaximum bei einer Stunde (Tahan, 2018; Yates *et al.*, 1997), einmal liegt es direkt nach dem Spülen (Cousido *et al.*, 2010). 0,2%ige Chlorhexidindigluconat-Spüllösungen sind in der Lage, das Wachstum von Biofilmen zu stoppen und sowohl die Dicke bereits etablierter Biofilme zu verschmälern als auch die Vitalität der in der Plaque enthaltenen Bakterien zu verringern (Martínez-Hernández *et al.*, 2020).

In den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigt sich ebenfalls sehr gut die antibakterielle Wirkung nach einer und nach 30 Minuten. Auch nach zwei Stunden ist noch ein deutlicher antibakterieller Effekt nachzuweisen. Eine Minute nach dem Spülen haben sich auf der Zelloberfläche einiger Speichelbakterien kleine globuläre Strukturen gebildet (Abb. 30). Es ist bekannt, dass Chlorhexidin, wenn es mit Blutplasma oder Speichelproteinen in Kontakt kommt, Präzipitate ausbildet (Rølla *et al.*, 1970). So ist es denkbar, dass es sich bei diesen Adhäsionen an der bakteriellen Zellwand um Präzipitate von Proteinen handelt.

### 5.2.2 Mundspülung mit Chitosan

Die 0,5%ige Chitosanlösung zeigt eine Minute nach dem Spülen im Vergleich mit den anderen beiden Spüllösungen die beste antibakterielle Wirkung. Auch nach einer halben Stunde kann noch ein gewisser antibakterieller Effekt nachgewiesen werden. Diese Beobachtung

deckt sich auch mit den Ergebnissen anderer Studien. So zeigt z.B. Chitosan nach Verkaik *et al.* als Additiv in Zahnpasta *in vitro* bei reifen Biofilmen sogar ein besseres antibakterielles Verhalten als Chlorhexidin (Verkaik *et al.*, 2011). Als Zusatz in Kaugummis verringert Chitosan das Wachstum der Speichelbakterien und reduziert ihre Gesamtzahl (Hayashi *et al.*, 2007b).

Die antibakterielle und agglutinierende Wirkung wurde für Chitosan bereits oft nachgewiesen (Sudarshan *et al.*, 1992) und ließ sich auch in dieser Studie anhand der TEM-Bilder nach einer Minute und schwächer auch nach einer halben Stunde feststellen. Nach zwei Stunden konnte dieser Nachweis in der vorliegenden Arbeit nicht mehr erbracht werden.

Die Literatur zur antibakteriellen Wirksamkeit von Chitosan ist oftmals widersprüchlich, da seine Wirkung zum einen stark abhängig vom Molekulargewicht und der Konzentration, zum anderen von den untersuchten Keimen ist (Zheng und Zhu, 2003; Verkaik *et al.*, 2011). Nach Zheng und Zhu erhöht sich die antibakterielle Wirkung mit steigendem Molekulargewicht gegen *S. aureus*, wohingegen sie gegen *E. coli* schwächer werde. Nach Decker *et al.* zeigt Chitosan kaum einen Einfluss auf planktonische Streptokokken (Decker *et al.*, 2005), welche als primäre Kolonisatoren immerhin eine entscheidende Rolle in der Entstehung des Biofilms spielen (Nyvad *et al.*, 1987). Einen weiteren Einflussfaktor auf die antibakterielle Wirkung stellt der pH-Wert dar. So wirkt Chitosan besonders gut, wenn der Umgebungs-pH-Wert unter dem pKa-Wert von Chitosan liegt (Kong *et al.*, 2010). Dies ist bei Werten von 6,5–6,7 der Fall.

Die Frage, ob Chitosan möglicherweise antiadhäsive Eigenschaften besitzt, Speichelbakterien also in ihrer Anlagerung an die Zahnoberfläche hemmt, war nicht Gegenstand dieser Arbeit und es kann daher hierzu keine Aussage getroffen werden. Es gibt allerdings bereits mehrere Studien, die solche antiadhäsive Wirkungen belegen. Tarsi *et al.* zeigen zum Beispiel, dass niedrigmolekulares Chitosan die Adsorption von *S. mutans* an Hydroxylapatit um 47 bis 66% senken kann (Tarsi *et al.*, 1997). Auch Stamford *et al.* weisen plaquereduzierende und antibakterielle Eigenschaften des Chitosans nach (Stamford *et al.*, 2013).

### 5.2.3 Mundspülung mit Hydroxylapatit

Hydroxylapatit konnte in der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung nur eine Minute nach dem Spülen eine geringe antibakterielle Wirkung aufweisen. Von einer darüber hinaus

gehenden antibakteriellen Wirksamkeit ist nicht auszugehen (Kensche *et al.*, 2017), was auch in dieser Studie bestätigt werden konnte. Tahan kann in einer ähnlichen Untersuchung für eine hydroxylapatithaltige Mundspüllösung zwar einen moderaten antibakteriellen Effekt nachweisen, jedoch sind dem Präparat noch weitere Wirkstoffe wie die Zuckeralkohole Xylitol und Sorbitol zugefügt (Tahan, 2018).

Es konnten nach einer Minute und nach einer halben Stunde in der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung öfter Agglutinationen durch eingelagerte Apatitkristalle festgestellt werden. Kensche *et al.* und Tahan kommen zur gleichen Beobachtung (Kensche *et al.*, 2017; Tahan, 2018). Kensche *et al.* zeigen, dass Hydroxylapatit die Bakterienzelladhäsion an der Zahnoberfläche verringert (Kensche *et al.*, 2017). Da in der vorliegenden Untersuchung allein der Effekt auf den Speichel untersucht wurde, kann lediglich die Adhäsion der Kristalle an die Bakterien verifiziert werden, hingegen nicht die Herabsetzung der Adhäsion der Bakterien an die Zahnoberfläche oder eine Einlagerung von Hydroxylapatitkristallen in den Schmelz. Man kann jedoch annehmen, dass die Bildung von Aggregaten aus Hydroxylapatitkristallen und Speichelbakterien, die Anzahl planktonischer Bakterien im Speichel mindert und so eine plaquehemmende Wirkung entfaltet. Zu dem Ergebnis der Herabsetzung der bakteriellen Adhäsion an den Zahnschmelz *in situ* kommen auch Hannig, C. *et al.* (Hannig, C. *et al.*, 2013). In der gleichen Studie konnte *in vitro* außerdem eine antibakterielle Wirksamkeit gegen *S. mutans* aufgezeigt werden. Remineralisierungen des Schmelzes durch Einlagerung von Hydroxylapatitkristallen konnten bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen werden (Hill *et al.*, 2015; Tschoppe *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2009).

#### 5.2.4 Mundspülung mit Tanninsäure

Antibakterielle und antivirale Eigenschaften sind bei Tanninsäure schon lange bekannt. *In vivo* und *in vitro* Studien bestätigen seine antibakterielle Wirksamkeit (Radafshar *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2010). Auch in dieser Studie konnte dies verifiziert werden. Es schneidet bezogen auf seine antibakterielle Wirksamkeit ähnlich gut wie Chitosan ab, bloß mit einem schwächeren initialen Effekt. Nach zwei Stunden ist auch bei dieser Spüllösung keine antibakterielle Wirkung mehr erkennbar.

Als starkes Antioxidans weist die Tanninsäure ein hohes Denaturierungsvermögen gegenüber Proteinen auf. Zwei Gruppen der Speichelproteine, die prolinreichen Proteine und die Histatine wirken als Antagonisten gegenüber der denaturierenden Tanninsäure und vermögen diese

zu inaktivieren und auszufällen (Bennick, 2002). Bei der hohen Tanninsäure-Konzentration nach dem Spülen mit der 5%igen Tanninsäure-Spüllösung ist dieser natürliche Abwehrmechanismus jedoch überwunden. In den TEM-Untersuchungen zeigte sich ein Netz aus granulären Strukturen, wobei es sich um denaturierte Proteinaggregate handelt. Die Speichelproteine sind, nachdem sie mit der Tanninsäure in Kontakt gekommen sind, als Präzipitate ausgefallen. Es sieht in den Aufnahmen so aus, als verfangen sich die Bakterien in diesen Präzipitaten und dass Aggregationen hierdurch verursacht wurden.

Die Ergebnisse des Nebenversuchs lassen vermuten, dass es keinen oder nur einen sehr schwachen Einfluss des pH-Wertes auf die antibakterielle Wirksamkeit der Tanninsäure gibt (Kap. 4.1.6). Dass eine antibakterielle Wirkung allein vom pH-Wert ausgeht, konnte durch die Spülung mit Salzsäure (pH 2,5) falsifiziert werden. Durch Neutralisierung der sauren Tanninsäurelösung auf einen pH-neutralen Wert von 7 konnte die unangenehme Adstringenz eliminiert werden. Lawless *et al.* kamen zu ähnlichen Resultaten (Lawless *et al.*, 1996).

### 5.3 Schlussfolgerungen

Die kurzfristige antibakterielle Wirksamkeit der Tanninsäure und des Chitosans konnten deutlich nachgewiesen werden. Einen langfristigen und somit als Mundspüllösung therapeutisch sinnvoll nutzbaren Effekt erzielte hingegen nur die Positivkontrolle *Chlorhexidin*. Eine langfristige Änderung der Mundflora sowie der Effekt auf die Biofilmbildung unter Einsatz der biologisch verträglichen Substanzen *Chitosan*, *Hydroxylapatit* und *Tanninsäure* sollte weiter erforscht werden. Hierbei ließe sich sicherlich auch die antiadhäsive Wirkung des Hydroxylapatits bestätigen. Letzteres hatte bezogen auf seine antibakteriellen Eigenschaften in dieser Studie keine signifikante Wirkung.

Eine alleinige Verwendung der Tanninsäure oder des Chitosans als Mundspüllösung kann angesichts ihrer kurzzeitigen antibakteriellen Eigenschaften nicht sinnvoll eingesetzt werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass mit anderen Substanzen synergetische Effekte erzielt werden können, weswegen eine Anwendung als Additiv oder Adjuvans denkbar ist. Dies erfordert allerdings weitere Studien. Andere Verwendungsmöglichkeiten sind ebenfalls denkbar. So kann bspw. Chitosan – aufgrund seines erforderlichen sauren pH-Wertes – als Einlage in Zahnfleischtaschen im Rahmen der Parodontitis-Therapie eingesetzt werden. Eine steigende Verbreitung der Tanninsäure als Mundspüllösung könnte in seiner pH-neutralen, nicht-adstringenten Form realisiert werden, wenn man dessen verfärbende Eigenschaften unter Beibehaltung seiner antibakteriellen Wirkung ausschalten könnte. Auch dies sollte Ziel weiterer Forschungen sein, um natürliche und kostengünstige Mundspüllösungen zu entwickeln.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Addy M, Wright R (1978) Comparison of the in vivo and in vitro antibacterial properties of povidone iodine and chlorhexidine gluconate mouthrinses. *Journal of Clinical Periodontology*, 5:198-205
2. 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. *Clinical Oral Investigations*, 10:102-107
3. Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP (2002) Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 109:527-533
4. Benmeradi N, Payre B, Goodman SL (2015) Easier and safer biological staining: High contrast uranylless staining of TEM grids using mPrep/g capsules. *Microscopy and Microanalysis*, 21:721-722
5. Bennick A (2002) Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13:184-196
6. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M (2010) Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62:83-99
7. Biggerstaff JP, Le Puil M, Weidow BL, Prater J, Glass K, Radosevich M, White DC (2006) New methodology for viability testing in environmental samples. *Molecular and Cellular Probes*, 20:141-146
8. Boulos L, Prevost 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. *Journal of Microbiological Methods*, 37:77-86
9. Collins TJ (2007) ImageJ for microscopy. *Biotechniques*, 43:25-30
10. Costa EM, Silva S, Tavaría FK, Pintado MM (2013) Study of the effects of chitosan upon *Streptococcus mutans* adherence and biofilm formation. *Anaerobe*, 20:27-31
11. Costa EM, Silva S, Pina C, Tavaría FK, Pintado M (2014) Antimicrobial effect of chitosan against periodontal pathogens biofilms. *SOJ Microbiology & Infectious Diseases*, 2:1-6

12. Cousido MC, Carmona IT, García-Caballero L, Limeres J, Álvarez M, Diz P (2010) In vivo substantivity of 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria. *Clinical Oral Investigations*, 14:397-402
13. Das DK, Sato M, Ray PS, Maulik G, Engelman RM, Bertelli AA, Bertelli A (1999) Cardioprotection of red wine: role of polyphenolic antioxidants. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 25:115-120
14. Decker EM, Von Ohle C, Weiger R, Wiech I, Brex M (2005) A synergistic chlorhexidine/chitosan combination for improved antiplaque strategies. *Journal of Periodontal Research*, 40:373-377
15. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Wade WG (2010) The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology*, 192:5002-5017
16. Dreizen S, Brown LR, Daly TE, Drane JB (1977) Prevention of xerostomia-related dental caries in irradiated cancer patients. *Journal of Dental Research*, 56:99-104
17. Elavarasu S, Jayapalan P, Murugan T (2012) Bugs that debugs: Probiotics. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 4:319-322
18. Eldridge KR, Finnie SF, Stephens JA, Mauad AM, Munoz CA, Kettering JD (1998) Efficacy of an alcohol-free chlorhexidine mouthrinse as an antimicrobial agent. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 80:685-690
19. Fassel TA, Edmiston Jr, CE (1999) Bacterial biofilms: Strategies for preparing glycocalyx for electron microscopy. *Methods in Enzymology*, 310:194-203
20. Flötra L, Gjermo PER, Rölla G, Waerhaug J (1971) Side effects of chlorhexidine mouth washes. *European Journal of Oral Sciences*, 79:119-125
21. Frey A, Giannasca KT, Weltzin R, Giannasca PJ, Reggio H, Lencer WI, Neutra MR (1996) Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. *The Journal of Experimental Medicine*, 184:1045-1059
22. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, Gillevet P M (2010) Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLOS Pathogens*, 6:1000713
23. Haffajee AD, Yaskell T, Socransky SS (2008) Antimicrobial effectiveness of an herbal mouthrinse compared with an essential oil and a chlorhexidine mouthrinse. *The Journal of the American Dental Association*, 139:606-611

24. Hannig M, Hannig C (2010) Nanomaterials in preventive dentistry. *Nature Nanotechnology*, 5:565-569
25. Hannig M, Joiner A (2006) The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monographs in Oral Science*, 19:29-64
26. Hannig C, Basche S, Burghardt T, Al-Ahmad A, Hannig M (2013) Influence of a mouthwash containing hydroxyapatite microclusters on bacterial adherence in situ. *Clinical Oral Investigations*, 17:805-814
27. Haslam E (1996a) Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59:205-215
28. Haslam E, Stern JL, Hagerman AE, Steinberg PD, Mason PK (1996b) Phlorotannin-protein interactions. *Journal of Chemical Ecology* 22:1887–1899
29. Hayashi Y, Ohara N, Ganno T, Ishizaki H, Yanagiguchi K (2007a) Chitosan-containing gum chewing accelerates antibacterial effect with an increase in salivary secretion. *Journal of Dentistry*, 35:871-874
30. Hayashi Y, Ohara N, Ganno T, Yamaguchi K, Ishizaki T, Nakamura T, Sato M (2007b) Chewing chitosan-containing gum effectively inhibits the growth of cariogenic bacteria. *Archives of oral biology*, 52:290-294
31. Hegstad K, Langsrud S, Lunestad BT, Scheie AA, Sunde M, Yazdankhah SP (2010) Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? *Microbial Drug Resistance*, 16:91-104
32. Herlofson BB, Barkvoll P (1994) Sodium lauryl sulfate and recurrent aphthous ulcers: a preliminary study. *Acta Odontologica Scandinavica*, 52:257-259
33. 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 Research*, 51:34-45
34. Hill GB (1998) Preterm birth: associations with genital and possibly oral microflora. *Annals of Periodontology*, 3:222-232
35. Hill RG, Gillam DG, Chen X (2015) The ability of a nano hydroxyapatite toothpaste and oral rinse containing fluoride to protect enamel during an acid challenge using 19F solid state NMR spectroscopy. *Materials Letters*, 156:69-71

36. Huang SB, Gao, SS, Yu, HY (2009) Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion in vitro. *Biomedical Materials*, 4:034104
37. Jin R (2008) Hochstabile Nanopartikel für Biologie und Biomedizin. *Angewandte Chemie*, 120:6852-6855
38. Jones SE, Versalovic J (2009) Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiology*, 9:1-9
39. Jordan RA, Bodechtel C, Hertrampf K, Hoffmann T, Kocher T, Nitschke I, Micheelis W (2014) The Fifth German Oral Health Study (Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie, DMS V)—rationale, design, and methods. *BMC Oral Health*, 14:161
40. Joux F, Lebaron P (2000) Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection*, 2:1523-1535
41. Kandra L, Gyémánt G, Zajác Á, Batta G (2004) Inhibitory effects of tannin on human salivary  $\alpha$ -amylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319:1265-1271
42. Kapil V, Haydar SM, Pearl V, Lundberg JO, Weitzberg E, Ahluwalia A (2013) Physiological role for nitrate-reducing oral bacteria in blood pressure control. *Free Radical Biology and Medicine*, 55:93-100
43. Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE, Paster BJ (2003) Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:558-563
44. Kelstrup J, Theilade J, Fejerskov O (1979) Surface ultrastructure of some oral bacteria. *European Journal of Oral Sciences*, 87:415-423
45. 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. *Archives of Oral Biology*, 80:18-26
46. Kilian M, Chapple ILC, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AML, Zaura E (2016) The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. *British Dental Journal*, 221:657-666
47. Kim TJ, Silva JL, Kim MK, Jung YS (2010) Enhanced antioxidant capacity and antimicrobial activity of tannic acid by thermal processing. *Food Chemistry*, 118:740-746
48. Kirsch J, Jung A, Hille K, König B, Hannig C, Kölling-Speer I, Hannig M (2020) Effect of *fragaria vesca*, *hamamelis* and *tormentil* on the initial bacterial colonization in situ. *Archives of Oral Biology*, 118:104853

49. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ (2010) Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144:51-63
50. Kroes I, Lepp PW, Relman DA (1999) Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96:14547-14552
51. Krom BP, Kidwai S, Ten Cate, JM (2014) Candida and other fungal species: forgotten players of healthy oral microbiota. *Journal of Dental Research*, 93:445-451
52. Kumar MNR (2000) A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46:1-27
53. Latimer J, Munday JL, Buzza KM, Forbes S, Sreenivasan PK, McBain, AJ (2015) Antibacterial and anti-biofilm activity of mouthrinses containing cetylpyridinium chloride and sodium fluoride. *BMC Microbiology*, 15:1-8
54. Lawless HT, Horne J, Giasi P (1996) Astringency of organic acids is related to pH. *Chemical Senses* 21:397-403
55. Li Y, Caufield PW, Dasanayake AP, Wiener HW, Vermund SH (2005) Mode of delivery and other maternal factors influence the acquisition of Streptococcus mutans in infants. *Journal of Dental Research*, 84:806-811
56. Loe H (1993) Periodontal disease: the sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 16:329-334
57. Lu Y, Bennick A (1998) Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Archives of Oral Biology*, 43:717-728
58. Marsh P, Martin MV (2003) *Orale Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
59. Martínez-Hernández M, Reda B, Hannig M (2020) Chlorhexidine rinsing inhibits biofilm formation and causes biofilm disruption on dental enamel in situ. *Clinical Oral Investigations*: 24:3843-3853
60. McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich, CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P (2003) Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of in vitro oral bacterial ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:4770-4776
61. Mendieta C, Vallcorba N, Binney A, Addy M (1994) Comparison of 2 chlorhexidine mouthwashes on plaque regrowth in vivo and dietary staining in vitro. *Journal of Clinical Periodontology*, 21:296-300

62. Meyer F, Enax J (2018) Die Mundhöhle als Ökosystem: Der sanfte Weg gegen Karies und Parodontitis?. *Biologie in unserer Zeit*, 48:62-68
63. Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M (2009) Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome research*, 19:636-643
64. Nelun Barfod M, Magnusson K, Lexner MO, Blomqvist S, Dahlén G, Twetman S (2011) Oral microflora in infants delivered vaginally and by caesarean section. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 21:401-406
65. Nyvad B, Kilian M (1987) Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 95:369-380
66. Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, Beck J (1996) Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *Journal of Periodontology*, 67:1103-1113
67. Offenbacher S, Boggess KA, Murtha AP, Jared HL, Lieff S, McKaig RG, Beck JD (2006) Progressive periodontal disease and risk of very preterm delivery. *Obstetrics & Gynecology*, 107:29-36
68. Ondruschka J, Trutnau M, Bley T (2008) Gewinnung und Potenziale des Biopolymers Chitosan. *Chemie Ingenieur Technik*, 80:811-820
69. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Dewhirst FE (2001) Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of Bacteriology*, 183:3770-3783
70. Perugini P, Genta I, Conti B, Modena T, Pavanetto F (2003) Periodontal delivery of ipriflavone: new chitosan/PLGA film delivery system for a lipophilic drug. *International Journal of Pharmaceutics*, 252:1-9
71. Poretti F, Rosen T, Körner B, Vorwerk D (2005) Randomisierte Untersuchung zur Anwendung eines Chitosan-Gerinnungspads zur Blutstillung bei transbrachialen Angiographien. In: *RöFo-Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 177:1260-1266
72. Porter KR, Claude A, Fullam EF (1945) A study of tissue culture cells by electron microscopy: methods and preliminary observations. *The Journal of Experimental Medicine*, 81:233-246
73. Posner T, Domanski C (2009) Using beneficial bacteria in oral health care. *Dental Nursing*, 5:40-42

74. 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. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 8:12184
75. 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. *Archives of Oral Biology*, 110:104623
76. Rehage M, Delius J, Hofmann T, Hannig M (2017) Oral astringent stimuli alter the enamel pellicle's ultrastructure as revealed by electron microscopy. *Journal of Dentistry*, 63:21-29
77. Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 17:208-212
78. Roberts WR, Addy M (1981) Comparison of the in vivo and in vitro antibacterial properties of antiseptic mouthrinses containing chlorhexidine, alexidine, cetyl pyridinium chloride and hexetidine: relevance to mode of action. *Journal of Clinical Periodontology*, 8:295-310
79. Rølla G, Løe H, Rindom Schiött C (1970) The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and salivary mucins. *Journal of Periodontal Research*, 5:90-95
80. Rølla G, Rykke G (1994) Evidence for presence of micelle-like protein globules in human saliva. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 3:177-182
81. Roszak DB, Colwell RR (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological reviews*, 51:365-379
82. Roveri N, Battistella E, Bianchi CL, Foltran I, Foresti E, Iafisco M, Rimondini L (2009) Surface enamel remineralization: biomimetic apatite nanocrystals and fluoride ions different effects. *Journal of Nanomaterials*, 2009:746383
83. Rupf S, Jentsch H, Eschrich K (2007) Lebensraum Mundhöhle: Mikroorganismen und orale Erkrankungen. *Biologie in unserer Zeit*, 37:51-59
84. Scalbert A (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30:3875-3883
85. Şenel S, İkinçi G, Kaş S, Yousefi-Rad A, Sargon MF, Hıncal AA (2000) Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 193:197-203

86. Shetty S, Kohad R, Yeltiwar R (2010) Hydroxyapatite as an in-office agent for tooth hypersensitivity: A clinical and scanning electron microscopic study. *Journal of Periodontology*, 81:1781-1789
87. Soares RV, Lin T, Siqueira CC, Bruno LS, Li X, Oppenheim FG, Troxler RF (2004) Salivary micelles: identification of complexes containing MG2, sIgA, lactoferrin, amylase, glycosylated proline-rich protein and lysozyme. *Archives of Oral Biology*, 49:337-343
88. Stace TM, Damiano ER (2001) An electrochemical model of the transport of charged molecules through the capillary glycocalyx. *Biophysical Journal*, 80:1670-1690
89. Stamford TCM, Stamford-Arnaud TM, Cavalcante HDM, Macedo RO, Campos-Takaki GD (2013) Microbiological chitosan: Potential application as anticariogenic agent. *Practical Applications in Biomedical Engineering*, 9:229-244
90. Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D (1992) Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, 6:257-272
91. Tahan N (2018) Effect of Different Mouth rinses on Salivary Bacteria in vivo. Medizinische Dissertation, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg (Saar)
92. Tarsi R, Muzzarelli RAA, Guzman CA, Pruzzo C (1997) Inhibition of *Streptococcus mutans* adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosans. *Journal of Dental Research*, 76:665-672
93. Tawakoli PN, Al-Ahmad A, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C (2013) Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clinical Oral Investigations*, 17:841-850
94. Tomás I, García-Caballero L, Cousido MC, Limeres J, Alvarez M, Diz P (2009) Evaluation of chlorhexidine substantivity on salivary flora by epifluorescence microscopy. *Oral Diseases*, 15:428-433
95. Tschoppe P, Zandim DL, Martus P, Kielbassa AM (2011) Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *Journal of Dentistry*, 39:430-437
96. Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JG, Veerman EC (2004) Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology?. *Caries Research*, 38:247-253
97. Vano M, Derchi G, Barone A, Pinna R, Usai P, Covani U (2018) Reducing dentine hypersensitivity with nano-hydroxyapatite toothpaste: a double-blind randomized controlled trial. *Clinical Oral Investigations*, 22:313-320

98. Varoni E, Tarce M, Lodi G, Carrassi A (2012) Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatologica*, 61:399-419
99. Verkaik MJ, Busscher HJ, Jager D, Slomp AM, Abbas F, van der Mei HC (2011) Efficacy of natural antimicrobials in toothpaste formulations against oral biofilms in vitro. *Journal of Dentistry*, 39:218-224
100. Warner RR, Myers MC, Burns J, Mitra S (1993) Analytical electron microscopy of chlorhexidine-induced tooth stain in humans: direct evidence for metal-induced stain. *Journal of Periodontal Research*, 28:255-265
101. Weiger R, Netuschil L, Wester-Ebbinghaus T, Brex M (1998) An approach to differentiate between antibacterial and antiadhesive effects of mouthrinses in vivo. *Archives of Oral Biology*, 43:559-565
102. Woessner M, Smoliga JM, Tarzia B, Stabler T, Van Bruggen M, Allen JD (2016) A stepwise reduction in plasma and salivary nitrite with increasing strengths of mouthwash following a dietary nitrate load. *Nitric Oxide*, 54:1-7
103. Yanagida A, Kanda T, Tanabe M, Matsudaira F, Oliveira Cordeiro JG (2000) Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors of mutans streptococci. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:5666-5671
104. Yates R, Moran J, Addy M, Mullan PJ, Wade WG, Newcombe R (1997) The comparative effect of acidified sodium chlorite and chlorhexidine mouthrinses on plaque regrowth and salivary bacterial counts. *Journal of Clinical Periodontology*, 24:603-609
105. Zern TL, Fernandez ML (2005) Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 135:2291-2294
106. Zhao H, He W, Wang Y, Zhang X, Li Z, Yan S, Wang G (2008) Biom mineralization of large hydroxyapatite particles using ovalbumin as biosurfactant. *Materials Letters*, 62:3603-3605
107. Zheng LY, Zhu JF (2003) Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, 54:527-530

## 7 Danksagung

Für diese Arbeit möchte ich besonders meinem Doktorvater Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig danken, der mir diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat und der mir bei Schwierigkeiten stets mit Rat zur Seite stand. Ebenso möchte ich den beiden wissenschaftlichen Mitarbeitern der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde PD Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Johanna Dudek und Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Simone Trautmann für ihre Unterstützung und ihre Ratschläge Dank aussprechen. Sie konnten mir bei Fragen bzgl. der Versuchsdurchführung, der Auswertung und dem Schreiben der Doktorarbeit stets helfen. Mein Dank gilt auch Bashar Reda, welcher mir bei der Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder half und mir die Handhabung des Programms *ImageJ* beigebracht hat. Auch Belinda König von der TEM-Abteilung möchte ich an dieser Stelle nicht unerwähnt lassen. Sie hat die langwierige Einbettung der Proben übernommen, die Ultradünnschnitte angefertigt und die Bilder aufgenommen.

Ermöglicht wurde diese Arbeit durch finanzielle Förderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) für den Sonderforschungsbereich 1027 „Physikalische Modellierung von Nichtgleichgewichtsprozessen in biologischen Systemen“.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie und allen Freunden Dank aussprechen, welche vorliegende Arbeit Korrektur gelesen und mir wertvolle Ratschläge gegeben haben. Meiner Frau danke ich besonders für ihre fortwährende moralische Unterstützung während des Schreibens der Arbeit.

## 8 Lebenslauf

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

## 9 Anhang

### 9.1 Verzeichnis über die verwendeten Materialien und Geräte

#### **Materialien**

Wasser *Ampuwa*<sup>®</sup> (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland)

Chlorhexidindigluconat-Lösung (Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes)

Chitosan: Chitosan 95/3000 aus der Produktlinie *Chitoscience* (Heppe Medical Chitosan GmbH, Halle (Saale), Deutschland)

Hydroxylapatit *Kalident 100* (Kalichem, Brescia, Italien)

Tanninsäure *T0125* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kit *Art. Nr. L7012* (Invitrogen<sup>™</sup>, Molecular Probes<sup>™</sup>, Oregon, USA)

Kochsalz-Lösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

Araldite CY212 (Agar Scientific Ltd, Stansted, UK)

Uranyl-Lösung (Delta Microscopies, Mauressac, Frankreich)

3%iges Bleicitrat (Delta Microscopies, Mauressac, Frankreich)

#### **Geräte**

Zentrifuge: Heraeus Biofuge primo (Thermo Electron Corporation, Osterode, Deutschland)

Fluoreszenzmikroskop: Axio Imager.M2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland)

Mikroskopkamera: *AxioCam MRm* (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland)

Ultramikrotom: Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland)

Transmissionselektronenmikroskop: *Tecnai 12* (FEI Company, Eindhoven, Niederlande)