

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

Einfluss von experimentellen Fluorid- und Zink-Kurkuma-Zahnpasten auf die bakterielle Biofilmbildung *in situ*

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

2024

vorgelegt von:

Johanna Vieregge

geb. am: 28.01.1994 in Düsseldorf

Tag der Promotion: 15.12.2025

Dekan: Prof. Dr. M. Hannig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Rupf

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Bischoff

Meinen Eltern und meinem Bruder in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1	Deutsche Zusammenfassung	1
1.2	Abstract	2
2	EINLEITUNG.....	5
2.1	Literaturübersicht	6
2.1.1	Biofilm.....	6
2.1.2	Zahnschmelz.....	8
2.1.3	Epidemiologie oraler Erkrankungen.....	8
2.1.4	Biofilmkontrolle – die Rolle von Zahnpasten	11
2.1.5	Fluoride.....	12
2.1.6	Zinkverbindungen.....	15
2.1.7	Kurkumaextrakt.....	16
2.1.8	Ziel der Arbeit / Fragestellung.....	17
3	MATERIAL UND METHODE.....	18
3.1	Probanden.....	18
3.2	Prüfkörper und deren Montage.....	18
3.3	Prüfsubstanzen.....	19
3.4	Versuchsablauf.....	20
3.5	Fluoreszenzmikroskopie.....	23
3.6	Rasterelektronenmikroskopie.....	25
3.7	Statistik.....	26

4	ERGEBNISSE.....	27
4.1	Fluoreszenzmikroskopie.....	27
4.1.1	Bedeckung	28
4.1.2	Vitalität	33
4.2	Rasterelektronenmikroskopie - Biofilmmorphologie	39
4.2.1	Visualisierung des <i>In-situ</i> -Biofilms	41
4.2.2	Energiedispersive Röntgenspektroskopie.....	46
4.2.3	Mapping Zahnpasten	51
5	DISKUSSION.....	53
5.1	Probanden	53
5.2	Prüfkörper.....	53
5.3	Studiendesign	54
5.4	Diskussion der Auswertungsverfahren.....	55
5.4.1	Fluoreszenzmikroskopie.....	56
5.4.2	Rasterelektronenmikroskopie	57
5.4.3	Quantifizierung durch Scoring	58
5.4.4	Quantifizierung durch das Bildverarbeitungsprogramm ImageJ.....	59
5.5	Diskussion der Ergebnisse - Einfluss der Zahnpasten.....	60
5.5.1	Kontrollversuch mit Wasser und Basispaste	60
5.5.2	Versuch mit Fluoridpaste.....	61
5.5.3	Versuch mit Zink-Kurkuma-Paste.....	62
5.5.4	Mechanische Reinigung	63
5.5.5	Unmittelbarer Effekt und Substantivität.....	63
5.6	Schlussfolgerung	64

6	LITERATURVERZEICHNIS.....	65
7	DANKSAGUNG.....	82
8	LEBENSLAUF.....	83
9	ANHANG.....	84
9.1	Materialliste.....	84

Abkürzungsverzeichnis

B-P	Basispaste
CHX	Chlorhexidin
D(M)FS/T	decayed (missing) filled surface/teeth = Kariesindex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDX	energiedispersive Röntgenspektroskopie
F-P	Fluoridpaste
LDS	Fluoreszenzmikroskop
NaF	Natriumfluorid
PK	Prüfkörper
REM	Rasterelektronenmikroskop
W	Wasser
ZK-P	Zink-Kurkuma-Paste
ZnCl ₂	Zinkchlorid

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Die vorliegende *In-situ*-Studie befasst sich mit den Einflüssen experimenteller Zahnpasten, einer Fluoridpaste und einer Zink-Kurkuma-Paste, auf die bakterielle Biofilmbildung.

Die Versuche hatten zum Ziel, drei zentrale Hypothesen zu überprüfen. Dabei ging es um folgende Fragestellungen:

Erstens, ob die Zahnpasten im Vergleich zu Kontrollsubstanzen (Wasser und Basispaste) antibakterielle und antiadhäsive Effekte aufweisen, zweitens um den Unterschied zwischen mechanischer und chemischer Biofilmkontrolle sowie drittens um die Differenzierung von Lang- und Kurzzeiteffekten dieser Zahnpasten auf die Vitalität und Neubildung von Biofilmen.

Im Rahmen der Studie wurden bovine Schmelzproben in der Mundhöhle einer Biofilmbildung ausgesetzt und mit Fluoridpaste, Zink-Kurkuma-Paste oder Kontrollsubstanzen (Wasser und Basispaste) behandelt. Die Prüfkörper wurden in festgelegten Abständen (nach 30 min, 12 h, 24 h, 36 h, 47,5 h) entweder mechanisch mit Zahnbürste und der entsprechenden Zahnpasta gereinigt oder mit der Zahnpasta-Speichel-Lösung umspült. Die Entnahme der Prüfkörper erfolgte zu zwei Zeitpunkten. Ein Teil der Prüfkörper wurde nach 47,5 h entnommen, zu diesem Zeitpunkt war das letzte Putzen oder Umspülen 11,5 h her. Die Entnahme der restlichen Prüfkörper erfolgte nach einer weiteren Anwendung der Prüfsubstanzen und einer Wirkzeit von 30 min zum Zeitpunkt 48 h nach Einsetzen. Das Spülprotokoll ermöglichte durch die Differenzierung der Entnahmezeitpunkte einen Rückschluss auf Langzeit- und Kurzzeitwirkung.

Die Untersuchung der Biofilmbedeckung und Biofilmvitalität erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie, wobei jeweils zwei verschiedene Auswertungsmethoden (ImageJ und Scoring-Verfahren: Bedeckung: 1 = einzelne Bakterien, 2 = bakterielle Aggregation, 3 = Kolonien, 4 = Bedeckung < 50%, 5 = Bedeckung > 50%; Vitalität: fünfstufige Skala je nach Anteil grüner Fluoreszenz) angewandt wurden. Die Analyse der Biofilmmorphologie fand durch Rasterelektronenmikroskopie statt, ergänzend wurde eine Elementanalyse mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) durchgeführt.

Die Ergebnisse demonstrieren, dass sowohl die experimentelle Fluoridpaste (F-P) als auch die Zink-Kurkuma-Paste (ZK-P) die Neubildung und Vitalität von Biofilmen im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant reduzieren. Dabei konnten leichte Unterschiede in der

Wirksamkeit beobachtet werden. Nach dem Kontrolldurchgang mit Wasser wurde nach 47,5 h eine Biofilmbedeckung von durchschnittlich 89% (Score 4,9) auf den Prüfkörpern festgestellt. Nach dem Umspülen mit der Basispaste wiesen die Prüfkörper eine durchschnittliche Bedeckung von 80% (Score 4,3) auf. Das Umspülen mit Fluoridpaste und Zink-Kurkuma-Paste resultierte in einer statistisch signifikanten Reduktion der Biofilmneubildung bei viermalig umspülten Prüfkörpern (F-P: 37% (Score 3,71), ZK-P: 31% (Score 3,75)). Die mechanische Reinigung der Schmelzprüfkörper mit einer Zahnbürste und Paste zeigte eine durchschnittliche Reduktion der Biofilmbedeckung auf 0,2% (Score 1). Dieser Effekt wies einen statistisch signifikanten Charakter auf.

Die Vitalität lag bei mit Wasser umspülten Prüfkörpern nach 47,5 h im Mittel bei 77% (Score 4,4), bei der Basispaste war sie mit 55% (Score 3,5) statistisch signifikant niedriger. Bei den mit Fluoridpaste und Zink-Kurkuma-Paste gespülten Prüfkörpern zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion der Vitalität im Vergleich zu Wasser und Basispaste (F-P: 42%, (Score 3), ZK-P: 34%, (Score 2,7)). Darüber hinaus zeigten die Fluoridpaste und die Zink-Kurkuma-Paste eine sofortige Wirkung. Zwischen den Entnahmezeitpunkten 47,5 h und 48 h reduzierte sich die Vitalität statistisch signifikant auf F-P 35% (Score 2,4) und ZK-P 26% (Score 2,2)).

Somit wies die mechanische Reinigung eine stärkere Reduktion der Biofilmbedeckung im Vergleich zur chemischen Spülung auf. Die Langzeitwirkung der Zahnpasten zeigte statistisch signifikante Effekte in Form von Reduktion der Biofilmvitalität und Biofilmbedeckung. Zudem konnte ein Kurzzeiteffekt auf die Vitalität nachgewiesen werden. Die Resultate legen nahe, dass eine chemische Biofilmkontrolle durch die mit Fluoriden und Zink-Kurkuma angereicherte Pasten möglich ist, zudem ist die Substantivität der experimentellen Zahnpasten vielversprechend.

1.2 Abstract

The present *in situ* study investigates the effects of experimental toothpastes, a fluoride paste and a zinc-turmeric paste, on bacterial biofilm formation.

The experiments were designed to test three main hypotheses. The following questions were addressed:

Firstly, whether the toothpastes had antibacterial and anti-adhesive effects compared to controls (water and base paste); secondly, the difference between mechanical and chemical biofilm control; and thirdly, the differentiation between the long-term and short-term effects of these toothpastes on biofilm vitality and new biofilm formation.

In the study, bovine enamel samples were exposed to biofilm formation in the oral cavity and treated with fluoride paste, zinc-turmeric paste or controls (water and base paste). At fixed intervals (after 30 min, 12 h, 24 h, 36 h, 47.5 h), the samples were mechanically cleaned with a toothbrush and the corresponding toothpaste in the first quadrant and rinsed with the toothpaste-saliva solution in the second quadrant. The specimens were removed at two times. Some of the test specimens were removed after 47.5 hours, at which time the last rinse had taken place 11.5 hours earlier. The remaining specimens were removed after a further application of the test substances and a 30-minute exposure period at 48 h after insertion. The rinsing protocol allowed differentiation between different removal times. Biofilm coverage and biofilm vitality were analysed by fluorescence microscopy using two different scoring methods each (Image J and scoring method, coverage: 1 = individual bacteria, 2 = bacterial aggregation, 3 = colonies, 4 = coverage < 50%, 5 = coverage > 50%, biofilm vitality was scored on a five point ascending scale according to the proportion of green fluorescence). Biofilm morphology was analysed by scanning electron microscopy, supplemented by elemental analysis using energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX).

The results show that both the experimental fluoride paste (F-P) and the zinc-turmeric paste (ZK-P) significantly reduced the formation and vitality of biofilms compared to the control. Slight differences in efficacy were observed. After the control cycle with water, an average biofilm coverage of 89% (score 4.9) was observed in the test samples after 47.5 hours.

After rinsing with the base paste, the majority of test samples showed an average coverage of 80% (score 4.3). Rinsing with fluoride paste and zinc-turmeric paste resulted in a significant reduction in the formation of new biofilm in samples rinsed four times (F-P: 37% (score 3.71), ZK-P: 31% (Score 3.75)). Mechanical cleaning of the enamel test specimens with a toothbrush showed an average reduction in biofilm coverage to 0.2% (score 1). This effect was significant. The vitality of the water rinsed test specimens was 77% on average after 47.5 hours (score 4.4), whereas it was significantly lower with the base paste at 55% (score 3.5). Specimens rinsed with fluoride paste and zinc-turmeric paste showed a significant reduction in vitality compared with water and base paste (F-P: 42%, score 3, ZK-P: 34%, score 2.7). In addition, the fluoride paste and the zinc-turmeric paste showed an immediate effect. Between the sampling times of 47.5 h and 48 h, vitality was statistically significantly reduced to F-P 35% (score 2.4) and ZK-P 26% (score 2.2).

Thus, mechanical cleaning showed a greater reduction in biofilm coverage than chemical rinsing. The long-term effect of the toothpastes showed significant effects in terms of reduction in

biofilm vitality and biofilm coverage. A short-term effect on vitality was also demonstrated. The results suggest that chemical biofilm control is possible with fluoride and zinc-turmeric enriched pastes, and that the substantivity of the experimental toothpastes is also promising.

2 Einleitung

Karies und Parodontalerkrankungen sind weltweit bedeutende Ursachen für Zahnverlust und haben erhebliche gesundheitliche sowie sozioökonomische Auswirkungen. Sie beeinträchtigen die Lebensqualität durch Schmerzen und erschwerte Nahrungsaufnahme und führen zu verlorenen Schultagen, familiären Belastungen und reduzierter Arbeitsproduktivität (Peres *et al.*, 2019; Listl *et al.*, 2015). Die Erkrankungen verursachen sowohl direkte zahnmedizinische Kosten als auch indirekte Kosten durch Produktivitätsverluste. Eine Analyse von Righolt *et al.* (2018), basierend auf der Global Burden of Disease-Studie 2015, schätzte die weltweiten Kosten durch Zahnerkrankungen im Jahr 2015 auf 544,41 Mrd. USD, wobei 356,80 Mrd. USD direkte Kosten und 187,61 Mrd. USD indirekte Kosten ausmachten. In Mitteleuropa wurden allein die direkten Kosten auf 2,7 Mrd. USD beziffert.

Das Mundmikrobiom ist eine komplexe und vielfältige mikrobielle Gemeinschaft und spielt eine zentrale Rolle für die Mundgesundheit. Ein stabiles Gleichgewicht zwischen Mikroorganismen und dem Wirt ist hierbei essenziell. Wird dieses Gleichgewicht gestört, spricht man von einer Dysbiose, die mit der Entwicklung oraler Erkrankungen wie Karies und Parodontitis, aber auch mit systemischen Erkrankungen wie Diabetes und Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Verbindung gebracht wird (Cho & Blaser, 2012; Wu *et al.*, 2016; Kilian *et al.*, 2016). Es gibt Hinweise darauf, dass Dysbiosen des oralen Mikrobioms auf die Stickoxidproduktion über den Nitrat-Nitrit-Stickoxid-Stoffwechsel wirken und den Blutdruck negativ beeinflussen können. Umgekehrt deuten Studien darauf hin, dass die Förderung eubiotischer Bakterienarten durch gezielte Ernährung oder Probiotika positive Effekte auf die Mundgesundheit haben kann (Kilian *et al.*, 2016; Bryan *et al.*, 2022; Inchingolo *et al.*, 2022). Aktuelle Forschung untersucht, ob die Zusammensetzung und metagenomische Funktionalität der mikrobiellen Gemeinschaft relevanter für mikrobe-assoziierte Erkrankungen sein könnten als die bloße Präsenz einzelner Mikroorganismen (Cho & Blaser, 2012).

Eine wichtige Rolle spielt dabei der orale Biofilm, der sich als Mikrobiom auf Zahnoberflächen entwickelt und in eine Matrix aus speichelartigen und bakteriellen Polymeren eingebettet ist. Die Biofilmbildung verläuft in mehreren Phasen und führt zu einer strukturierten, funktionell organisierten Gemeinschaft mit einem veränderten Phänotyp hinsichtlich Wachstumsrate und Genexpression (Donlan & Costerton, 2002; Marsh *et al.*, 2010; zitiert nach Jakubovics *et al.*, 2021). Seit den Arbeiten von Loe *et al.* (2000) und Lang (2014) ist bekannt, dass Kontrolle und

Entfernung von Biofilm entscheidend für die Prävention von Gingivitis und Parodontitis sind, da ein Ursache-Wirkungs-Prinzip zwischen der Biofilmmenge und dem Krankheitsbild von Zahnfleischerkrankungen besteht.

Effektives Biofilmmanagement ist daher zentral, um oralen Parodontopathien vorzubeugen (C. Hannig & Hannig, 2009; Marsh & Bradshaw, 1995; Marsh *et al.*, 2015). Obwohl mechanische Maßnahmen wie das Zähneputzen und die Verwendung von Zahnseide als Standards der Biofilmkontrolle gelten, werden diese Maßnahmen von vielen Patienten nicht korrekt oder konsequent durchgeführt. Als ergänzende Strategie wurde daher die chemische Biofilmkontrolle eingeführt, bei der antimikrobielle Wirkstoffe in Zahnpasten und Mundspülungen eingesetzt werden, um das Wachstum von Biofilm besonders in schwer zugänglichen Mundbereichen zu hemmen (Sugano, 2012; Marsh *et al.*, 2015; Allmyr *et al.*, 2009). Dabei sollte angestrebt werden, das mikrobiologische Gleichgewicht zu erhalten oder bei Dysbiose wiederherzustellen (Kilian *et al.*, 2016). In diesem Zusammenhang wurde das Prinzip der ‚Kontrolle ohne Abtötung‘ eingeführt, um die Störung des oralen Mikrobioms möglichst gering zu halten (Marsh *et al.*, 2015).

Chlorhexidin und Flouride sind die am besten untersuchten chemischen Wirkstoffe zur Biofilmkontrolle (Rajendiran *et al.*, 2021). Inzwischen wird der Einsatz von Chlorhexidin kontrovers diskutiert, da es das orale Mikrobiom beeinträchtigen und über den Nitratstoffwechsel Einfluss auf den Blutdruck nehmen kann (Joshi *et al.*, 2019). Die Anwendung von Fluoriden birgt bei Kleinkindern das Risiko von Fluorosen bei Überdosierung (Walsh *et al.*, 2019). Angesichts dieser potenziellen Nachteile wird verstärkt nach alternativen Wirkstoffen gesucht, darunter pflanzliche Substanzen und Elemente, die natürlich im Körper vorkommen (Nagpal & Sood, 2013; Lynch, 2011).

Wirksame Strategien zur Plaquekontrolle sind notwendig, um den dentalen Biofilm auf einem für die Mundgesundheit akzeptablen Niveau zu halten. Dabei ist es von Bedeutung, die positiven Eigenschaften der lokalen Mikrobiota zu bewahren und gleichzeitig das Risiko von Zahnerkrankungen durch übermäßige Biofilmbildung zu reduzieren (Kilian *et al.*, 2016).

2.1 Literaturübersicht

2.1.1 Biofilm

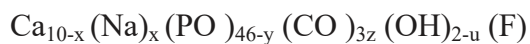
Biofilme werden als eine Gemeinschaft von Bakterien definiert, die sich zu einer interagierenden polymikrobiellen Gemeinschaft organisieren und gemeinsam als Mikrobiotika an einer Oberfläche haften (Hojo *et al.*, 2009; Marsh *et al.*, 2004; Zijnga *et al.*, 2010). In diesem

Zusammenhang stellt die Mundhöhle ein gut zugängliches *In-vivo*-Modell dar (Krishnan *et al.*, 2016; C. Hannig & Hannig, 2009). Die Mundhöhle besitzt ein nährstoffreiches, feuchtes Milieu mit einer Temperatur von ca. 35 bis 36 °C und einem Ruhe-pH-Wert zwischen 6,75 und 7,25 (Marsh, 2003; Azevedo *et al.*, 2008). Die initiale Besiedlung der Zahnhartsubstanz erfolgt durch eine proteinreiche Schicht, die sogenannte erworbene Pellikel (C. Hannig & Hannig, 2009; Siqueira *et al.*, 2012). Die Pellikel spielt eine wesentliche Rolle bei der Interaktion zwischen Zähnen, oralen Flüssigkeiten und Bakterien in der Mundhöhle. Sie dient einerseits als Schmiermittel zur Reibungsminderung, als Erosionsschutz, enthält Ionen zur Remineralisation sowie protektive Komponenten wie Lysozym und sIgA. Sie ist daher von großer Bedeutung für den Schutz der Schmelzoberfläche. Auf der anderen Seite enthält die Pellikelschicht Proteine, die als Rezeptoren die bakterielle Adhäsion sowie die Bildung eines geordneten, dreidimensionalen Biofilms fördern und so die Entstehung von Mundkrankheiten ermöglichen (Hannig, 2007; Kilian *et al.*, 2016; Rosier *et al.*, 2014; Flemming & Wingender, 2010). Die mikrobielle Erstbesiedlung erfolgt innerhalb weniger Minuten. Zunächst finden sich überwiegend kokkoide grampositive Bakterien. Der Metabolismus dieser Erstbesiedler verändert das lokale Milieu, so dass sich durch Koaggregation eine anaerobe, gramnegative Mikrobiota etabliert (Marsh, 2010). Die bakterielle Zusammensetzung und die Stoffwechsellage werden dabei durch die metabolische Kommunikation, den genetischen Austausch und die Produktion von inhibitorischen Faktoren reguliert (Hojo *et al.*, 2009).

Die Beziehung zwischen Wirt und Mikrobiom ist dynamisch. Die Zusammensetzung des Mikrobioms etabliert sich in der Kindheit und variiert je nach Lokalisation am Zahn. Im gesunden Mund bleibt sie stabil. Dieser stabile Zustand wird als mikrobielle Homöostase oder Eubiose bezeichnet und beschreibt das dynamische Gleichgewicht zahlreicher synergistischer und antagonistischer Interaktionen (Marsh, 2010; Marsh *et al.*, 2015). Physiologische Veränderungen, wie zum Beispiel das Alter oder hormonelle Schwankungen während Pubertät und Schwangerschaft, können oft ohne Auswirkungen auf die Mundgesundheit kompensiert werden. Jedoch kann das Gleichgewicht auch verloren gehen und eine Dysbiose entstehen (Gross *et al.*, 2010). Zu den beeinflussbaren Determinanten der oralen Dysbiose gehören Veränderungen des Speichelflusses und/oder der Speichelzusammensetzung, schlechte Mundhygiene und Lebensstilentscheidungen wie Ernährungsgewohnheiten und das Rauchen (Wu *et al.*, 2016; Marsh *et al.*, 2015).

2.1.2 Zahnschmelz

Die härteste Substanz im menschlichen Körper ist der Zahnschmelz. Die Hauptbestandteile des Zahnschmelzes sind anorganischer Natur. Der Anteil der anorganischen Verbindungen schwankt je nach Analyse zwischen 93 und 98 Gew.%. Den Rest machen organische Verbindungen wie Proteine und Lipide aus. Darüber hinaus wurden bisher über 40 Elemente im Zahnschmelz nachgewiesen, wobei Calcium, Phosphor, Carbonat, Magnesium und Natrium die Hauptbestandteile darstellen. Calcium und Phosphor liegen im Verhältnis 1:1,2 als Apatitverbindung in Form kleiner Kristalle vor. Die Abwesenheit von Calcium-, Phosphat- und Hydroxylionen sowie die Präsenz von Carbonat und Hydrogenphosphat resultiert in einer nicht-stöchiometrischen Zusammensetzung der Apatitkristalle. Diese liegen als



vor. Interne Substitutionsreaktionen können zu Fluorapatit oder zu fluoridiertem Hydroxylapatit führen, welche eine stabilere Kristallgitterstruktur als Hydroxylapatit aufweisen. Der Einbau von Carbonat führt zu einer geringeren Resistenz gegenüber kariogenen Angriffen. Wasser kommt ebenfalls in zwei Formen vor. Die erste ist kristallin als Hydrathülle. Die zweite ist lose an organische Stoffe gebunden. Der Zahnschmelz kann Wasser sowohl aufnehmen als auch abgeben. Er wird daher als Molekularsieb oder Ionenaustauscher betrachtet, bei dem mit dem Flüssigkeitsstrom auch Ionen in den Zahnschmelz hinein und aus dem Zahnschmelz heraus gelangen. Der Raum zwischen den Apatitkristallen ist somit der Ort, an dem Demineralisierung und Remineralisierung stattfinden. Bei der Demineralisierung wird das Mineral entfernt, dabei geht bevorzugt Carbonat verloren. Nach Remineralisierung ist das Schmelzmineral eine Mischung aus Fluorapatit und Hydroxylapatit (Featherstone, 1999; Hellwig *et al.*, 2013).

2.1.3 Epidemiologie oraler Erkrankungen

Biofilme können orale Erkrankungen auslösen, falls die mikrobielle Homoöstate zusammenbricht (Rosier *et al.*, 2014; Marsh *et al.*, 2015). Die Annahmen über die Entstehung oraler Erkrankungen haben sich im Laufe der Zeit geändert. Im 19. und 20. Jahrhundert sprach Miller von der "unspezifischen Plaque-Hypothese" (Miller, 1890). Damit war die Vorstellung gemeint, dass die Ansammlung von Zahnbelag für die Entstehung oraler Erkrankungen verantwortlich sei, ohne zwischen den Virulenzstufen der Bakterien zu unterscheiden. Diese Sichtweise entwickelte sich mit den Techniken, die im 20. Jahrhundert zur Analyse der Veränderungen zwischen Gesundheit und Krankheit eingesetzt wurden, unter der Führung von Loesche *et al.* weiter. Die erste gängige Hypothese war die "spezifische Plaquehypothese" (Loesche *et al.*,

1979), nach der nur wenige Arten der gesamten Mikroflora aktiv krankheitsverursachend wirken sollten. Später wurde die "unspezifische Plaquehypothese" von Else Theilade aktualisiert (Theilade, 1986). Die Vorstellung, dass die Gesamtaktivität der Mikroflora krankheitsauslösend sein kann, wurde durch die Einbeziehung der unterschiedlichen Virulenz der Bakterien erweitert. 1994 stellte P. D. Marsh eine Hypothese auf, welche die Schlüsselkonzepte der beiden vorhergehenden Hypothesen in sich vereint: die "ökologische Plaquehypothese" (Marsh, 1994). Diese Hypothese besagt, dass Krankheit das Ergebnis eines Ungleichgewichts in der Mikroflora aufgrund von Umweltstress ist. Dies führt zu einer Vermehrung bestimmter pathogener Mikroorganismen. Die neuere "Keystone Pathogen Hypothesis" von Hajishengallis *et al.* (2012) geht davon aus, dass bestimmte mikrobielle Erreger in geringen Mengen entzündliche Erkrankungen verursachen können, indem sie das Immunsystem des Wirts beeinflussen und die Mikrobiota verändern (zitiert nach Rosier *et al.*, 2014; Schlüter *et al.*, 2015).

Verschiedene Faktoren können diese Dysbiose verursachen. Daten zeigen, dass systemische Erkrankungen, die durch eine erhöhte Entzündung gekennzeichnet sind, die orale Mikrobiota stören (Graves *et al.*, 2018). Ein weiterer bekannter biologischer Stressfaktor mit hohem Selektionsdruck ist die Säurebelastung. Daher sind fermentierbare Kohlenhydrate, bei deren Metabolisierung Säuren entstehen, die Art von Lebensmittel mit dem größten Einfluss auf die Ökologie der Mundhöhle (Touger-Decker & Van Loveren, 2003). Im gesunden Zustand ist das metabolische Profil komplex und ausgeglichen. Es umfasst den Abbau von Speichelproteinen und Glykoproteinen und die Bildung von Alkalien zur Neutralisierung der entstehenden Säure, wobei der Biofilm im Laufe des Tages mehrere pH-Zyklen durchläuft, die zur De- und Remineralisation des Zahnschmelzes führen (Kilian *et al.*, 2016). Sind zu viele Risikofaktoren vorhanden, wie z.B. zu wenig Zeit für die pH-Neutralisation durch zu häufige Zufuhr niedermolekularer Kohlenhydrate, Untersättigung der Plaque mit Fluorid, Calcium und Phosphat und zu geringe Speichelclearance, überwiegt die Demineralisation gegenüber der Remineralisation und es kommt zu einem Netto-Mineralverlust, der mit der Zeit zu Schmelzschäden führt (Marsh, 2010; Selwitz *et al.*, 2007; Featherstone, 1999; Kilian *et al.*, 2016). Die vorhandenen Streptokokken passen sich an den niedrigen pH-Wert an und entwickeln vermehrt acidogene und acidurische Phänotypen. Die mit kariogenen Bakterien assoziierten Eigenschaften Säureproduktion, Säuretoleranz sowie extra- und intrazelluläre Polysaccharidproduktion sind jedoch nicht spezifisch für ein bestimmtes Bakterium. Sie dominieren je nach Stoffwechselsituation und es kann eine ökologische Nische entstehen, in der sich Organismen an einen niedrigen pH-Wert

anpassen und Demineralisation vorherrscht. Dies verdeutlicht den Einfluss des Milieus auf die mikrobielle Gemeinschaft (Marsh, 2010, Selwitz *et al.*, 2007).

Ökologische Veränderungen, wie in den Plaquehypothesen beschrieben, sind auch für die Entstehung von Gingivitis verantwortlich (Rosier *et al.*, 2014). Bei der Gingivitis bleibt die Wirtsreaktion adäquat, aber durch die Entwicklung des Biofilms klingt die begleitende Entzündung nicht ab und kann chronisch werden, was eine Dysbiose begünstigt (Kilian *et al.*, 2016). Der Übergang zur Parodontitis erfordert ein dysbiotisches Mikrobiom und einen anfälligen Wirt (Hajishengallis, 2014). Parodontitis ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates, von der weltweit in den unterschiedlichen Altersgruppen etwa 20-50% der erwachsenen Bevölkerung betroffen sind. Auch hier sind Bakterien im Biofilm verantwortlich, in diesem Fall parodontopathogene gramnegative anaerobe Bakterien. Diese breiten sich von der Grenzfläche zwischen Zahnfleisch und Zahn in die subgingivale Nische aus und verursachen zunächst eine Entzündungsreaktion. Werden die Reizfaktoren nicht beseitigt, entsteht eine chronische Entzündung, die mit der Zerstörung des parodontalen Ligaments und des stützenden Alveolarknochens einhergeht. Dieser Zustand ist ein Teufelskreis, der das Ungleichgewicht aufrechterhält (Jin *et al.*, 2016; Kilian *et al.*, 2016).

An den Zähnen können auch nichtkariöse Veränderungen wie Erosion, Abrasion und Attrition auftreten. Abrasion beschreibt den Verschleiß durch Wechselwirkung zwischen Zähnen und anderen Werkstoffen. Attrition wird als Verschleiß durch Zahn-Zahn-Kontakt definiert und Erosion entsteht durch Auflösung von Hartgewebe durch saure Substanzen. Klinische und experimentelle Beobachtungen zeigen, dass die einzelnen Verschleißmechanismen selten allein wirken, sondern in Wechselwirkung zueinanderstehen. Die bedeutsamste Wechselwirkung besteht in einer Verstärkung der Abrasion durch erosive Schädigung der Zahnhartsubstanz (Addy & Shellis, 2006; Eccles, 1979). Zahnerosion entsteht, wenn die Zahnoberfläche extrinsischen oder intrinsischen Säuren ausgesetzt ist, die nicht aus dem bakteriellen Stoffwechsel stammen und direkt auf die saubere Zahnoberfläche einwirken. Wenn die saure Flüssigkeit, die die Zahnoberfläche umgibt, im Vergleich zu den Zahnmineralien untersättigt ist, kann es zu einer erosiven Demineralisation kommen (Jaeggi & Lussi, 2006; Eccles, 1979). Zur Ätiologie der Erosionen gehören patientenbezogene Faktoren wie Erosionsanfälligkeit, Reflux, Erbrechen, Trink- und Essgewohnheiten sowie Medikamente und Nahrungsergänzungsmittel. Ernährungsbedingte Faktoren beziehen sich auf die Zusammensetzung von Nahrungsmitteln und Getränken, wobei Hauptrisikofaktoren Lebensmittel mit niedrigem pH-Wert und hoher Pufferkapazität sind (Carvalho *et al.*, 2015). Der Angriff auf die Zahnhartsubstanz erfolgt durch

Wasserstoffionen oder Chelatbildner. Die Verbindung des Wasserstoffions mit dem Carbonat und/oder Phosphat der Zahnmineralkristalle führt zur Freisetzung aller Ionen aus dem Bereich. In der Folge kommt es zu einer direkten Oberflächenätzung. Bei Säureerosionen wirken die Pellikel und die Pufferkapazität des Speichels als Schutz und reduzieren den Substanzverlust (Featherstone & Lussi, 2006).

2.1.4 Biofilmkontrolle – die Rolle von Zahnpasten

Gut untersucht ist, dass bei der multifaktoriellen Erkrankung Zahnkaries eine mikrobiologische Verschiebung innerhalb des Biofilms stattfindet und dies eine Bekämpfung an den verursachenden Faktoren erfordert (Selwitz *et al.*, 2007; Buzalaf *et al.*, 2011). Auch im Rahmen einer Parodontitistherapie kann die Symbiose wiederhergestellt werden, indem der Biofilm regelmäßig und gründlich entfernt wird, um die Entzündung zu beseitigen (Jin *et al.*, 2016; Kilian *et al.*, 2016). Zur Biofilmentfernung ist die mechanische Kontrolle mit Zahnbürste und Zahnseide die anerkannte Methode (Sugano, 2012). Es konnte gezeigt werden, dass einmaliges Zähneputzen zu einer Reduktion des Zahnbelags um 42% führt (Van der Weijden & Slot, 2015). Die Wirksamkeit der Plaque-Entfernung nach dem Zähneputzen mit einer elektrischen Zahnbürste führt zu einer durchschnittlichen Reduktion des Plaque-Scores um 46%, wobei die Spanne je nach Plaque-Score-Skala zwischen 36% und 65% liegt (Rosema *et al.*, 2014). Somit wird davon ausgegangen, dass die elektrische Zahnbürste wirksamer als die Handzahnbürste ist (Elkerbout *et al.*, 2019). Jedoch liegen zu dieser geringen klinischen Evidenz keine Langzeitstudien vor (Thomassen *et al.*, 2021). Dabei sind die Zahnputztechnik, die Zahnputzsystematik und die Zahnputzdauer von Bedeutung (Schlüter *et al.*, 2015). In Studien wurde ebenfalls ermittelt, dass Personen, die seltener putzten, ein höheres Risiko für das Auftreten und die Zunahme kariöser Läsionen hatten als Personen, die häufig putzten. Das Risiko einer Zunahme kariöser Läsionen unterschied sich jedoch nicht signifikant zwischen Personen, die mehr als zweimal täglich putzten und Personen, die zweimal täglich putzten. Es war zwar die Häufigkeit des Zähneputzens mit dem Auftreten kariöser Läsionen assoziiert, ein Effekt der Zahnpasta über die Fluoridwirkung hinaus konnte nicht nachgewiesen werden (Kumar *et al.*, 2016). Zahnpasta ist eine zumeist pasten- oder gelartige Substanz, die in Kombination mit einer Zahnbürste angewendet wird. Der Zweck besteht in der Erhaltung und Verbesserung der Mundgesundheit und -ästhetik. Seit ihrer Einführung vor mehreren tausend Jahren haben sich die Zahnpastarezepturen stark verändert, von einfachen Pasten bis hin zu komplexen Rezepturen mit oft mehr als zwanzig Inhaltsstoffen. Dabei werden Zahnpasten und Mundspüllösungen als Träger von Wirkstoffen genutzt, um das orale Milieu zu regulieren und nachhaltig zu beeinflussen. Biofilminduzierte

orale Erkrankungen sollen so verhindert oder behandelt werden. Die Wirkstoffe sollen möglichst antimikrobielle Eigenschaften besitzen. Darüber hinaus ist eine Substantivität erwünscht (Elworthy *et al.*, 1996).

Es gibt Präparate, die Wirksamkeit gegen Karies, Zahnfleischerkrankungen, Mundgeruch, Zahnstein, Erosion und Dentinhypersensibilität reklamieren. Darüber hinaus enthalten Zahnpasten Putzkörper zur Reinigung und Aufhellung der Zähne, Aromastoffe zur Erfrischung des Atems sowie Farbstoffe zur optischen Aufwertung. Wirksame Zahnpasten sind so formuliert, dass die Bioverfügbarkeit ihrer Wirkstoffe maximiert wird. Dies kann jedoch eine Herausforderung darstellen, da Kompromisse eingegangen werden, wenn mehrere verschiedene Wirkstoffe in einer Phase formuliert werden. Außerdem muss sie sicher sein in Bezug auf Abrieb und andere Nebenwirkungen wie Verfärbung oder Reizung der Schleimhäute (Lippert, 2013; Ganß *et al.*, 2013). Da die Pufferkapazität des Speichels und der Pellikelschicht eine schützende Eigenschaft aufweist, werden eubiotische Zustände angestrebt (Featherstone & Lussi, 2006). Bei Personengruppen mit manuellen oder geistigen Einschränkungen sowie bei Personen mit Hyposalivation, kieferorthopädischen Apparaturen, fehlender oder mangelhaft durchgeführter Mundhygiene ist die chemische Biofilmkontrolle ein probates Mittel, um die Biofilmpathogenität und Biofilmbildung zu beeinflussen (Schlüter *et al.*, 2015).

2.1.5 Fluoride

Die Einführung von Fluorid zur Bekämpfung der Karies war eine der erfolgreichsten Präventionsmaßnahmen in der Zahnmedizin (Rošin-Grget, 2013). Sie wurde vor mehr als 70 Jahren etabliert und gilt als hauptverantwortlich für den Rückgang der Kariesprävalenz (Buzalaf *et al.*, 2011). Es gibt drei grundlegende Methoden der Fluoridverabreichung zur Kariesprophylaxe. Durch die Allgemeinheit (fluoridiertes Wasser, Salz und Milch), durch Zahnärzte (fluoridhaltige Gele und Lacke) und durch den Einzelnen (Zahnpasten und Mundspülungen) (Petersen & Phantumvanit, 2012). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass durch die topische Anwendung von Fluoridpräparaten Karies kontrolliert werden kann (Hellwig & Lennon, 2004; Rošin-Grget, 2013, Buzalaf *et al.*, 2011). Hierbei ist die Anwendung von fluoridhaltigen Zahnpasten die wichtigste vom Patienten selbst durchführbare Kariespräventionsmaßnahme (Walsh *et al.*, 2019). Die WHO empfiehlt, zweimal täglich mit fluoridhaltiger Zahnpasta (1000 bis 1500 ppm) zu putzen (O'Mullane *et al.*, 2016). Eine übermäßige Zufuhr von Fluorid während der Zahnentwicklung bei Kleinkindern kann zu Fluorosen führen. Daher ist der Mechanismus, über den Fluorid die Kariesprävalenz senkt, Gegenstand vieler Studien, aber im Detail noch ungeklärt (Buzalaf *et al.*, 2011). Die Studien stimmen darin überein, dass Fluorid die Demineralisation

während eines Säureangriffs hemmt, indem es absorbiert wird und die Remineralisation beschleunigt, wenn eine Übersättigung mit Fluorhydroxylapatit vorliegt. Diese Prozesse hängen stark vom pH-Wert ab, da entweder Mineralausfällung (Remineralisierung) oder Mineralauflösung (Demineralisierung) stattfindet. Der kritische pH-Wert wird als Sättigungsgleichgewicht beschrieben. Hier findet weder Mineralausfällung noch Mineralauflösung statt. Für fluoridiertes Hydroxylapatit liegt er bei 4,5, für reines Hydroxylapatit bei 5,5 (Buzalaf *et al.*, 2011).

Bei der Verstoffwechselung von Zucker sinkt der pH-Wert im Speichel und im Biofilm. Die entstandenen Säuren diffundieren in den Schmelz und dissoziieren unter Bildung von Wasserstoffionen. Durch die Auflösung des Minerals werden Calcium und Phosphat freigesetzt und gehen in Lösung. Das freigesetzte Hydroxylapatit gleicht das Mineraldefizit im Speichel aus. In den Oberflächenschichten bildet sich fluoridhaltiges Hydroxylapatit. Auf diese Weise erhöht sich der Anteil an Fluorhydroxylapatit auf Kosten des Hydroxylapatits, was eine schützende Wirkung hat, aber die Remineralisation erschwert. Steigt der pH-Wert wieder an, werden die teilweise demineralisierten Kristalle remineralisiert, da der Speichel dann im Vergleich zum Zahnmineral übersättigt ist. Diese remineralisierten Bereiche sind gegenüber einem erneuten Säureangriff widerstandsfähiger und weisen somit eine erworbene Resistenz auf (Buzalaf *et al.*, 2011; Featherstone, 1999).

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass strukturell gebundenes Fluorid, wie es zum Beispiel in Haifischzähnen vorkommt, keinen besseren Schutz bietet als topisch appliziertes Fluorid. Daher wurde eine konstant niedrige Fluoridkonzentration empfohlen. Wichtige Fluoridreservoirs befinden sich dann im Biofilm, im Speichel, auf den Mundschleimhautoberflächen und in locker gebundener Form auf den Schmelzoberflächen (Buzalaf *et al.*, 2011; Rošingrget, 2013; O'Mullane *et al.*, 2016). Fluorid, das während eines bakteriellen Angriffs in der Plaqueflüssigkeit vorhanden ist, adsorbiert an der Kristalloberfläche und verhindert so deren Auflösung (Featherstone, 1999). Fluorid in Lösung erhöht ebenfalls die Adsorptionswahrscheinlichkeit und schützt so die Kristalle, und zwar bereits in sehr niedrigen ppm-Bereichen. Eine Quelle für Fluorid im Mund ist Calciumfluorid, das in einer pH-regulierten Form vorliegt (Buzalaf *et al.*, 2011). Eine weitere Wirkung hat Fluorid auf den bakteriellen Stoffwechsel durch direkte Hemmung zellulärer Enzyme oder durch Erhöhung der Protonendurchlässigkeit der Zellmembran in Form von Fluorwasserstoff (Koo, 2008).

Aufgrund dieser positiven Wirkungen werden den meisten Zahnpasten Fluoride zugesetzt. Der Fluoridgehalt in Zahnpasten beträgt mindestens 1000 ppm. Für Kinder wird eine kleinere Menge empfohlen, die unter Aufsicht angewendet werden sollte, um das Verschlucken zu

reduzieren. Die Evidenz der Wirksamkeit niedriger dosierter Zahnpasten speziell für Kinder ist gering (O'Mullane *et al.*, 2016). Toumba *et al.* fassten in einer Leitlinie 2019 zusammen, dass das Auftreten von Zahnfluorosen bei Kindern in den ersten sechs Lebensjahren mit der Verwendung von Fluoridpräparaten zusammenhängt. Dabei ist das Risiko für Zahnfluorosen am größten, wenn die Verabreichung in der sekretorischen oder der Reifungsphase der Schmelzbildung stattfindet (DenBesten, 1999; Wong *et al.*, 2010). Somit gelten lediglich Kinder und Säuglinge unter 4 Jahren als Risikogruppe für Zahnfluorosen (Hong *et al.*, 2006).

Im Laufe der Zeit kamen verschiedene Fluoridverbindungen wie Zinnfluorid, Natriumfluorid, Natriummonofluorophosphat, angesäuertes Phosphatfluorid und Aminfluorid zum Einsatz (Rugg-Gunn & Bánóczy, 2013). Untersuchungen zeigen, dass die Aktivität von Fluorid größer ist, wenn es mit Zinn oder einem Amin verbunden ist (Van Loveren, 2001).

In der Zahnpflege und Zahnmedizin werden Aminfluoride verwendet, diese sind kationische Tenside. Aminfluoride zeichnen sich durch eine zweigeteilte Struktur aus. Sie besitzen eine hydrophobe Alkylgruppe und ein polares hydrophiles protoniertes Amin mit einem Fluorid als Anion. Damit ist das Fluoridion an einen Träger, dem protoniertem Amin, gebunden. Dieser trägt das Fluorid mit hoher Affinität zum polaren Zahnschmelz und bindet es an die Zahnoberfläche. Dadurch kann sich das Fluorid am Zahnschmelz konzentrieren. Der schwach saure pH-Wert fördert die Bildung einer fest haftenden Fluorid-Deckschicht, die bei Säureangriffen als Fluorid-Depot wirkt. Der Hauptwirkstoff Olaflur hat neben seiner kariesprotektiven Wirkung weitere Funktionen, die auf seiner Molekülstruktur beruhen. So ist er an der Dispergierung von Aromaölen beteiligt, wirkt konservierend und dient als Schaumbildner, so dass bei ausreichender Konzentration keine weiteren Hilfsstoffe zugesetzt werden müssen (Gülzow & Sudbrake, 2003). Aufgrund des schwach sauren pH-Wertes reichen bereits geringere Konzentrationen aus, um bei niedrigen pH-Werten, wie sie bei Säureangriffen auftreten, eine spontane Ausfällung zu bewirken. Bereits bei einer Speichelkonzentration von 0,1 ppm in Hydroxylapatit-gesättigter Lösung findet Kristallwachstum statt. Dies ist von Vorteil, da die oralen Kontaktzeiten von Fluoridpräparaten während der Mundhygiene kürzer sein können als empfohlen (Klimek, 2012).

In vielen Zahnpasten ist Natriumfluorid (NaF) als einfachste Fluoridverbindung enthalten. Freie Fluorid-Ionen aus dissoziiertem NaF durchdringen die Zellmembranen von Bakterien und greifen in den bakteriellen Stoffwechsel ein (Kaufmann & Bartholmes, 1992). Somit ist Natriumfluorid ein weithin anerkanntes funktionelles Mittel gegen Karies (Hardwick *et al.*, 2000; Featherstone *et al.*, 2009; Koo *et al.*, 2008; Van Loveren *et al.*, 2001). Herkömmliche

Mundhygieneprodukte, die NaF enthalten, reduzieren das Auftreten von Zahnkaries signifikant (Xing *et al.*, 2015). Der Einsatz von NaF zur Kariesprävention ist gut dokumentiert. Es wurden jedoch sowohl positive als auch negative Wirkungen berichtet. Aufgrund der dualen Natur von Fluorid ist es wichtig, die physiologischen und pathologischen Prozesse während der Fluoridbehandlung zu verstehen. Niedrige Konzentrationen von NaF fördern die Wundheilung in Epithelzellen und Mesenchymale Stromazellen aus dem Knochenmark. Die Behandlung mit NaF stellt einen wesentlichen Faktor bei der Erhaltung von Osteoblasten und Osteoklasten dar, die für die Homöostase des Knochenstoffwechsels wichtig sind. Ein optimaler NaF-Spiegel könnte ein wirksamer Schutz gegen Knochenabbau sein. Die Aufnahme von Fluorid beeinflusst verschiedene Zelltypen im Körper und greift in verschiedene Signalwege wie Entzündung, Autophagie und Apoptose ein. Diese Vorteile von NaF könnten für klinische Behandlungen wie Parodontitis genutzt werden. Andererseits führen hohe NaF-Konzentrationen zu Fluorose bei Kleinkindern, oxidativem Stress, DNA-Schäden und sogar toxischen Reaktionen. Daher ist es wichtig, eine geeignete Konzentration für die Anwendung von NaF zu finden (Wang *et al.*, 2022).

2.1.6 Zinkverbindungen

Zink gehört zu den essenziellen Spurenelementen (Christianson, 1991). Es kommt im Speichel, im Zahnschmelz und im Biofilm vor (Lynch, 2011). Die Mundschleimhaut gilt als wichtigstes orales Zinkreservoir (Rajendiran *et al.*, 2021).

Zink wird Zahnpasten und Mundspülungen als antibakterieller Wirkstoff zugesetzt. Es bekämpft Biofilm, reduziert Mundgeruch durch Hemmung flüchtiger Schwefelverbindungen und vermindert die Zahnsteinbildung durch Veränderung und Hemmung des Kristallwachstums (Lynch, 2011). Es besitzt ein breites Spektrum antibakterieller Aktivität (Finney *et al.*, 2003) und wirkt hauptsächlich auf das Zytoplasma und die glykolytischen Enzyme von Bakterienzellen. Außerdem hemmt es den Prozess der Glykolyse (Phan *et al.*, 2003). Die Hemmwirkung von Zinksalzen auf die mikrobielle Glykolyse ist Speichel-pH-abhängig und bakterienspezifisch. Es konnte festgestellt werden, dass bei einem pH-Wert von 7 die Hemmung am stärksten ausgeprägt ist (He *et al.*, 2002). Es ist oral gut verfügbar und bleibt nach der Applikation viele Stunden im Speichel und im Biofilm. *In-vitro*-Untersuchungen zeigen, dass Zink in den Speichel aufgenommen wird, indem es an die mit Biofilm überzogene Zahnoberfläche gebunden und anschließend in den Speichel resorbiert wird (Harrap *et al.*, 1984; Gilbert & Ingram, 1988). Es konnte gezeigt werden, dass die wiederholte Verabreichung von Zink zu einer Anreicherung im Biofilm führt (Hall *et al.*, 2003; Afseth *et al.*, 1983). Es wurde auch dargelegt, dass Zink die

Demineralisation des Dentins verhindert und die Remineralisation fördert (Windisch, 2003). Es reduziert die Löslichkeit von Schmelz und Hydroxylapatit durch Adsorption an Hydroxylapatitkristalloberflächen (Ingram *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 2005; Stötzel *et al.*, 2009) sowie durch Einbau in das Kristallgitter (Li *et al.*, 2007; Mayer *et al.*, 1994). Die antimikrobiellen Eigenschaften von Zink wurden dargestellt, ein Einfluss auf die Kariesbildung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Lynch, 2011). In Zahnpasten und Mundspülungen findet Zink in Form verschiedener Salze wie Zinkoxid, Zinkcitrat, Zinkchlorid, Zinklactat und Zinksulfat Verwendung (Fatima *et al.*, 2016).

2.1.7 Kurkumaextrakt

Als Kurkuma bezeichnet man ein natürliches Polyphenol, welches aus dem Rhizom der Pflanze *Curcuma longa*, auch bekannt als gelber Ingwer oder Safranwurzel gewonnen wird. Es wird als Gewürz, Lebensmittelfarbstoff und in der Kosmetik verwendet (Govindarajan & Stahl, 1980; Nagpal & Sood, 2013). In der traditionell chinesischen Medizin wird es zur Behandlung von bakteriellen Infektionen und entzündlichen Erkrankungen eingesetzt (Araújo & Leon, 2001; Tilak *et al.*, 2004; Pulido-Morán *et al.*, 2016). Durch chemische Untersuchungen wurden drei Hauptbestandteile nachgewiesen, Curcumin (Diferuloylmethan) sowie die Derivate p-Hydroxycinnamoyl(feruloyl)methan und p,p'-Dihydroxydicinnamoylmethan. Der Wirkstoff ist das Curcumin (Ammon & Wahl, 1991). Curcumin weist verschiedene therapeutische Wirkungen auf, dazu gehören entzündungshemmende (Ammon & Wahl, 1991), antimikrobielle und antioxidative Eigenschaften (Chaturvedi, 2009; Nagasri *et al.*, 2015).

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Wirksamkeit eines Kurkuma-Gels zu der eines Chlorhexidin-Gels vergleichbar ist. Andere Studien bestätigten dies nicht (Zhang *et al.*, 2021; Nagpal & Sood, 2013). Die entzündungshemmenden Eigenschaften zeigen sich in einer Erhöhung des natürlichen Kortisonspiegels der Nebenniere und einer Senkung des Histaminspiegels sowie in einer Hemmung der Prostaglandinbiosynthese und der Neutrophilenfunktion. (Nagpal & Sood, 2013; Mukhopadhyay *et al.*, 1982). Diskutiert wird, dass die antibakterielle Wirkung auf einer einzigartigen chemischen Struktur beruht, nämlich den an einen Benzolring gebundenen OH-Gruppen, die stark mit einer antibakteriellen Wirkung korrelieren (Shahzad *et al.*, 2015). Das Vorhandensein von zwei hydrophoben Phenyl-Domänen könnte eine weitere Erklärung für die antimikrobielle Wirkung von Curcumin sein. Durch diese strukturelle Geometrie wird eine robuste und gerichtete Wechselwirkung ermöglicht. Die dadurch erhöhte Bindungsenergie ermöglicht es Curcumin Formen anzunehmen, die für eine maximierte Wechselwirkung mit bakteriellen Virulenzfaktoren geeignet sind (Singh *et al.*, 2018).

2.1.8 Ziel der Arbeit / Fragestellung

Ziel dieser *In-situ*-Studie war es, die unterschiedlichen Auswirkungen der Verwendung von Zahnpasten und speziellen Additiven auf die Biofilmbildung zu untersuchen. Dazu wurden drei Teilaspekte mit entsprechenden Hypothesen bearbeitet. Als Nullhypothesen wurde erstens angenommen, dass sich die experimentellen Zahnpasten in ihrer Wirkung nicht von der Kontrollserie mit Wasser oder einer Basispaste unterscheiden. Zweitens dass das Umspülen der Prüfkörper mit antibakteriellen Wirkstoffen keinen Unterschied zur mechanischen Reinigung der Prüfkörper zeigt und als dritte Hypothese, dass die antibakterielle und antiadhäsive Wirkung unabhängig vom Applikationszeitpunkt ist.

Die erste Hypothese behandelte die Frage, ob durch die Anreicherung einer Zahnpasta mit verschiedenen Additiven eine antibakterielle und antiadhäsive Wirkung erzielt werden kann, die sich von der Wirkung von Wasser oder einer Basispaste unterscheidet. Dazu wurden Schmelzprüfkörper mit 47,5 h altem Biofilm verglichen. Die entsprechenden Prüfkörper wurden jeweils mit Wasser, Basispaste, Fluoridpaste oder Zink-Kurkuma-Paste gespült. Um die Wirkung der Additive im Detail zu untersuchen, enthielt die Basispaste die gleichen Grundstoffe wie die experimentellen Pasten und wurde mit den zu untersuchenden Additiven ergänzt.

Weiterhin sollte die mechanische Wirkung des Zähneputzens, die allein durch die Bürstenanwendung entstand, mit der chemischen Wirkung, die durch das Umspülen der übrigen Prüfkörper mit dem Speichel-Pasten-Gemisch entstand, verglichen werden. Dazu wurde der mechanisch gereinigte Prüfkörper mit dem umspülten Prüfkörper innerhalb der gleichen Paste nach 48 h verglichen.

Durch das Reinigungsprotokoll und die Differenzierung der Probenahmezeitpunkte in 47,5 h und 48 h und die zwischenzeitliche Wiederanwendung konnte untersucht werden, ob vermutete Effekte auch langfristig auftreten und die Paste eine Substantivität aufweist. Zudem wurde untersucht, ob eine Paste unmittelbare Auswirkungen auf den Biofilm hat. Dazu wird der Prüfkörper eines Durchlaufs, der 47,5 h nach der Applikation der entsprechenden Paste entnommen wurde, mit einem Prüfkörper desselben Durchlaufs nach 48 h verglichen. Dieser wurde erneut gespült und dann nach 30 min zum Zeitpunkt 48 h entnommen.

Die Analysemethoden erlaubten Rückschlüsse auf die Biofilmneubildung, die Biofilmvitalität und die Morphologie des Biofilms.

3 Material und Methode

3.1 Probanden

Die Studie wurde mit 6 Probanden ($n = 6$) durchgeführt, die zu diesem Zeitpunkt Zahnmedizin studierende waren und aus einer Arbeitsgruppe der Klinik für Zahnerhaltung an der Universität des Saarlandes stammten. Ein kariesfreies Gebiss und ein gesunder parodontaler Zustand bestand, ebenso keine Dauermedikation und normaler Speichelfluss. Das Versuchsprotokoll wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt (Votum 120/2017). Die Bezugsquellen aller Materialien sind im Anhang aufgeführt.

3.2 Prüfkörper und deren Montage

Als Prüfkörper wurden Plättchen aus Rinderzahnschmelz verwendet. Dazu wurden in einem Schlachthof in Zweibrücken gewonnene Rinderzähne in Thymol konserviert ins Labor gebracht. Durch Bearbeitung der Rohlinge mit einer Nassschleifmaschine (Modell Gripo 2V, hergestellt von Metkon Instruments Ltd, Bursa, Türkei) wurden homogene Prüfkörper der Größe $4 \times 5 \times 1$ mm angefertigt. Die Schmelzflächen wurden mit wasserfestem Siliziumkarbid-Schleifpapier (Buehler, Düsseldorf, Deutschland) bis zu einer Körnung von 2500 Grit aufsteigend poliert. Die Rückseiten wurden mit 240er Körnung leicht angeraut. Unter dem Lichtmikroskop (Zoom-Stereomikroskop SMZ 140, Motic GmbH, Wetzlar, Deutschland) erfolgte eine Qualitätskontrolle der Schmelzoberflächen. Dabei wurden Prüfkörper, die bei 10-facher Vergrößerung Demineralisationen, Oberflächeninhomogenitäten oder mikroskopisch sichtbare Verfärbungen aufwiesen, aussortiert. Im Anschluss wurden die Schmelzproben für einen Zeitraum von drei Minuten in einer 3%igen Natriumhypochloritlösung (Hedinger, Stuttgart) gelagert und nach einem sorgfältigen Spülen unter laufendem Wasser für 5 min in einem Ultraschallbad (Sonorex RK 100 H, Bandelin, Berlin) behandelt. Im Anschluss wurde eine 15-minütige Desinfektion mit 70%igem Isopropylalkohol (Hedinger, Stuttgart, Deutschland) durchgeführt, gefolgt von einer zweifachen Reinigung mit sterilem Wasser (Ecotainer, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Nach der Herstellung der Prüfkörper mussten diese im Mund der Probanden fixiert werden. Dies geschah mit Hilfe von Tiefziehschienen und Silikon. Es wurden für alle Probanden individuelle Tiefziehschienen für beide Quadranten des Oberkiefers angefertigt. Im Anschluss an die Abformung mit einem irreversiblen, elastischen Abdruckmaterial (Alginate Blueprint, Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Deutschland) erfolgte die Anfertigung

von Modellen aus Gips der Klasse IV (Die-Stone, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland). Die Schienen wurden mittels Tiefziehtechnik aus hartelastischen, transparenten Kunststofffolien (Scheu Dental GmbH, Iserlohn) mit einer Schichtdicke von 0,7-1,0 mm unter Verwendung von Erkopress ES 2004 (Erkodent GmbH, Pfalzgrafenweiler) hergestellt. Um den Tragekomfort zu optimieren und sowohl die Ästhetik als auch die Phonetik nicht zu beeinträchtigen, erfolgte eine Begrenzung der Schienen auf die Molaren- und Prämolarenregionen der ersten und zweiten Quadranten, die Frontzahnregion blieb frei. Zur sicheren Fixierung der Proben waren kleine Retentionslöcher erforderlich. Zur Befestigung der Proben auf den Tiefziehschienen wurde viskoses A-Silikon (President light body, Coltène/Whaledent GmbH und Co. KG, Langenau, Deutschland) verwendet. Die Proben wurden gleichmäßig tief in das Silikon eingebracht, um die Bildung von Retentionszonen auf den Proben zu vermeiden.

3.3 Prüfsubstanzen

Es standen drei experimentelle Zahnpasten zur Prüfung. Die Pasten wurden von der Firma Theiss Naturwaren GmbH, Homburg, Deutschland, zur Verfügung gestellt und setzten sich wie in [Tabelle 1](#) beschrieben zusammen. Als Kontrollen dienten Wasser sowie eine Basispaste ohne antimikrobielle Wirkstoffe.

Tabelle 1: Bestandteile der Zahnpasten

Paste	Abkürzung	Inhaltsstoffe
Basispaste	B-P	Aqua, SiO ₂ , hydriertes Stärkehydrolysat(C ₁₈ H ₃₅ O ₁₆), Glycerin, HEC, CAPB, Sodium Saccharin, TiO ₂ , NaCl
Fluoridpaste	F-P	B-P + Olaflur 300 ppm, Natriumfluorid 1176 ppm
Zink-Kurkuma-Paste	ZK-P	B-P + Zinkglukonat 3%, Kurkuma-Wurzelextrakt 0,04%

3.4 Versuchsablauf

Die Prüfkörper (PK) des ersten Quadranten wurden mechanisch mit einer Zahnbürste und der entsprechenden Zahnpasta behandelt. Die Prüfkörper des zweiten Quadranten wurden während des Zähneputzens des Unterkiefers und des ersten Quadranten mit dem Zahnpasta-Speichel-Gemisch umspült. Nach Beendigung des Zähneputzens verblieb das Gemisch weitere 30 sek im Mund und wurde vorsichtig bewegt.

Das Trageprotokoll sah wie folgt aus: 30 min nach dem Einsetzen der Tiefziehschienen erfolgte das erste Zähneputzen, 12 h nach dem Einsetzen das zweite Zähneputzen, 24 h nach dem Einsetzen das dritte Zähneputzen und 36 h nach dem Einsetzen das vierte Putzen. 47,5 h nach dem Einsetzen wurden zwei Prüfkörper von den Positionen 4 und 6 ([Abbildung 1](#)) entnommen, danach erfolgte das fünfte Putzen. Nach 48 h erfolgte die Entfernung der restlichen Prüfkörper.

Rechts (1. Quadrant):

geputzt

48h



1

2

Links (2. Quadrant):

ungeputzt

48h



47,5h



3

4

5

6

1: LDS-Schmelz

2: REM-Schmelz

3: LDS-Schmelz

4: LDS-Schmelz

5: REM-Schmelz

6: REM-Schmelz

Abb. 1: Versuchsaufbau. Getragen wurden zwei Tiefziehschienen im ersten und zweiten Quadranten. Im ersten Quadranten befanden sich zwei Schmelzprüfkörper (Position 1 + 2) die 48 h im Mund verblieben und mit einer Zahnbürste geputzt wurden. Im zweiten Quadranten befanden sich vier Schmelzprüfkörper (Position 3-6), die mit dem Zahnpasten-Speichel-Gemisch umspült wurden. Von den umspülten Prüfkörpern wurden zwei Prüfkörper bereits nach 47,5 h entnommen, es erfolgte eine erneute Applikation der experimentellen Pasten und nach 30 min die Entnahme aller Prüfkörper. Die Prüfkörper wurden im Wechsel im Rasterelektronenmikroskop (REM) oder mittels Fluoreszenzmikroskopie (LDS) ausgewertet.

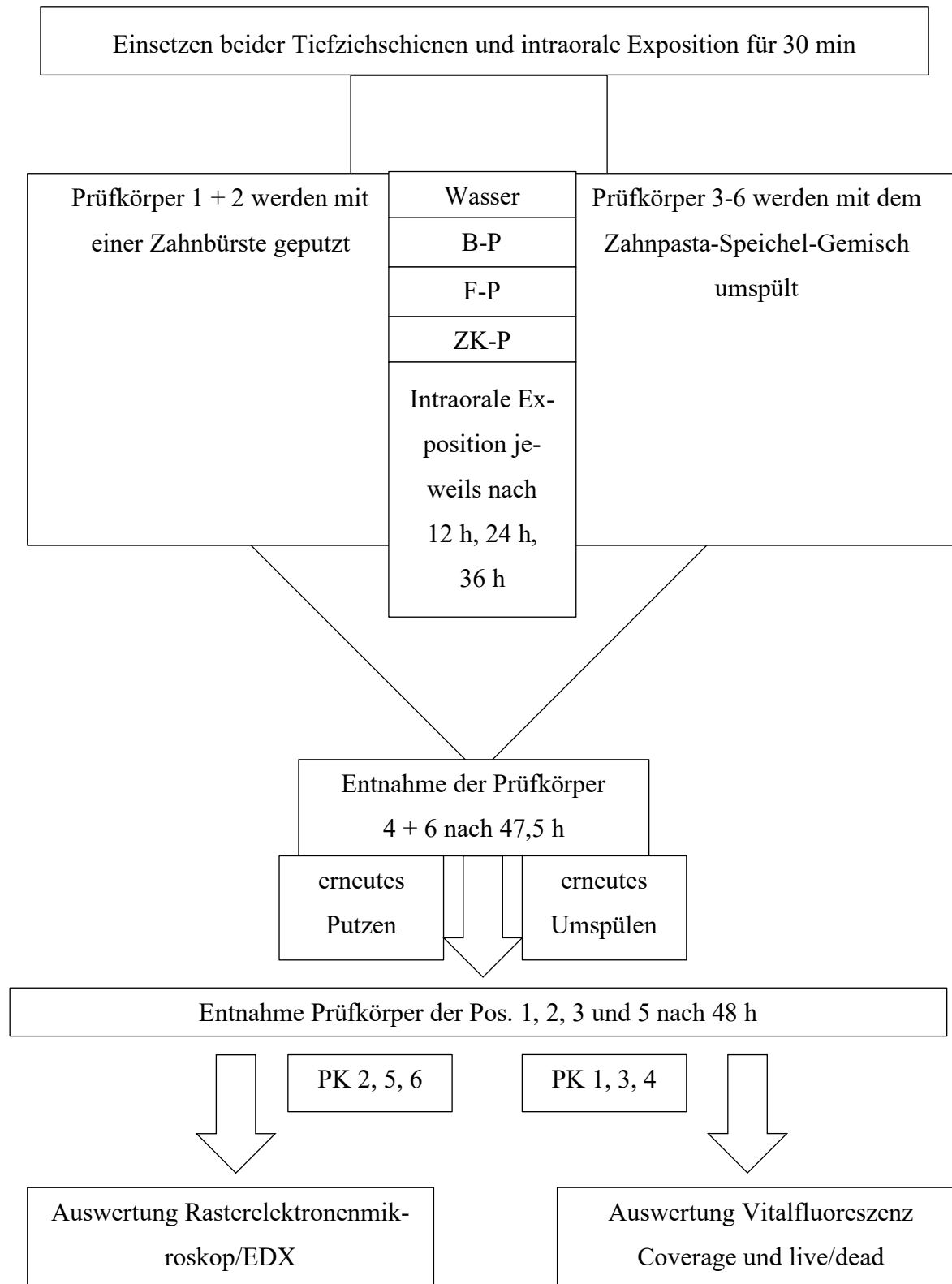


Abb. 2: Versuchsablauf. Zwei tiefgezogene Schienen wurden im ersten und zweiten Quadranten getragen. Im ersten Quadranten wurden zwei Schmelzproben (Pos. 1 + 2) mit einer Zahnbürste gereinigt. Im zweiten Quadranten wurden vier Schmelzproben (Position 3-6) mit dem Zahnpasta-Speichel-Gemisch umspült. Das Spülen und Bürsten erfolgte nach 30 min, 12 h, 24 h und 36 h. Nach 47,5 h wurden zwei Proben (Prüfkörper der Positionen 4 + 6) entnommen, eine erneute Anwendung durchgeführt und alle Proben nach 30 min entfernt. Die Proben wurden abwechselnd im Rasterelektronenmikroskop (REM) und im Fluoreszenzmikroskop (LDS) untersucht.

3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung der Bedeckung und Lebensfähigkeit der Biofilme auf den Prüfkörpern erfolgte mittels Vital-Fluoreszenzmikroskopie. Hierbei wurden die Proben mithilfe des Axio Imager M2 Mikroskops (hergestellt von Carl Zeiss AG, Oberhausen, Deutschland) analysiert. Es wurde eine Färbung mit dem LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability kit (Artikelnummer L7012, bereitgestellt von Molecular probes, Eugene, USA) angewendet. In diesem Kit kommen zwei Farbstoffe zur Anwendung, die mit Nukleinsäuren interkalieren. Diese sind Propidium Iodid und SYTO 9, außerdem ein mounting oil. Diese Farblösung unterscheidet sich in ihren Spektraleigenschaften sowie in ihrer Fähigkeit zur Durchdringung der Zellmembran. Dabei dringt SYTO 9 in alle Zellen ein die Nukleinsäuren enthalten. Propidium Iodid kann nicht in Zellen mit einer unbeschädigten Membran eindringen und verdrängt zudem SYTO 9, da es eine höhere Affinität zu Nukleinsäuren aufweist. Dadurch werden intakte Zellen grün fluoreszierend und geschädigte Zellen rot fluoreszierend dargestellt. Zur Herstellung der Farblösung wurden 1 µl jedes Farbstoffes in 1000 µl einer 0,9%igen NaCl- Lösung pipettiert und mittels eines Vortex Gerätes gemischt. Diese Farblösung kann in einem lichtundurchlässigen Gefäß bei 4 °C bis zu vier Wochen aufbewahrt werden. Nach der Demontage der Prüfkörper von der Schiene und einer gründlichen Spülung wurden diese in einer Feuchtkammer zwischengelagert. Dazu wurde ein mit destilliertem Wasser befeuchtetes staubfreies Tuch in eine Wellplatte gelegt. Eine Beschriftung des entsprechenden Prüfkörpers fand statt. Der gewünschte PK wurde mit 15 µl der Farblösung bedeckt und für 10 min lichtgeschützt inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger Farblösung wurde der Prüfkörper dreimal in jeweils frischer 0,9%iger NaCl-Lösung geschwenkt. Der Prüfkörper wurde behutsam getrocknet und in etwas Silikon auf dem Objektträger soweit versenkt, dass das Deckglas die Schmelzoberfläche nicht berührte. Das mounting oil wurde zuvor auf den Prüfkörper aufgetragen, der sich parallel zur Tischoberfläche plazierte befand. Die Farbstoffe wurden im Fluoreszenzmikroskop von zwei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt, weshalb die Aufnahmen von grün und rot nacheinander erfolgten und zunächst in grau vorlagen. Die Aufnahmen erfolgten in 1.000-facher Vergrößerung. Der Prüfkörper wurde in sechs Bereiche eingeteilt, welche dem Rasterfeldes des Okulars entsprachen. Von jedem Bereich wurde eine Aufnahme erzeugt. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit zwei Methoden. Zum einen wurde die Software ImageJ verwendet, zum anderen ein Scoring-Verfahren. Die Aufnahmen wurden verschlüsselt und bezüglich Vitalität und Bedeckung ausgewertet. Dabei wurde bei ImageJ die Pixelanzahl der ausgewählten Fläche berechnet und in Prozent angegeben. Die Bedeckung gibt den Anteil der Bakterienfläche an der

Gesamtfläche des Farbbildes wieder. Für die Vitalität wurden die Einzelbilder verwendet und die Pixelzahl der grünen Bakterien ins Verhältnis zur Gesamtanzahl der grünen und roten Bakterien gesetzt. Mittels ImageJ fand somit eine quantitative Bestimmung der Biofilmvitalität und Biofilmbedeckung statt, bei der die im 2D Bild abgebildeten Bakterien gezählt wurden. Um zusätzlich den qualitativen Zustand des Biofilms ins Verhältnis zu setzen, fand das Scoring statt. Für das Scoring-Verfahren der Bedeckung wurde eine Klassifizierung in fünf Kategorien verwendet, die sich an den Phasen der Biofilmbildung orientierten und somit die Dicke des Biofilms sowie seine Entwicklung mit einbezogen (Tabelle 2). Das Scoring der Vitalität fand ebenfalls in fünf Kategorien statt, die auf dem Verhältnis von roter und grüner Fluoreszenz basierten (Tabelle 3).

So wurden sechs repräsentative Aufnahmen pro Prüfkörper hinsichtlich Bedeckung und Vitalität mittels Scoring und ImageJ ausgewertet. Diese Werte wurden statistisch ausgewertet.

Tabelle 2: Scoring der Bedeckung (nach Rupf *et al.*, 2012)

Score	Definition
1	Pellikelschicht ohne bzw. mit vereinzelt Mikroorganismen
2	Geringe mikrobielle Ansammlungen
3	Dutzende von Mikroorganismen; mehrere mikrobielle Aggregate
4	Hunderte von Mikroorganismen - einschichtiger Biofilm oder Biofilm, der < 50% der Oberfläche ausmacht
5	Mehrschichtiger Biofilm, der > 50% der Oberfläche bedeckt

Tabelle 3: Scoring der Vitalität (nach Rupf *et al.*, 2012)

Score	Definition
1	Überwiegend rote Fluoreszenz; Verhältnis rote zu grüner Fluoreszenz: 90:10 und mehr
2	vorwiegend rote Fluoreszenz; Verhältnis rote zu grüner Fluoreszenz: 75:25
3	Verhältnis rote zu grüner Fluoreszenz: 50:50

4	Vorwiegend grüne Fluoreszenz; Verhältnis von roter zu grüner Fluoreszenz: 25:75 und weniger
5	Überwiegend grüne Fluoreszenz; Verhältnis zwischen roter und grüner Fluoreszenz: 10:90 und weniger

3.6 Rasterelektronenmikroskopie

Um die Morphologie der Biofilme zu beurteilen und die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung zu verifizieren, wurden drei Prüfkörper jeden Durchganges zusätzlich einer Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop unterzogen. Für diese Untersuchung war das Fixieren, Entwässern und Trocknen der Prüfkörper notwendig. Um die Prüfkörper zu fixieren, wurden sie für 1 h bei 4 °C in 1 ml Fixierlösung gelagert, womit die Mikroorganismen und die Biofilmstruktur konserviert wurden. Die Fixierlösung bestand aus Glutaraldehyd und einem 0,1 mol/l Cacodylat-Puffer. Für die Herstellung dieser Lösung wurden 21,4 g Cacodylat in 259 ml destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert auf 7,4-7,6 mit 0,1 mol/l Salzsäure eingestellt. Die Lösung wurde auf 1000 ml aufgefüllt. Von der 50%igen Glutaraldehydlösung wurden 4 ml entnommen und mit dem Cacodylat-Puffer auf 100 ml aufgefüllt. Nach der Fixierung erfolgte ein Waschschriff mit 0,1 mol/l Cacodylat-Puffer. Die Prüfkörper wurden in frische Gefäße überführt und durch eine Alkoholreihe entwässert, um das Risiko von Wasserresten im REM unter Vakuum zu minimieren und Artefakte zu verhindern. Abschließend wurde der Biofilm chemisch durch das Eintauchen in Hexamethyldisilazan über Nacht unter einer Werkbank an der Luft getrocknet. Die Prüfkörper wurden auf Aluminiumträgern mit leitfähiger Klebefolie befestigt und unter Vakuum mit einem Sputter-Coater mit Kohlenstoff beschichtet. Diese präparierten Proben wurden im Rasterelektronenmikroskop (REM, XL 30 ESEM FEG, FEI Company, Eindhoven, Niederlande) bis zu einer 20.000-fachen Vergrößerung abgebildet und entsprechend digitalfotografisch aufgenommen. Die Elementanalyse wurde mittels energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) (EDX Phoenix, EDAX Inc., Mahwah, USA) an ausgewählten Prüfkörpern bei 10 kV und 500-facher Vergrößerung durchgeführt. Die Gewichtsanteile der Elemente des Prüfkörpers sowie Zahnpastaausstriche wurden stichprobenartig an verschiedenen Oberflächenbereichen bestimmt.

3.7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit DataTab (DATAtab Team (2024). DATAtab: Online Statistics Calculator. DATAtab e.U. Graz, Austria) und GraphPad Prism (GraphPad Prism, version 10.0.0 für Mac, GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, 1995-2025 GraphPad Software) unter Verwendung der Daten aus der Auswertung mit ImageJ und Scoring-Verfahren. Die Daten waren nicht parametrisch. Innerhalb einer Stichprobe (Langzeit- vs. Sofortwirkung, chemisch vs. mechanisch) wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für den Vergleich mehrerer Pasten gegen die Kontrolle mit Wasser sowie gegen die Basispaste wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Als signifikant wurde ein p-Wert $< 0,05$ betrachtet.

4 Ergebnisse

Die Studie wurde von allen Probanden ohne Komplikationen abgeschlossen. Die Vitalfluoreszenzmikroskopie diente zur Untersuchung der Biofilmbedeckung und Biofilmvitalität. Zur morphologischen Beschreibung des Biofilms unter dem Einfluss verschiedener Zahnpasta Formulierungen sowie der Untersuchung der Substantivität der Inhaltsstoffe wurde zusätzlich die Rasterelektronenmikroskopie eingesetzt.

4.1 Fluoreszenzmikroskopie

Auf den untersuchten Prüfkörpern dominierten kokkoide Bakterien, vereinzelt fanden sich aber auch stäbchenförmige Bakterien ([Abb. 3b](#)). Darüber hinaus wurden einzelne Epithelzellen der Mundschleimhaut identifiziert, die sich durch einen charakteristischen roten Zellkern auszeichneten ([Abb. 3d](#)). Die Präsenz dieser Zellen konnte auf den Abrieb von Mundschleimhautpartikeln zurückgeführt werden, eine Einbeziehung bei der Auswertung ist nicht erfolgt.

Die Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie ermöglichte zudem die Visualisierung der Bedeckung der bakteriellen Besiedlung sowie die Differenzierung in avitale und vitale Bakterien als rote und grüne Fluoreszenz ([Abb. 3a + c](#)). Es konnten Ansammlungen von Bakterien in Kolonien, in Ketten sowie als Einzelbakterien nachgewiesen werden. ([Abb. 3b + c](#)).

Nach der Färbung mit dem LIVE/DEAD® Bacterial Viability Kit (BacLight™) wurden die Proben mit dem Scoring-System und der Bildverarbeitungssoftware ImageJ analysiert. Die resultierenden Daten sind in den folgenden Kapiteln einzeln dargestellt und werden in den [Abbildungen 5, 6, 8 und 9](#) als Boxplot-Darstellung graphisch abgebildet um Median, Mittelwerte, Maxima, Minima und signifikante Unterschiede zu veranschaulichen.

Darüber hinaus zeigen die [Abbildungen 4 und 7](#) ausgewählte Bilder, die die Bedeckung der Prüfkörper mit mikrobiellem Biofilm und die Vitalität des Biofilms unter dem Effekt der Spülung mit Wasser (W), Basispaste (B-P), Fluoridpaste (F-P), Zink-Kurkuma-Paste (ZK-P) dokumentieren.

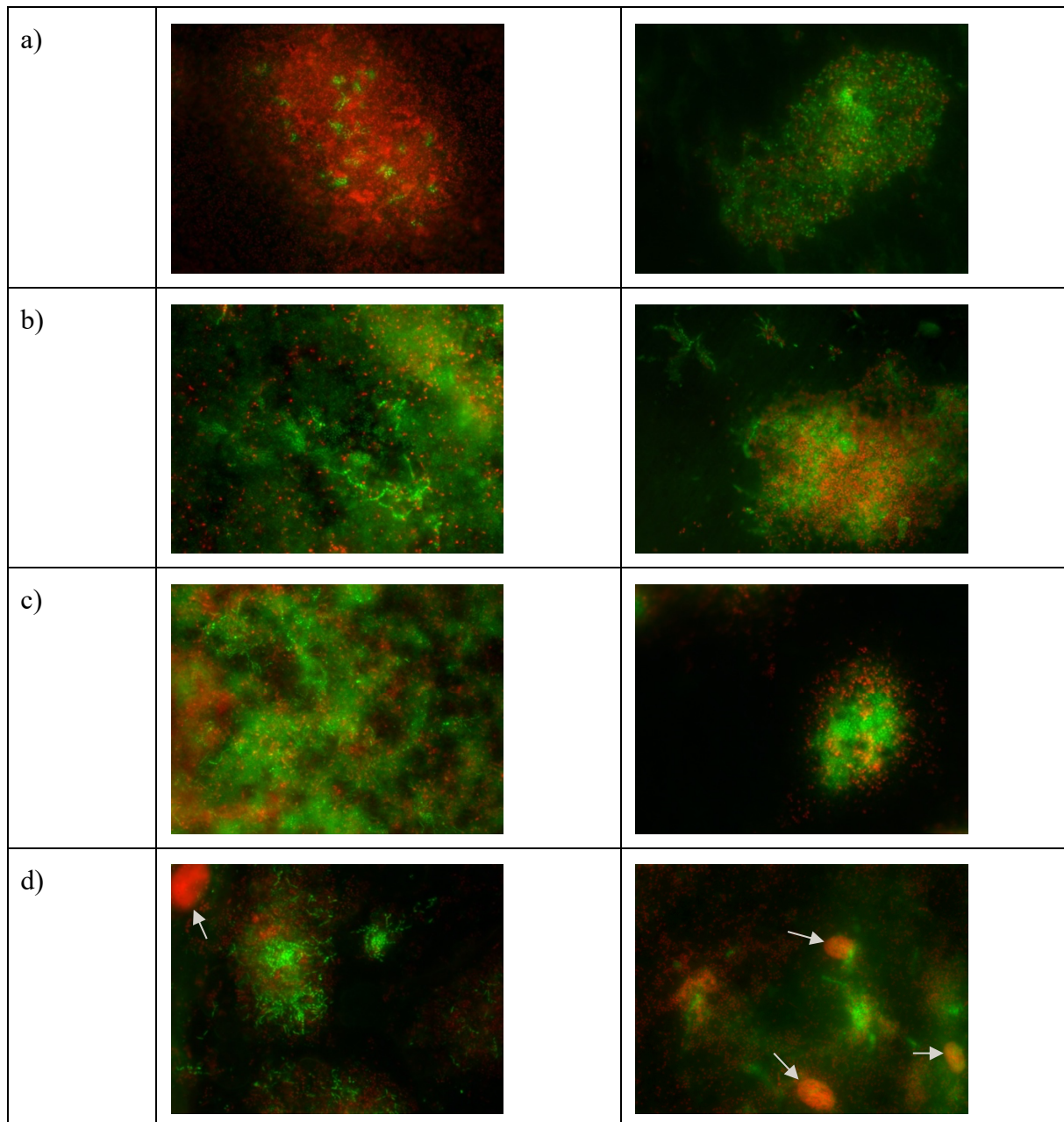


Abb. 3: Repräsentative Aufnahmen von *In-situ*-Biofilmen dargestellt mit Vitalfluoreszenz zur Visualisierung: **a)** Avitale (rote) und vitale (grüne) Bakterien waren deutlich voneinander zu unterscheiden. **b)** Es zeigten sich vor allem Kokken, jedoch waren auch Stäbchen zu finden. **c)** Beispiel eines stark bedeckten Prüfkörpers mit mehrschichtigem mikrobiellem Biofilm und einer reduzierten Bedeckung. **d)** Epithelzellen waren rot fluoreszierend sichtbar.

4.1.1 Bedeckung

Ungeputzte Schmelzprüfkörper, die mit Wasser umspült wurden, wiesen nach 47,5 h mehrschichtige Biofilme auf, die fast die gesamte Oberfläche des Prüfkörpers bedeckten. Die geputzten Prüfkörper wiesen eine geringere Biofilmbedeckung als die umspülten Prüfkörper auf, nur kleine Kolonien und einzelne Bakterien waren sichtbar. Die Bildung neuer Biofilme war auf den umspülten Prüfkörpern, die mit Fluoridpaste und Zink-Kurkuma-Paste in Kontakt

kamen im Vergleich zur Kontrollgruppe Wasser und Basispaste reduziert, es wurden aber weiterhin größere Bakterienkolonien gefunden. Nach 48 h wiesen die Prüfkörper eine vergleichbare Bedeckung wie nach 47,5 h auf, eine Reduzierung der Bedeckung als Kurzzeiteffekt durch den Kontakt mit den Zahnpasten war nur im Scoring-Verfahren, welches die Biofilmtiefe und Entwicklung miteinbezieht, festzustellen. Repräsentative Aufnahmen sind in [Abbildung 4](#) gezeigt.

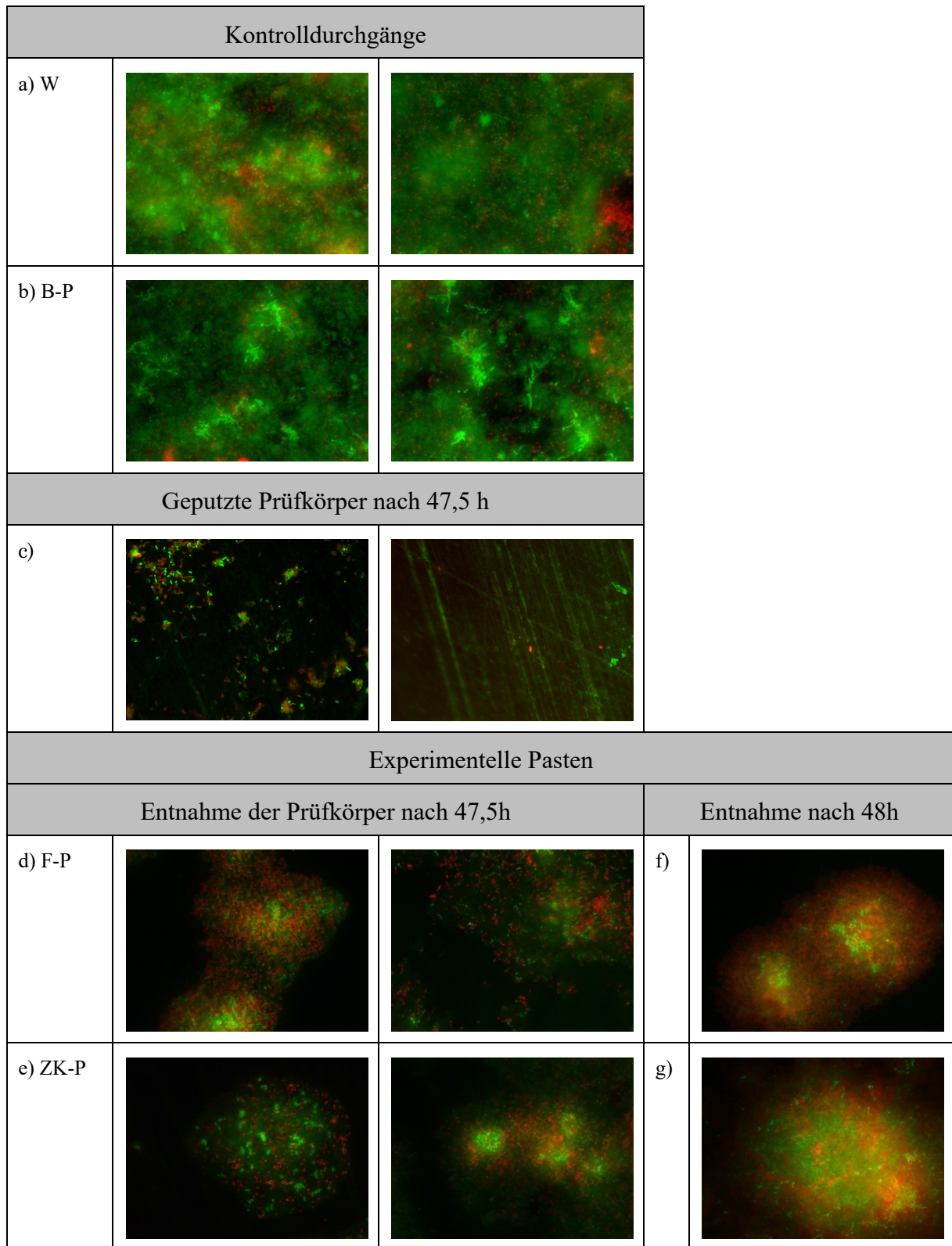


Abb. 4: Repräsentative Vitalfluoreszenz-Aufnahmen von Schmelzprüfkörpern zur Darstellung der Biofilmbedeckung. **a)** Nach 47,5 h Tragedauer und Umspülung mit Wasser (W) und der **b)** Basispaste (B-P) zeigte sich ein mehrschichtiger Biofilm der fast die Gesamtfläche des Prüfkörpers bedeckt. **c)** Auf geputzten Prüfkörpern zeigten sich nur kleine Kolonien oder einzelne Bakterien. Die Biofilm Bildung von Prüfkörpern die mit **d)** Fluoridpaste (F-P) oder **e)** Zink-Kurkuma-Paste (ZK-P) umspült wurden war nach viermaligem Spülen verringert. **f)** und **g)** Nach einem fünften Spülen wurden die Prüfkörper nach 30 min entnommen. Nur an den Prüfkörpern die mittels Scoring-Verfahren bewertet wurden zeigte sich eine zusätzlichen Reduktionen der Biofilmbedeckung.

4.1.1.1 Gemessene Biofilmneubildung

Durch das quantitative Auswertungsverfahren (ImageJ) konnte die prozentuale Bedeckung ermittelt werden. Im Kontrolldurchgang mit Wasser wiesen die Prüfkörper nach 47,5 h eine Biofilmbedeckung von durchschnittlich 89% auf. Nach dem Umspülen mit der Basispaste wiesen die Prüfkörper durchschnittlich eine Bedeckung von 80% auf. Das Umspülen mit Fluoridpaste und Zink-Kurkuma-Paste reduzierte die Biofilmneubildung bei ungeputzten, umspülten Prüfkörpern nach viermaligem Spülen statistisch signifikant auf 37% (F-P) beziehungsweise 31% (ZK-P) ([Abb. 5a](#)). Mechanisch gereinigte, geputzte Schmelzprüfkörper wiesen nach 48 h durchschnittlich eine Bedeckung von 0,2% auf. Die Reduktion der Bedeckung durch mechanische Reinigung war statistisch signifikant ($p < 0,05$) ([Abb. 5b](#)). Ein unmittelbarer Effekt 30 min nach Spülung konnte auf die Biofilmbedeckung nicht festgestellt werden ([Abb. 5c](#)).

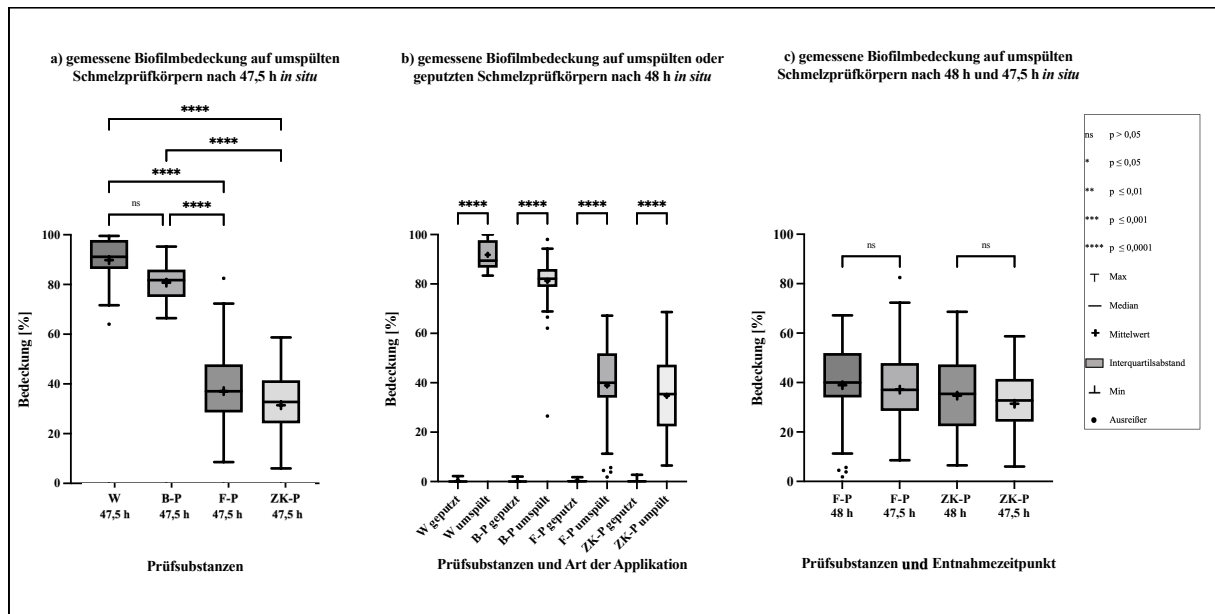


Abb. 5: Vergleichende graphische Darstellung der Ergebnisse für die gemessene Biofilmbedeckung: Mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ ausgewertete Bedeckung der Prüfkörper mit mikrobiellem Biofilm in [%] in Boxplot-Darstellung. Statistisch signifikante Unterschiede sind dargestellt: ns ($p > 0,05$), * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$), **** ($p \leq 0,0001$). Bei den Prüfsbstanzen handelte es sich um die Kontrollen Wasser (W) und Basispaste (B-P) sowie um die experimentelle Pasten Fluoridpaste (F-P) und Zink-Kurkuma-Paste (ZK-P). Während einer zweitägigen Biofilmbildung *in situ* wurden bovine Schmelzprüfkörper von sechs Versuchspersonen in zwei Durchgängen pro Paste vier (W 47,5 h (n=6), B-P 47,5 h (n=12), F-P 47,5 h (n=12) ZK-P 47,5 h (n=12)) oder ein fünftes Mal (F-P 48 h (n=12) ZK-P 48 h (n=12)) mit verschiedenen experimentellen Zahnpasten geputzt (W geputzt (n=6), B-P geputzt (n=12), F-P geputzt (n=12), ZK-P geputzt (n=12)) oder umspült (W umspült (n=6), B-P umspült (n=12), F-P umspült (n=12), ZK-P umspült (n=12)). Für die folgende *Ex-vivo*-Untersuchung mit einem Fluoreszenzmikroskop wurde der Biofilm auf den Prüfkörpern mit LIVE/DEAD® BacLight™ eingefärbt.

a) Vergleich der prozentualen Bedeckung auf Prüfkörpern, die nach 47,5 h *in situ* und viermaligem Spülen entnommen wurden. Die Prüfkörper wurden *in situ* nach 30 min, 12 h, 24 h und 36 h für 30 s mit Wasser, Basispaste, Fluoridpaste und Zink-Kurkuma-Paste umspült aber nicht geputzt und nach 47,5 h entnommen. Zu diesem Zeitpunkt war das letzte Umspülen 11,5 h her. Die prozentuale Bedeckung der Prüfkörper nach dem Spülen mit der Fluoridpaste und der Zink-Kurkuma-Paste unterschied sich statistisch signifikant von den Kontrollgruppen Wasser und Basispaste. Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests und Dunns Post-hoc-Test konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Substanzen festgestellt werden ($p \leq 0,0001$).

b) Vergleich der prozentualen Bedeckung auf Prüfkörpern, die nach 48 h *in situ* entnommen und entweder geputzt oder umspült wurden. Die Prüfkörper wurden nach 30 min, 12 h, 24 h, 36 h und 47,5 h für 30 s mit Wasser, Basispaste, Fluoridpaste oder Zink-Kurkuma-Paste umspült beziehungsweise geputzt und nach weiteren 30 min zum Zeitpunkt 48 h entfernt. Der Vergleich der umspülten und geputzten Prüfkörper einer Paste war statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-test, $p < 0,05$).

c) Vergleich der prozentualen Bedeckung auf Prüfkörpern, die nach viermaligem Spülen zu den Zeitpunkten 30 min, 12 h, 24 h und 36 h nach 47,5 h entnommen wurden und der Prüfkörper, die ein fünftes Mal umspült wurden und nach 30 min zum Zeitpunkt 48 h entnommen wurden. Es lag kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Entnahmezeitpunkten 47,5 h und 48 h innerhalb einer Prüfsbstanz vor.

4.1.1.2 Bewertete Biofilmneubildung

Den gleichen Bildern wurden fünf Score-Werte zur Evaluierung der qualitativen Biofilmbedeckung zugeordnet. Diese sind in der [Abbildung 6](#) als Boxplot-Diagramme veranschaulicht dargestellt. Mediane, Minima und Maxima sowie der Interquartilsabstand sind zu sehen. Hier zeigte sich ebenfalls ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Substraten. Mit Wasser und Basispaste umspülte Prüfkörper wiesen nach 47,5 h einen durchschnittlichen Score von 4,9 bzw 4,3 auf. Das Umspülen der Prüfkörper mit Fluoridpaste und Zink-Kurkuma-Paste reduzierte die Bedeckung auf einen durchschnittlichen Score von 3,71 für die Fluoridpaste und 3,75 für die Zink-Kurkuma-Paste. Auch hier waren die p-Werte statistisch signifikant verringert. Manuell gereinigte Prüfkörper wiesen statistisch signifikant niedrigere Scores auf als umspülte Prüfkörper ($p < 0.05$). In der Scoring-Auswertung fand sich außerdem ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Entnahmezeitpunkten 47,5 h und 48 h.

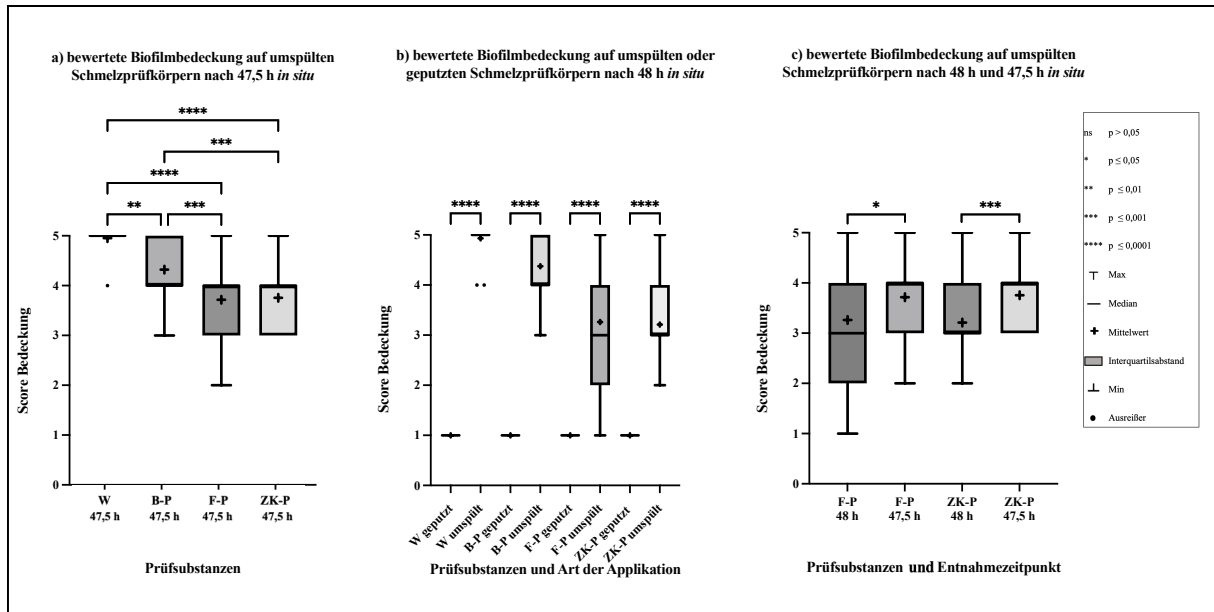


Abbildung 6: Vergleichende graphische Darstellung der Ergebnisse für die bewertete Biofilmbedeckung:

Mit dem Scoring-Verfahren ausgewertete Bedeckung der Prüfkörper mit mikrobiellem Biofilm in Boxplot-Darstellung. Statistisch signifikante Unterschiede sind dargestellt: ns ($p > 0,05$), * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$), **** ($p \leq 0,0001$). Bei den Prüfsubstanzen handelte es sich um die Kontrollen Wasser (W) und Basispaste (B-P) sowie um die experimentelle Fluoridpaste (F-P) und Zink-Kurkuma-Paste (ZK-P). Während einer zweitägigen Biofilmbildung *in situ* wurden bovine Schmelzprüfkörper von sechs Versuchspersonen in zwei Durchgängen pro Paste vier (W 47,5 h ($n=6$), B-P 47,5 h ($n=12$), F-P 47,5 h ($n=12$), ZK-P 47,5 h ($n=12$)) oder ein fünftes Mal (F-P 48 h ($n=12$), ZK-P 48 h ($n=12$)) mit verschiedenen experimentellen Zahnpasten geputzt (W geputzt ($n=6$), B-P geputzt ($n=12$), F-P geputzt ($n=12$), ZK-P geputzt ($n=12$)) oder umgespült (W umgespült ($n=6$), B-P umgespült ($n=12$), F-P umgespült ($n=12$), ZK-P umgespült ($n=12$)). Für die folgende *Ex-vivo*-Untersuchung mit einem Fluoreszenzmikroskop wurde der Biofilm auf den Prüfkörpern mit LIVE/DEAD® BacLight™ eingefärbt.

a) Vergleich der Score-Werte der Bedeckung auf Prüfkörpern, die nach 47,5 h *in situ* und viermaligem Spülen entnommen wurden. Die Prüfkörper wurden *in situ* nach 30 min, 12 h, 24 h und 36 h für 30 s mit Wasser, Basispaste, Fluoridpaste und Zink-Kurkuma-Paste umgespült aber nicht geputzt und nach 47,5 h entnommen. Zu diesem Zeitpunkt war das letzte Umspülen 11,5 h her. Die Score-Werte Bedeckung der Prüfkörper nach dem Spülen mit der Fluoridpaste und der Zink-Kurkuma-Paste unterschied sich statistisch signifikant von den Kontrollgruppen Wasser und Basispaste. Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests und Dunns Post-hoc-Test konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Substanzen festgestellt werden ($p \leq 0,0001$).

b) Vergleich der Score-Werte der Bedeckung auf Prüfkörpern, die nach 48 h *in situ* entnommen und entweder geputzt oder umgespült wurden. Die Prüfkörper wurden nach 30 min, 12 h, 24 h, 36 h und 47,5 h für 30 s mit Wasser, Basispaste, Fluoridpaste oder Zink-Kurkuma-Paste umgespült oder geputzt und nach weiteren 30 min zum Zeitpunkt 48 h entfernt. Der Vergleich der umgespülten und geputzten Prüfkörper einer jeden Prüfsubstanz war statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$). Die Nullhypothese wurde abgelehnt.

c) Vergleich der Score-Werte der Bedeckung auf Prüfkörpern, die nach viermaligem Umspülen zu den Zeitpunkten 30 min, 12 h, 24 h und 36 h nach 47,5 h *in situ* entnommen wurden und der Prüfkörper, die ein fünftes Mal umgespült wurden und nach 30 min zum Zeitpunkt 48 h *in situ* entnommen wurden. Es lag ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Entnahmezeitpunkten 47,5 h und 48 h innerhalb einer Prüfsubstanz vor (Mann-Whitney-U-Test $p < 0,05$).

4.1.2 Vitalität

Prüfkörper, die mit Wasser umspült wurden, wiesen mehr grüne als rote Fluoreszenz auf. Die mit Basispaste umspülten Prüfkörper wiesen ein ausgewogenes Verhältnis von roter und grüner Färbung auf. Prüfkörper, die mit Fluoridpaste und Zink-Kurkuma-Paste umspült wurden, zeigten mehr rote als grüne Fluoreszenz. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied nach 47,5 h abhängig vom Substrat. Der Biofilm auf mit experimentellen Pasten geputzten Prüfkörpern wies eine höhere Vitalität auf als der Biofilm der Prüfkörper, die umspült wurden. Die mit Wasser geputzten Prüfkörper wiesen im Vergleich zu den mit Wasser umspülten Prüfkörpern nur im Scoring-Verfahren, welches das Verhältnis roter und grüner Fluoreszenz bewertet, eine erhöhte Vitalität auf. Es zeigte sich ein unmittelbarer Effekt 30 min nach Umspülen der Prüfkörper. Bei der Fluoridpaste und Zink-Kurkuma-Paste reduzierte sich die Vitalität zwischen den Entnahmezeitpunkten 47,5 h und 48 h statistisch signifikant. Repräsentative Aufnahmen sind in [Abbildung 7](#) gezeigt.

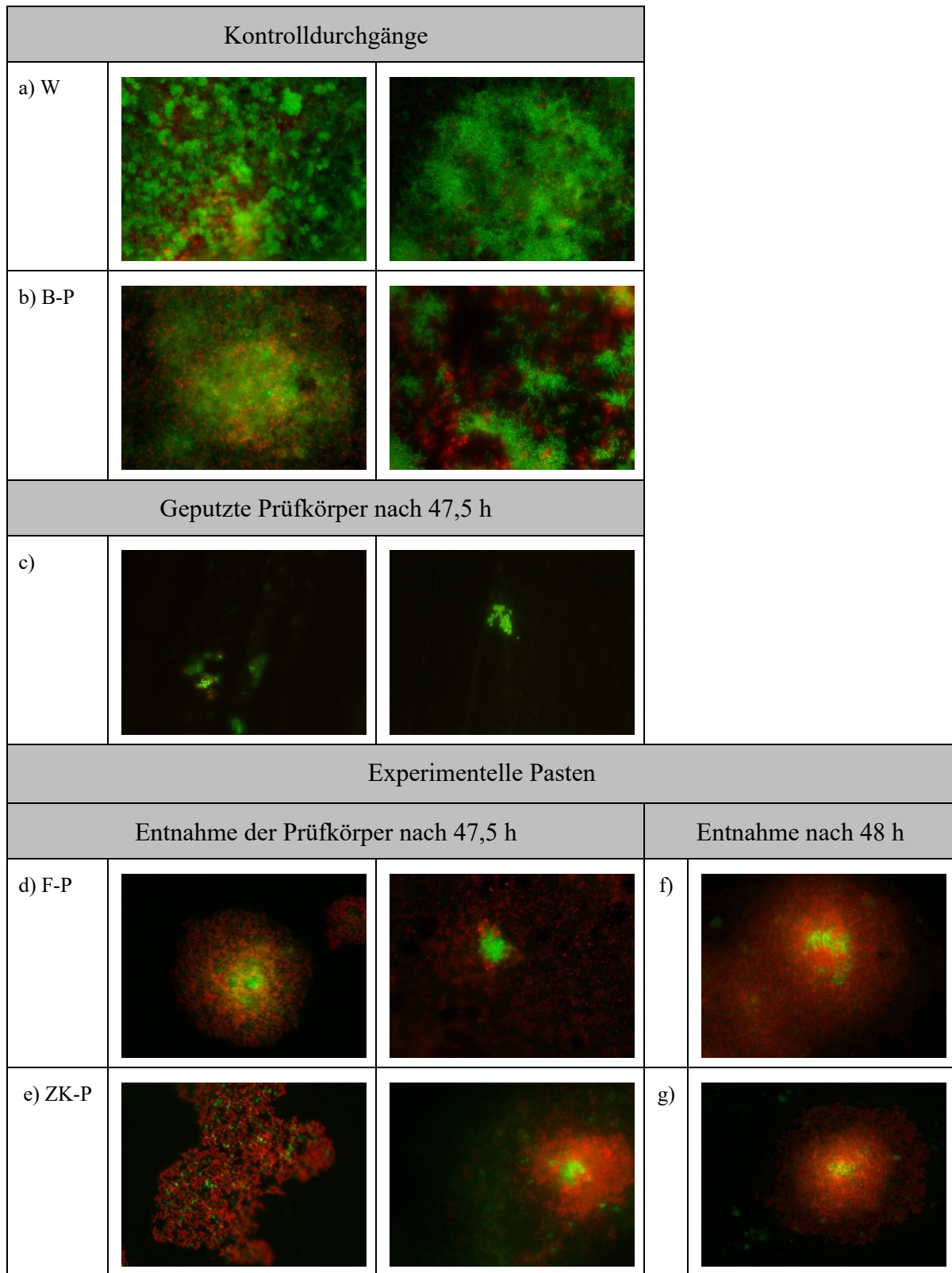


Abb. 7: Repräsentative Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von Schmelzprüfkörpern zur Darstellung der Biofilmvitalität. Nach 47,5 h Tragedauer und Umspülung mit **a)** Wasser (W) oder **b)** Basispaste (B-P) zeigte sich ein mehrschichtiger Biofilm mit vitalen und avitalen Bakterien. **c)** Auf geputzten Prüfkörpern fanden sich vitale Bakterien häufiger als avitale. **d) + e)** Die Vitalität von mit Zahnpasta umspülten Prüfkörper war reduziert ($p < 0,001$). Nach 30 min zeigte sich bei der **f)** Fluoridpaste (F-P) und der **g)** Zink-Kurkuma-Paste (ZK-P) ein unmittelbarer Effekt, nach 48 h fanden sich mehr avitale Bakterien als zum Entnahmezeitpunkt nach 47,5 h innerhalb der Fluoridpaste und Zink-Kurkuma-Paste.

4.1.2.1 Gemessene Biofilmvitalität

[Abbildung 8](#) zeigt als graphische Darstellung die prozentuale Vitalität in [%]. Durch das quantitative Auswertungsverfahren (ImageJ) konnte der Anteil vitaler Bakterien gemessen als grüne Fluoreszenz am Gesamtbiofilm ermittelt werden. Ungeputzte Schmelzprüfkörper, die mit Wasser gespült wurden, wiesen nach 47,5 h mehrschichtige Biofilme auf. Die Vitalität lag bei durchschnittlich 77%. Bei der Basispaste lag sie signifikant niedriger bei 55%. Bei den mit Fluoridpaste und Zink-Kurkuma-Paste umspülten Prüfkörpern zeigte sich eine zu Wasser und Basispaste signifikante Reduktion der Vitalität. Die Fluoridpaste zeigte eine Reduktion der Vitalität auf durchschnittlich 42%, die Zink-Kurkuma-Paste auf 34%. Nach 48 h wies der auf mit experimentellen Pasten geputzten Prüfkörpern verbliebene Biofilm eine höhere Vitalität auf als die Biofilme auf den ungeputzten und mit den Pasten umspülten (oder auch kontaminierten) Prüfkörpern. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die prozentuale Bedeckung der Prüfkörper nach dem Putzen durch Bakterien oder Biofilm deutlich geringer war als die Bedeckung der ungeputzten Prüfkörper ([Abb. 7b](#)). Bei der Fluoridpaste und Zink-Kurkuma-Paste zeigte sich ein unmittelbarer Effekt. Zwischen den Entnahmezeitpunkten 47,5 h und 48 h reduzierte sich die Vitalität auf 35% (F-P) und 26% (ZK-P) statistisch signifikant.

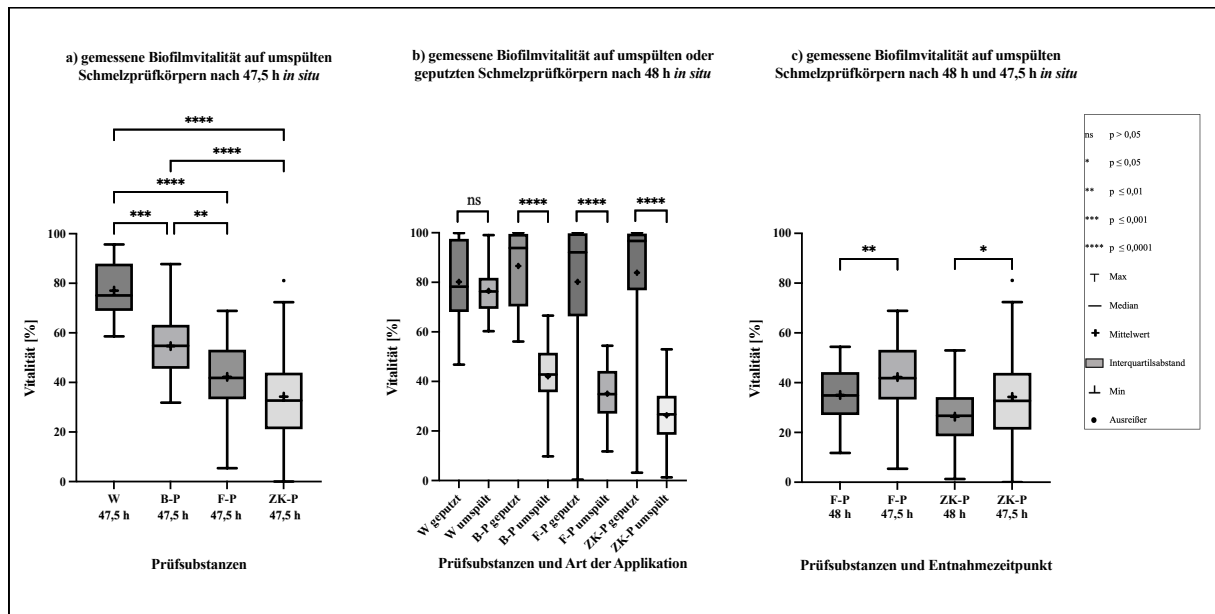


Abbildung 8: Vergleichende graphische Darstellung der Ergebnisse für die gemessene Biofilmvitalität: Mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ ausgewertete Vitalität der Prüfkörper mit mikrobiellem Biofilm in [%] in Boxplot-Darstellung. Statistisch signifikante Unterschiede sind dargestellt: ns ($p > 0,05$), * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$), **** ($p \leq 0,0001$). Bei den Prüfsubstanzen handelte es sich um die Kontrollen Wasser (W) und Basispaste (B-P) sowie um die experimentellen Pasten Fluoridpaste (F-P) und Zink-Kurkuma-Paste (ZK-P). Während einer zweitägigen Biofilmbildung *in situ* wurden bovine Schmelzprüfkörper von sechs Versuchspersonen in zwei Durchgängen pro Paste vier (W 47,5 h ($n=6$), B-P 47,5 h ($n=12$), F-P 47,5 h ($n=12$), ZK-P 47,5 h ($n=12$)) oder ein fünftes Mal (F-P 48 h ($n=12$), ZK-P 48 h ($n=12$)) mit verschiedenen experimentellen Zahnpasten geputzt (W geputzt ($n=6$), B-P geputzt ($n=12$), F-P geputzt ($n=12$), ZK-P geputzt ($n=12$)) oder umspült (W umspült ($n=6$), B-P umspült ($n=12$), F-P umspült ($n=12$), ZK-P umspült ($n=12$)). Für die folgende *Ex-vivo*-Untersuchung mit einem Fluoreszenzmikroskop wurde der Biofilm auf den Prüfkörpern mit LIVE/DEAD® BacLight™ eingefärbt.

a) Vergleich der prozentualen Vitalität des mikrobiellen Biofilms auf Prüfkörpern, die nach 47,5 h *in situ* und viermaligem Spülen entnommen wurden. Die Prüfkörper wurden *in situ* nach 30 min, 12 h, 24 h und 36 h für 30 s mit Wasser, Basispaste, Fluoridpaste und Zink-Kurkuma-Paste umspült aber nicht geputzt und nach 47,5 h entnommen. Zu diesem Zeitpunkt war das letzte Umspülen 11,5 h her. Die prozentuale Vitalität der Prüfkörper nach dem Spülen mit der Fluoridpaste und der Zink-Kurkuma-Paste unterschied sich statistisch signifikant von den Kontrollgruppen Wasser und Basispaste. Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests und Dunns Post-hoc-Test konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Substanzen festgestellt werden (W vs. B-P ($p = 0,0004$), W vs. F-P ($p \leq 0,0001$), W vs. ZK-P ($p \leq 0,0001$), B-P vs. F-P ($p = 0,0037$), B-P vs. ZK-P ($p \leq 0,0001$)).

b) Vergleich der prozentualen Vitalität des mikrobiellen Biofilms auf Prüfkörpern, die nach 48 h *in situ* entnommen und entweder geputzt oder umspült wurden. Die Prüfkörper wurden nach 30 min, 12 h, 24 h, 36 h und 47,5 h für 30 s mit Wasser, Basispaste, Fluoridpaste oder Zink-Kurkuma-Paste umspült beziehungsweise geputzt und nach weiteren 30 min zum Zeitpunkt 48 h entfernt. Der Vergleich der umspülten und geputzten Prüfkörper bei den experimentellen Pasten war statistisch signifikant (für B-P, F-P, und ZK-P: Mann-Whitney-U-Test $p < 0,05$). Im Kontrolldurchgang mit Wasser lag keine statistische Signifikanz vor (Mann-Whitney-U-test $p > 0,05$).

c) Vergleich der prozentualen Vitalität des mikrobiellen Biofilms auf Prüfkörpern, die nach viermaligem Spülen zu den Zeitpunkten 30 min, 12 h, 24 h und 36 h nach 47,5 h entnommen wurden und der Prüfkörper, die ein fünftes Mal umspült wurden und nach weiteren 30 min zum Zeitpunkt 48 h entnommen wurden. Es lag ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Entnahmezeitpunkten 47,5 h und 48 h innerhalb einer Prüfsubstanz vor (Mann-Whitney-U-Test $p < 0,05$).

4.1.2.2 Bewertete Biofilmvitalität

Abbildung 9 zeigt die graphische Darstellung der Scoring-Werte, ermittelt mit dem Scoring-System zur qualitativen Evaluierung der Vitalität des Biofilms. Die mit Wasser umspülten Schmelzprüfkörper wiesen nach 47,5 h mehrschichtige Biofilme mit einem durchschnittlichen Score von 4,4 auf, während die Werte der Basispaste mit durchschnittlich 3,5 geringer waren. Bei den umspülten Prüfkörpern mit Fluoridpaste und Zink-Kurkuma-Paste war eine statistisch signifikante Abnahme der Vitalität des mikrobiellen Biofilms im Vergleich zu Wasser und zur Basispaste auf durchschnittlich 3,0 und 2,7 festzustellen (Abb. 9a). Auf mechanisch gereinigten Prüfkörpern mit Wasser, Basispaste, Fluoridpaste und Zink-Kurkuma-Paste fand sich eine bewertete Vitalität mit dem durchschnittlichen Score von 4,9. Auf zum selben Zeitpunkt chemisch behandelten Prüfkörpern lag der Score statistisch signifikant niedriger bei durchschnittlich 2,3, für Wasser bei 4 (Abb. 9b). Bei der Fluoridpaste und der Zink-Kurkuma-Paste wurde eine sofortige Wirkung beobachtet, hier sanken die Werte zwischen den Entnahmezeitpunkten 47,5 h und 48 h auf 2,4 und 2,2 statistisch signifikant. (Abb. 9c).

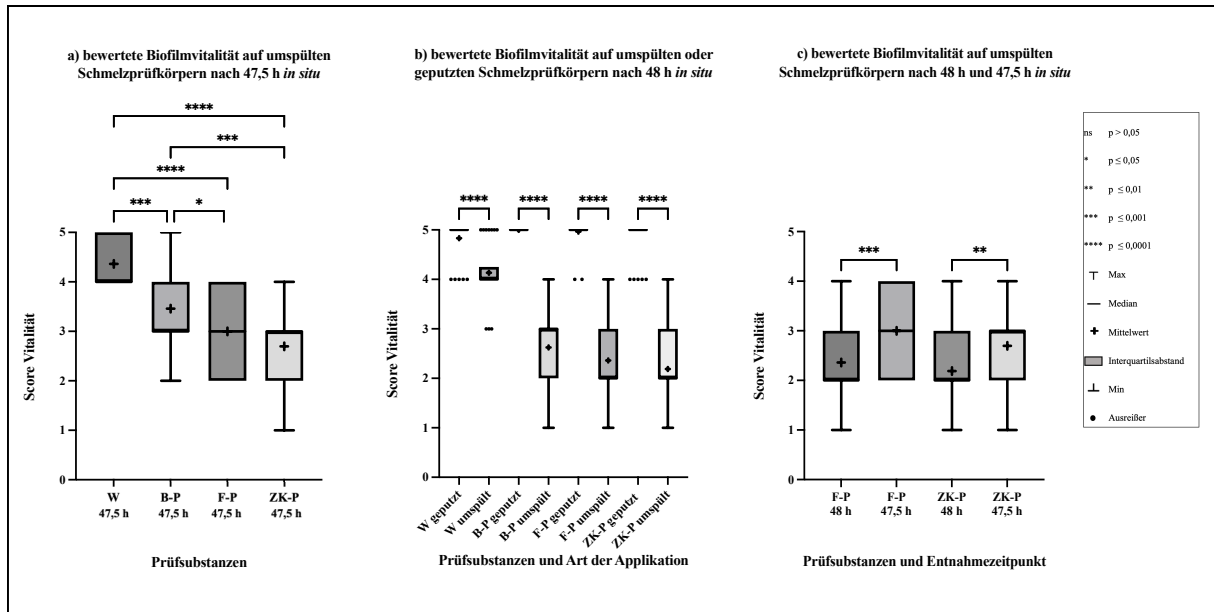


Abbildung 9: Vergleichende graphische Darstellung der Ergebnisse für die bewertete Biofilmvitalität: Mit dem Scoring-Verfahren ausgewertete Vitalität der Prüfkörper mit mikrobiellem Biofilm in Boxplot-Darstellung. Statistisch signifikante Unterschiede sind dargestellt: ns ($p > 0,05$), * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$), **** ($p \leq 0,0001$). Bei den Prüfsubstanzen handelte es sich um die Kontrollen Wasser (W) und Basispaste (B-P) sowie um die experimentelle Fluoridpaste (F-P) und Zink-Kurkuma-Paste (ZK-P). Während einer zweitägigen Biofilmbildung *in situ* wurden bovine Schmelzprüfkörper von sechs Versuchspersonen in zwei Durchgängen pro Paste vier (W 47,5 h ($n=6$), B-P 47,5 h ($n=12$), F-P 47,5 h ($n=12$), ZK-P 47,5 h ($n=12$)) oder ein fünftes Mal (F-P 48 h ($n=12$), ZK-P 48 h ($n=12$)) mit verschiedenen experimentellen Zahnpasten geputzt (W geputzt ($n=6$), B-P geputzt ($n=12$), F-P geputzt ($n=12$), ZK-P geputzt ($n=12$)) oder umspült (W umspült ($n=6$), B-P umspült ($n=12$), F-P umspült ($n=12$), ZK-P umspült ($n=12$)). Für die folgende *Ex-vivo*-Untersuchung mit einem Fluoreszenzmikroskop wurde der Biofilm auf den Prüfkörpern mit LIVE/DEAD® BacLight™ eingefärbt.

a) Vergleich der Score-Werte der Vitalität auf Prüfkörpern, die nach 47,5 h *in situ* und viermaligem Spülen entnommen wurden. Die Prüfkörper wurden *in situ* nach 30 min, 12 h, 24 h und 36 h für 30 s mit Wasser, Basispaste, Fluoridpaste und Zink-Kurkuma-Paste umspült aber nicht geputzt und nach 47,5 h entnommen. Zu diesem Zeitpunkt war das letzte Umspülen 11,5 h her. Die prozentuale Vitalität der Prüfkörper nach dem Spülen mit der Fluoridpaste und der Zink-Kurkuma-Paste unterschied sich statistisch signifikant von den Kontrollgruppen Wasser und Basispaste. Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests und Dunns Post-hoc-Test konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Substanzen festgestellt werden (W vs. B-P ($p = 0,0004$), W vs. F-P ($p \leq 0,0001$), W vs. ZK-P ($p \leq 0,0001$), B-P vs. F-P ($p = 0,0330$), B-P vs. ZK-P ($p = 0,0003$)).

b) Vergleich der Score-Werte der Vitalität auf Prüfkörpern, die nach 48 h *in situ* entnommen und entweder geputzt oder umspült wurden. Die Prüfkörper wurden nach 30 min, 12 h, 24 h, 36 h und 47,5 h für 30 s mit Wasser, Basispaste, Fluoridpaste oder Zink-Kurkuma-Paste umspült beziehungsweise geputzt und nach weiteren 30 min zum Zeitpunkt 48 h entfernt. Der Vergleich der Vitalität auf umspülten und geputzten Prüfkörper jeder Prüfsubstanz war statistisch signifikant (für B-P, F-P, und ZK-P: Mann-Whitney-U-Test $p < 0,05$).

c) Vergleich der Score-Werte der Vitalität auf Prüfkörpern, die nach viermaligem Spülen zu den Zeitpunkten 30 min, 12 h, 24 h und 36 h nach 47,5 h entnommen wurden und der Prüfkörper, die ein fünftes Mal umspült wurden und nach 30 min zum Zeitpunkt 48 h entnommen wurden. Es lag ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Entnahmezeitpunkten 47,5 h und 48 h innerhalb einer Prüfsubstanz vor (Mann-Whitney-U-Test $p < 0,05$).

4.2 Rasterelektronenmikroskopie - Biofilmmorphologie

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen unterstützten die Fluoreszenzmikroskopie bei der Veranschaulichung der *In-situ*-Biofilme auf den Schmelzproben nach 48 h und 47,5 h. Es wurden interindividuelle Unterschiede in der Menge und Struktur des Biofilms zwischen den Probanden festgestellt. Dennoch konnten folgende Aussagen über den Einfluss der Zahnpastaformulierung auf die initiale Biofilmbildung getroffen und durch repräsentative Bilder veranschaulicht werden.

4.2.1 Visualisierung des *In-situ*-Biofilms

Bei der morphologischen Untersuchung der adhärenenten Bakterien wurden unabhängig von der Prüfsubstanz überwiegend Kokken und nur wenige Stäbchenbakterien gefunden. Die mechanisch gereinigten Prüfkörper wiesen eine reduzierte Bedeckung mit Biofilm auf, wobei die Anzahl der Bakterien auf den geputzten Proben gering war.

Im Rahmen der Untersuchung konnten keine eindeutigen Unterschiede in der Anzahl und strukturellen Beschaffenheit der anhaftenden Bakterien und des Biofilms zwischen den umspülten Schmelzprüfkörpern in Abhängigkeit von der Prüfsubstanz festgestellt werden.

Die mit Wasser umspülten unbehandelten Prüfkörper zeigten mehrschichtige Biofilme mit einer erkennbaren strukturierten Matrix, in die Bakterien eingebettet waren (Abb. 10 b + c). Geputzte Prüfkörper zeigten eine mit Pellikelschicht bedeckte Oberfläche und einzelne anhaftende Bakterien (Abb. 10a, 11a, 12a, 13a). Das Umspülen der Prüfkörper mit der Basispaste, der Fluoridpaste und der Zink-Kurkuma-Paste führte zur Ausbildung von Kolonien, die sich durch Mehrschichtigkeit bis hin zur vollständigen Bedeckung der Oberfläche mit Biofilm auszeichneten (Abb. 11-13 jeweils b + c).

4.2.1.1 Kontrolle mit Wasser

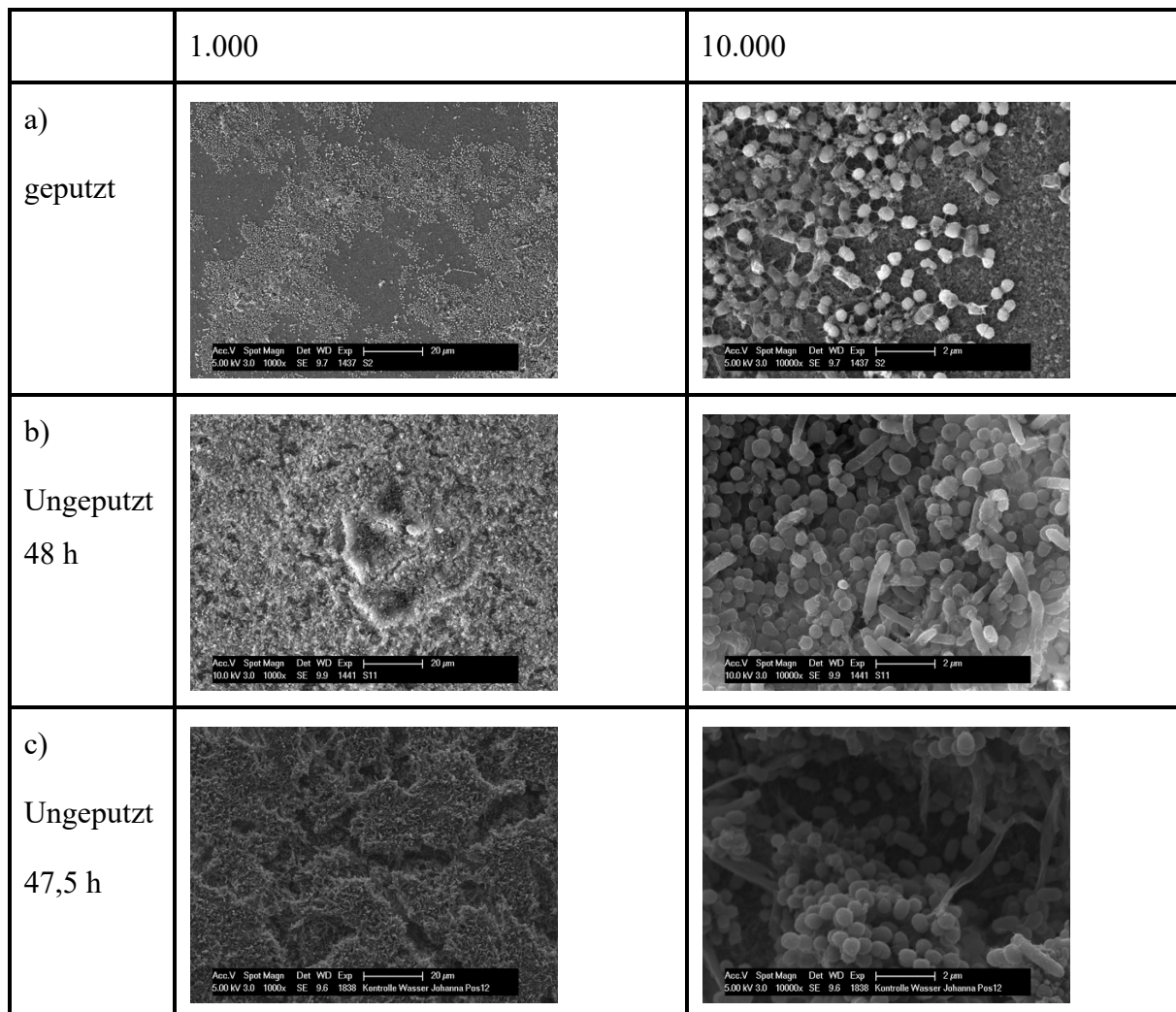


Abbildung 10: Repräsentative REM-Bilder eines 48 h Biofilms der Kontrollgruppe, jeweils bei 1.000-facher und 10.000-facher Vergrößerung und mit Wasser gespült. **a)** Gereinigter Schmelzprüfkörper mit Biofilm und einzelnen Bakterien. **b)** Ungereinigter 48 h und **c)** 47,5 h Biofilm mit strukturierter Matrix. Die Bakterien waren meist kokkenförmig und teilweise stäbchenförmig. Die Bateriaen hatten eine intakte Morphologie.

4.2.1.2 Basispaste

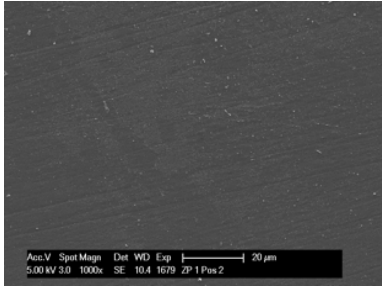
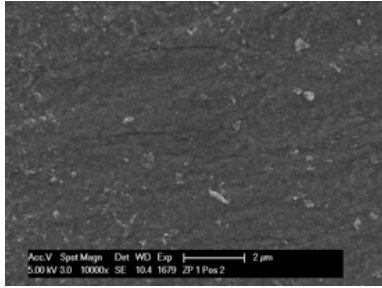
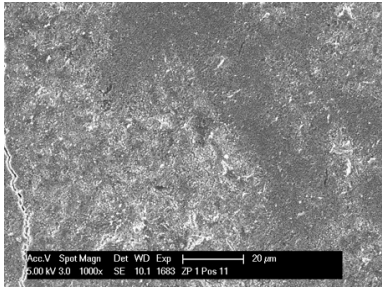
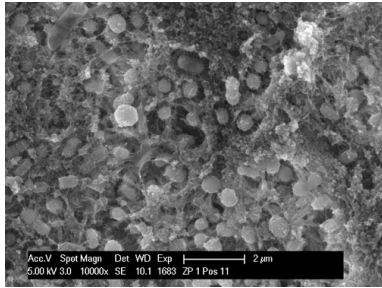
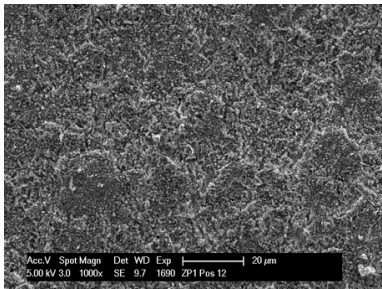
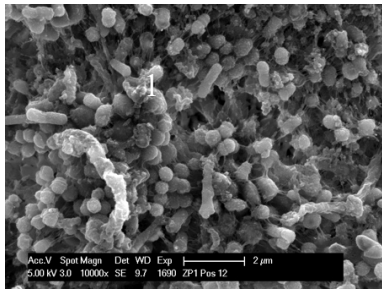
	1.000	10.000
a) geputzt		
b) ungeputzt 48 h		
c) ungeputzt 47,5 h		

Abbildung 11: Repräsentative REM-Aufnahmen eines In-situ-Biofilms, behandelt mit der Basispaste. Dargestellt sind Bilder der Prüfkörper in 1.000-facher und 10.000-facher Vergrößerung. Die Versuchsdauer betrug für **a) + b)** 48 h und für **c)** 47,5 h. Die 47,5 h Prüfkörper wurden viermal gespült, es folgte ein weiteres Umspülen oder Putzen und die Entnahme nach 30 min zum Zeitpunkt 48 h. **a)** Der geputzte Prüfkörper zeigte eine mit Pellicel bedeckte Oberfläche mit einzelnen adhärenen Bakterien. **b) + c)** Die umspülten Prüfkörper zeigten hauptsächlich Kokken, es waren auch Stäbchen zu finden. Zwischen den Bakterien ist die Biofilmmatrix zu erkennen. Die Bakterien hatten eine intakte Morphologie. Es sind einzelne eckige Partikel (1) zu erkennen.

4.2.1.3 Fluoridpaste

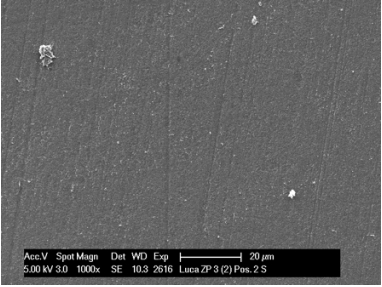
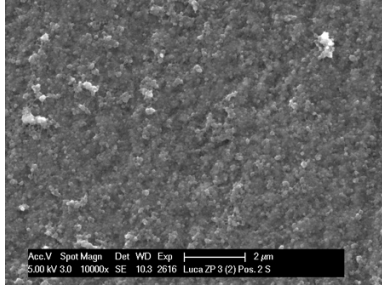
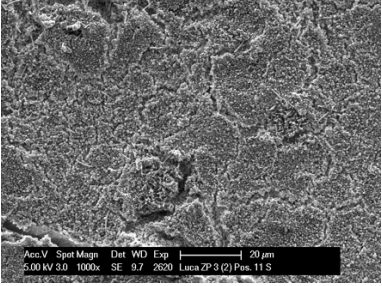
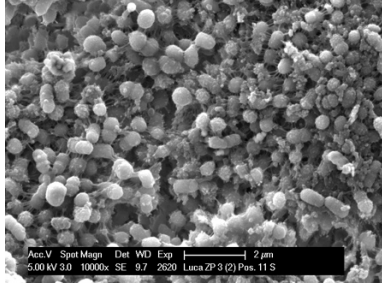
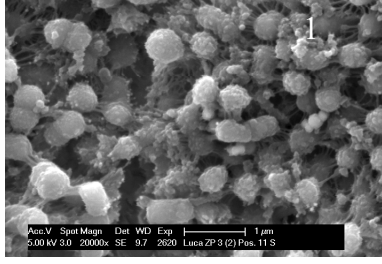
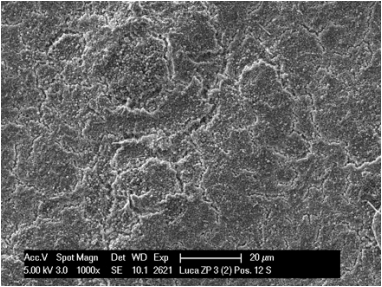
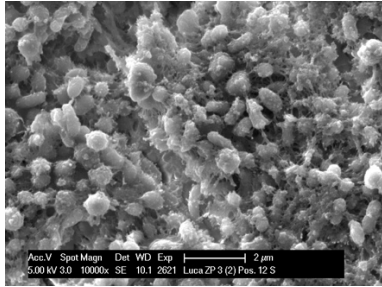
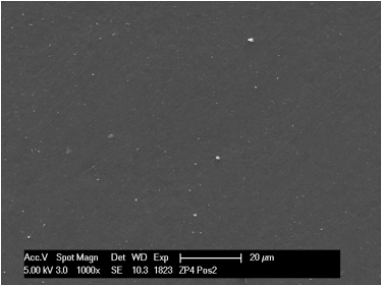
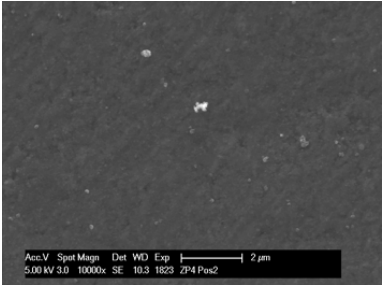
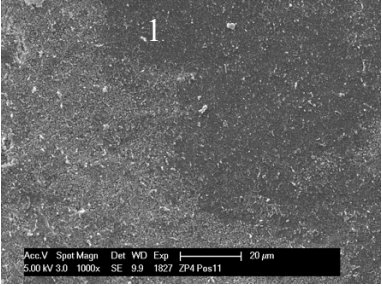
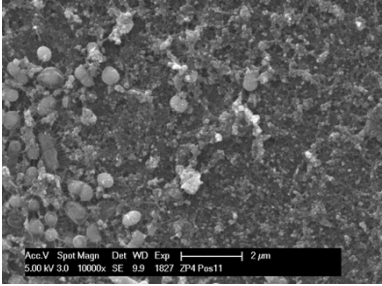
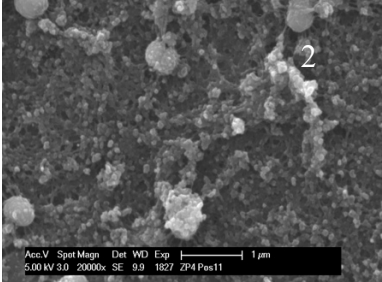
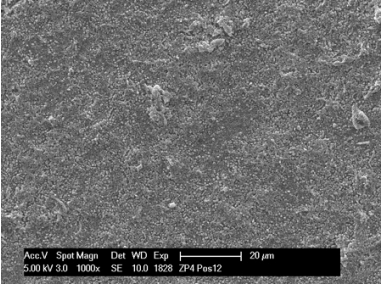
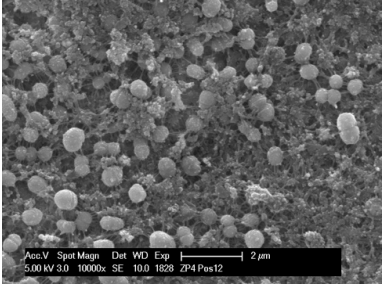
	1.000	10.000/ 20.000
a) geputzt		
b) ungeputzt 48 h		 
c) ungeputzt 47,5 h		

Abbildung 12: Repräsentative REM-Bilder eines *In-situ*-Biofilms mit der experimentellen Fluoridpaste: Dargestellt sind Aufnahmen der Prüfkörper in 1.000-, 10.000- und 20.000-facher Vergrößerung. Die Tragedauer der Schienen, die mit Schmelzprüfkörpern bestückt sind, betrug für **a) + b)** 48 h, für **c)** 47,5 h. Die 47,5 h Prüfkörper wurden viermal gespült, es folgte ein weiteres Umspülen und Putzen und die Entnahme nach 30 min zum Zeitpunkt 48 h. **a)** Der geputzte Prüfkörper zeigte eine mit Biofilm bedeckte Oberfläche mit Putzkörperrückständen. **b) + c)** Die umspülten Prüfkörper zeigten hauptsächlich Kokken, es waren auch Stäbchen zu finden. In der 20.000-fachen Vergrößerung waren eckige Partikel zu finden (1). Die Bakterien hatten eine intakte Morphologie.

4.2.1.4 Zink-Kurkuma-Paste

	1.000	10.000/ 20.000
a) geputzt		 
b) ungeputzt 48 h		 
c) ungeputzt 47,5 h		

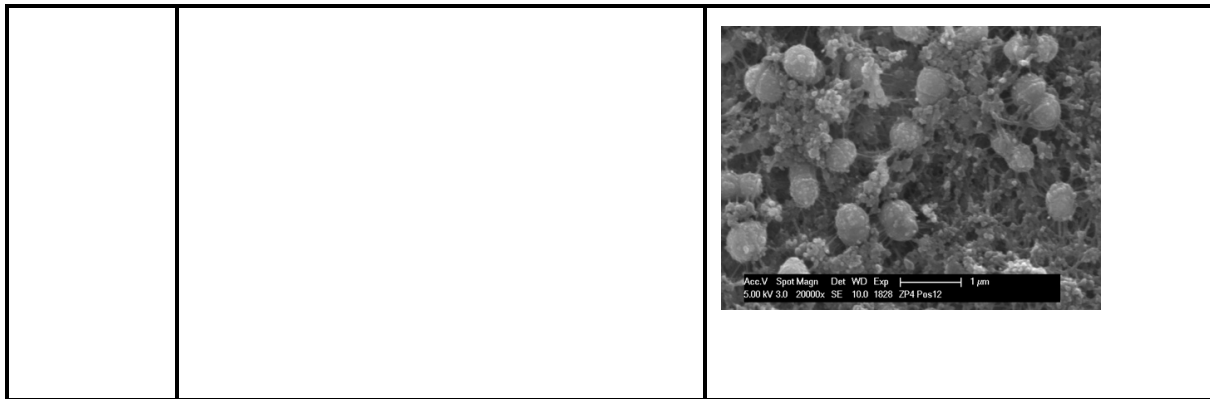


Abbildung 13: Repräsentative REM-Bilder eines *In-situ*-Biofilms, im Versuchsablauf mit der Zink-Kurkuma- Paste. Zu sehen sind REM-Bilder der Prüfkörper in 1.000-, 10.000- und 20.000-facher Vergrößerung. Die Tragedauer der Schienen, die mit Schmelzprüfkörpern bestückt waren, betrug für **a) + b)** 48 h, für **c)** 47,5 h. Die 47,5 h Prüfkörper wurden zuletzt zum Zeitpunkt 36 h gespült. Nach 47,5 h wurden sie entnommen. Es folgte ein weiteres umspülen und Putzen und die Entnahme nach zusätzlichen 30 min zum Zeitpunkt 48 h. **a)** Der geputzte Prüfkörper zeigte eine bakterienfreie Oberfläche, lediglich Pellikel war zu erkennen. **b) + c)** Die umspülten Prüfkörper zeigten hauptsächlich Kokken, es waren auch Stäbchen zu finden. Zwischen den Bakterien war die netzartige Biofilmmatrix zu erkennen. Nach 48 h waren bakterienfreie Areale zu finden (1) sowie Putzkörperückstände (2). Die Bakterien zeigten eine intakte Morphologie.

4.2.2 Energiedispersive Röntgenspektroskopie

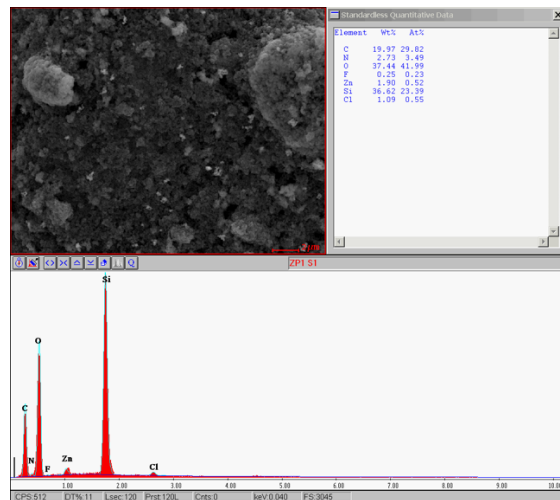
Die energiedispersive Röntgenspektroskopie ermöglichte morphologische Analysen und repräsentative Elementaranalysen. Genutzt wurde sie für die Identifizierung von Zahnpastarückständen und Biofilmbestandteilen sowie für die Analyse von Oberflächenveränderungen an Prüfkörpern. Ergebnisse der EDX-Messungen werden im Folgenden beispielhaft vorgestellt. Es erfolgte eine EDX-Untersuchung der Zahnpasten ([Abb. 14](#)), eine des nur mit Wasser behandelten Biofilms ([Abb. 15](#)) sowie des mit den experimentellen Zahnpasten umspülten Biofilms ([Abb. 16](#)). In [Tabelle 4](#) wurde über die Summenformel von humanem Zahnschmelz die vorhandenen Elemente quantifiziert.

Tabelle 4: Elementaranalyse von $\text{Ca}_9(\text{Na})_1(\text{PO})_{45}(\text{CO})_3(\text{OH})_1(\text{F})$

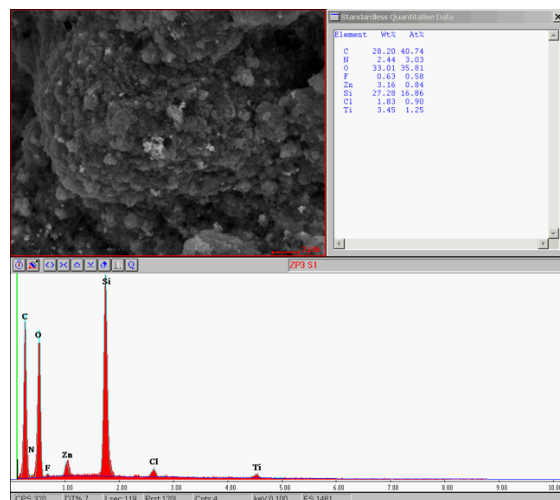
Element	Symbol	Wt%
Calcium	Ca	13,78
Natrium	Na	0,087
Fluoride	F	0,072
Sauerstoff	O	29,95
Wasserstoff	H	0,038
Kohlenstoff	C	1,377
Phosphor	P	53,24

Mittels Summenformel ermittelte Elemente in Gewichtsprozenten [Wt%] von Schmelz. Bei der Summenformel handelt es sich um humanen Schmelz. Calcium, Sauerstoff und Phosphor lagen zweistellig vor, während Wasserstoff, Fluoride und Natrium unter der EDX-Nachweisgrenze von 0,1 Gew.% lagen.

a) Basispaste



b) Fluoridpaste



c) Zink-Kurkuma-Paste

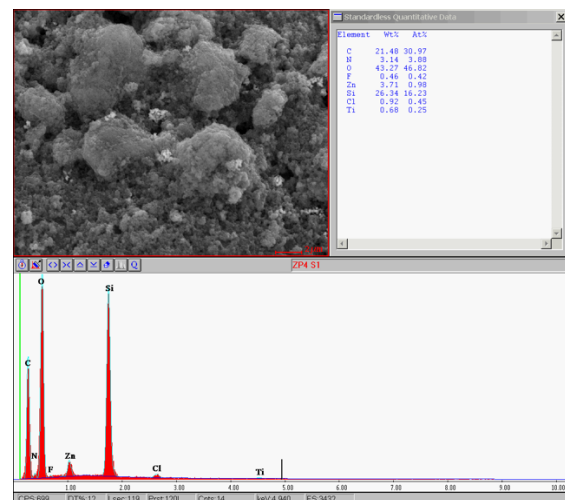


Abbildung 14: Elementaranalyse der experimentellen Pasten: B-P, F-P und ZK-P. Mittels EDX wurde die Elementzusammensetzung einer Probenoberfläche bestimmt. Diese Auswertung lieferte sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Analyse der in der Probe enthaltenen Elemente. Sie wurde verwendet, um die vorhandenen Elemente der Inhaltsstoffe zu bestimmen. Der Massenanteil in Gewichtsprozent [Wt %] beschrieb den relativen Anteil eines Elements an der Gesamtmasse. Dargestellt ist die Elementanalyse der Basispaste (a), der Fluoridpaste (b) und der Zink-Kurkuma-Paste (c). Nachgewiesen werden konnten die Elemente Kohlenstoff, Natrium, Sauerstoff, Fluorid, Zink, Silizium und Chlor. Die Fluoridpaste und Zink-Kurkuma-Paste wiesen zusätzlich Titan auf. Der Fluoridgehalt war in der Fluoridpaste (b) mit 0,63 Gew.% am höchsten. Zink war in der Zink-Kurkuma-Paste mit 3,71 Gew.% vertreten. Den Hauptanteil an Gew.% nahm bei allen drei Pasten Sauerstoff ein mit 33-43 Gew.%, gefolgt von Silizium als Putzkörperbestandteil mit 26,3-36 Gew.%.

a) Kontrolle

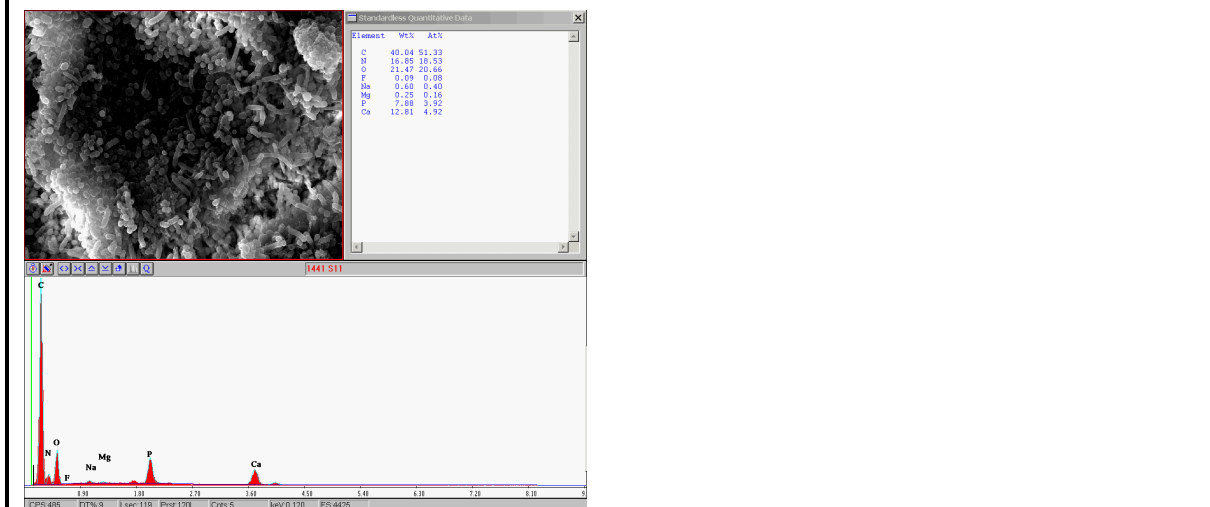
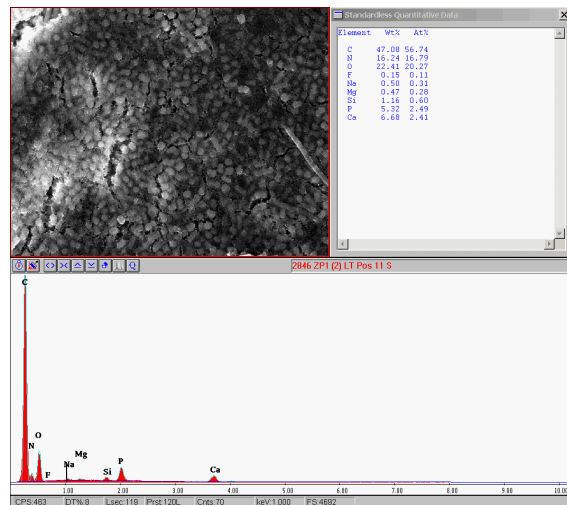
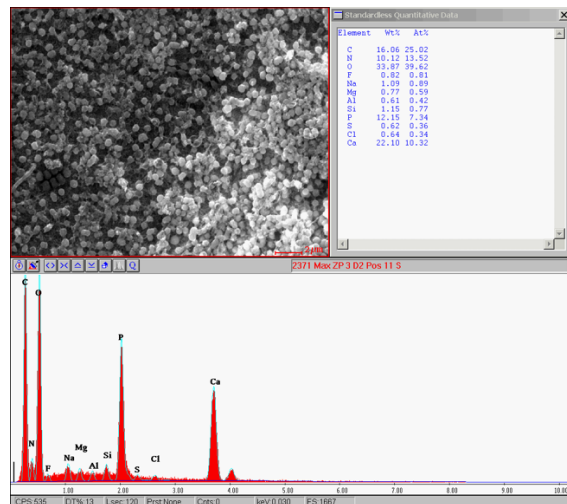


Abbildung 15: EDX-Aufnahmen eines Schmelzprüfkörpers zum Zeitpunkt 47,5 h nach Umspülen mit Wasser. Für die meisten Elemente mit einer Ordnungszahl > 10 liegt die Nachweisgrenze bei 0,1 Gew.%. Mittels dieser Untersuchung ließ sich ein nahezu ungestörter Biofilm analysieren. Es zeigten sich ein hoher Peak von Kohlenstoff, mittlere Peaks von Sauerstoff, Phosphor und Calcium sowie niedrige Peaks von Magnesium, Natrium, Stickstoff und Fluorid.

a) Basispaste



b) Fluoridpaste



c) Zink-Kurkuma-Paste

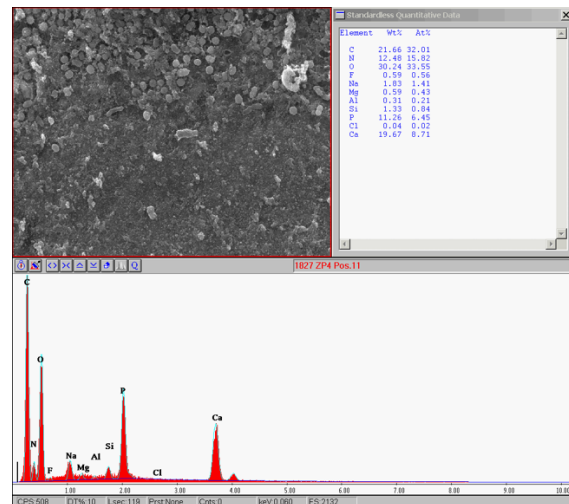


Abbildung 16: EDX- Aufnahmen eines Biofilms auf einem Schmelzprüfkörper nach 47,5 h. Das letzte Umspülen fand zum Zeitpunkt 36 h statt. Schmelzprüfkörper die mit **b) Fluoridpaste** oder **c) Zink-Kurkuma-Paste** umspült wurden wiesen mineralische Auflagerungen auf. Diese zeigen sich als hohe Peaks von Calcium und Phosphor. Außerdem sind Zahnpastarückstände in Form von Silizium- und Aluminiumpeaks 11,5 h nach dem letzten Umspülen im Biofilm nachweisbar.

4.2.2.1 Gegenüberstellung der Gewichtsprozente

In [Tabelle 5](#) wurden die stichprobenartig ermittelten Gewichtsprozente der verschiedenen Durchläufe verglichen. Die Calcium-, Phosphor-, Magnesium- sowie Fluoridwerte waren in den mit mikrobiellem Biofilm besiedelten und mit Fluoridpaste und Zink-Kurkuma-Paste umspülten Prüfkörpern erhöht. Silizium wurde als Putzkörperückstand nachgewiesen.

Tabelle 5 Gegenüberstellung der in verschiedenen Analysen nachgewiesenen Elemente in [Wt%]

Element		Wt%							
		<u>Schmelz</u>	<u>Zahnpastaausstriche</u>			<u>47,5 h Biofilmbildung, umspülte Prüfkörper</u>			
			B-P	F-P	ZK-P	Wasser	B-P	F-P	ZK-P
Calcium	Ca	13,78				12,81	6,68	22,10	19,67
Phosphor	P	53,24				7,88	5,32	12,15	11,26
Fluoride	F	0,072	0,25	0,63	0,46	0,09	0,15	0,82	0,59
Magne- sium	Mg					0,25	0,47	0,77	0,59
Silizium	Si		1,09	27,28	26,34		1,16	1,15	1,33

Betrachtet wurden die erhobenen Werte von den Elementen Ca, P, F, Mg und Si in Gewichtsprozent [Wt%]. Die Werte von Schmelz wurden durch die Summenformel ermittelt, Zahnpastaausstriche wurden mittels EDX untersucht. Der untersuchte Prüfkörper wurde nach 30 min, 12 h, 24 h und 36 h für 30 s mit der jeweiligen Paste oder Wasser gespült, aber nicht geputzt. Die Auswertung erfolgte mittels EDX. Die Calciumwerte zeigten sich bei der Fluoridpaste und Zink-Kurkuma-Paste erhöht, Phosphor ist im Vergleich zum Kontrolldurchgang mit Wasser und der Basispaste ebenfalls vertreten. Als Putzkörperückstand konnte Silizium im 47,5 h altem Biofilm nachgewiesen werden, das letzte Umspülen erfolgte 11,5 h vor Entnahme des bovinen Schmelzprüfkörpers.

4.2.3 Mapping Zahnpasten

In Verbindung mit einem Rasterelektronenmikroskop ermöglicht das Mapping die Visualisierung und Analyse der räumlichen Verteilung bestimmter Elemente auf der Oberfläche einer Probe. Hierdurch ist es möglich, detaillierte Einblicke in die Struktur und Zusammensetzung von Materialien auf mikroskopischer Ebene zu erhalten. Eine Mapping-Untersuchung der Zahnpasten erfolgte, um die Inhaltsstoffe nachzuweisen und mit den Ergebnissen der Elementaranalyse abzugleichen. Hierbei konnte Kohlenstoff, Chlorid, Natrium, Stickstoff, Sauerstoff, Silizium und Titan dargestellt werden, wobei Silizium sich als kugelförmiger Partikel zeigte.

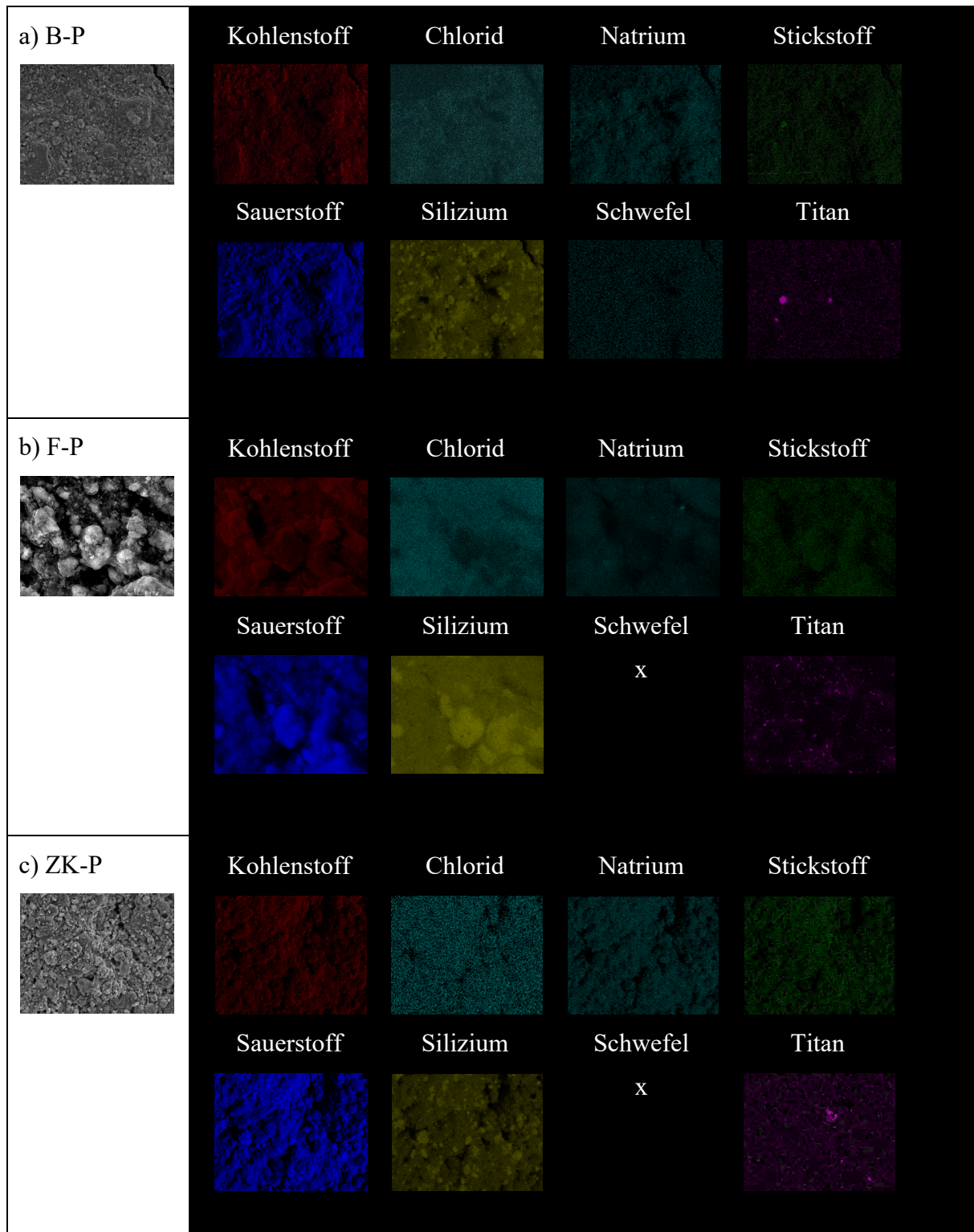


Abbildung 17: Mapping Aufnahmen der drei verwendeten experimentellen Zahnpasten. Jedem Element wurde eine Farbe zugeordnet. Die Aussagekraft entstand durch den Vergleich mit dem Elektronenbild. **a)** Innerhalb der Basispaste (B-P) zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung von Kohlenstoff (rot), Chlorid (türkis), Natrium (hell türkis), Stickstoff (grün), Sauerstoff (blau), Schwefel (schwach türkis). Silizium (gelb) und Titan (pink) zeigten sich unregelmäßig verteilt. **b)** Die Fluoridpaste (F-P) zeigte eine gleichmäßige Verteilung von Chlorid (türkis), Natrium (hell türkis) und Stickstoff (grün). Titan (pink), Kohlenstoff (rot), Sauerstoff (blau) und Silizium (gelb) zeigten sich nicht gleichmäßig verteilt. Schwefel ist nicht nachweisbar. **c)** In der Aufnahme der Zink-Kurkuma-Paste (ZK-P) stellten sich Kohlenstoff (rot), Chlorid (türkis), Natrium (hell türkis), Stickstoff (grün) und Sauerstoff (blau) gleichmäßig verteilt dar. Silizium (gelb) und Titan (pink) waren unregelmäßig verteilt. Schwefel konnte in der Zink-Kurkuma-Paste nicht nachgewiesen werden.

5 Diskussion

5.1 Probanden

Die Versuchspersonen waren Studierende der Zahnmedizin mit gutem Mundhygienestatus. Diese Gruppe repräsentiert einen Biofilmphänotyp, der sich von Patienten mit oralen Erkrankungen differenzieren kann (Takahashi & Nyvad, 2008). Inwieweit sich diese Phänotypen in ihrer Resistenz gegenüber antibakteriellen Substanzen unterscheiden, ist noch unklar. Der dentale Biofilm stellt einen wesentlichen Faktor bei der Ätiologie von Karies und Gingivitis dar, da eine Reduktion des Biofilms mit einer Reduktion der Karies- und Gingivitisinzidenz einhergeht (Löe, 2000).

Die Anzahl der Probanden wurde anhand von Vergleichsstudien mit vergleichbarer Methodik festgelegt (Arweiler *et al.*, 2021; Giertsen *et al.*, 2000; C. Hannig *et al.*, 2008; Martínez-Hernández *et al.*, 2020; Tawakoli *et al.*, 2012; Zaura & Cate, 2003). Die Durchführung von *In-situ*-Untersuchungen zur Analyse von intraoral gebildeten Biofilmen oder Pellikeln ist zeitintensiv. Dies gilt sowohl für die Probenvorbereitung und -analyse durch die Wissenschaftler als auch für die Bereitschaft der Probanden. So mussten die Studienteilnehmer im Rahmen dieser Dissertation acht Mal für einen Zeitraum von jeweils 48 h Kunststoffsschienen tragen und während dieser Zeit ihre gewohnte Mundhygiene modifizieren. Daher war nicht nur die Ausdauer, sondern auch die Verlässlichkeit der Probanden von entscheidender Bedeutung. Die Rekrutierung von Studienteilnehmern für eine solche Studie ist eine Herausforderung. Deshalb wurden Studierende, die ebenfalls wissenschaftlich arbeiteten, als Probanden rekrutiert.

5.2 Prüfkörper

Eine Anforderung für Proben einer *In-situ*-Studie ist eine homogene und standardisierte Herstellung. Da menschliche Zähne aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit und der Qualitätsunterschiede wegen Infektionsanfälligkeit und ihrer variablen chemischen und physikalischen Eigenschaften weniger geeignet sind, wurden in dieser Studie bovine Schmelzproben als Prüfkörper verwendet (Hannig *et al.*, 2007). Bovine Proben stellen trotz einiger Unterschiede, wie z.B. größere Schmelzkristalle, eine geeignete Alternative dar. Untersuchungen zeigen eine nahezu identische chemische Zusammensetzung von bovinem und humanem Zahnmaterial, was die Praktikabilität von Untersuchungen an bovinen Proben unterstreicht (Esser *et al.*, 1998).

Die Befestigung der bovinen Proben erfolgte an der bukkalen Seite der Tiefziehschienen (Nakamichi *et al.*, 1983; Hannig *et al.*, 2005; Hannig *et al.*, 2007). Diese Lokalisation wurde gewählt, da der Proband so beim Sprechen weniger eingeschränkt und die Aspirationsgefahr bei Ablösung reduziert war. Außerdem konnte die Störung des Biofilms durch mechanische Kräfte wie der Zunge reduziert werden.

5.3 Studiendesign

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden *In-situ*-Untersuchungen durchgeführt. Im Vergleich zu *In-vitro*-Untersuchungen weist die vorliegende *In-situ*-Studie eine gesteigerte klinische Aussagekraft auf. *In-vitro*-Studien werden oft an planktischen Bakterien sowie Monokulturen realisiert, wobei die antibakterielle Substanz in der Regel über einen längeren Zeitraum appliziert wird, als dies in der Klinik üblich ist. Im Gegensatz dazu bildet sich in der Mundhöhle ein komplexer Biofilm aus einer Vielzahl von Mikroorganismen. Dieser ist widerstandsfähiger gegen antibakterielle Substanzen als Planktonbakterien. Zusätzliche Faktoren wie Speichel und Gewebekontakt kommen intraoral hinzu. Folglich kann die Gültigkeit der Resultate einer *In-vitro*-Studie nicht mit Sicherheit durch eine *In-situ*- oder *In-vivo*-Studie nachgewiesen werden. Dennoch können sie für eine präklinische Testung potenzieller Substanzen eingesetzt werden (Guggenheim *et al.*, 2001; West *et al.*, 2011).

Die vorliegende Studie wurde als Crossover-Design konzipiert. Im Rahmen dieser Studie wurden alle Probanden und Probandinnen mit sämtlichen Substanzen konfrontiert, wobei sie gleichzeitig als ihre eigene Kontrollgruppe fungierten. Die Realisierung der vorliegenden Studie war nur unter Berücksichtigung einer wesentlichen Voraussetzung möglich, der Auswaschphase. Es war von essenzieller Bedeutung, dass die Auswaschphase eine hinlängliche Länge aufwies, damit keine Nachwirkungen im Folgeversuch zu beobachten waren (Wellek & Blettner, 2012). Über die Dauer der Auswaschphase gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Zur Bestimmung der Auswaschphase wird CHX herangezogen, da es als Goldstandard die höchste Substantivität aufweist. CHX verbleibt nach einmaligem Spülen in der Mundschleimhaut und kann die Keimzahl im Speichel bis zu 12 h reduzieren (Mathur *et al.*, 2011). Die Besiedlung der Zahnoberfläche mit Bakterien erfolgt nach 24 h nach dem üblichen Muster (Schiøtt *et al.*, 1970). Aus diesem Grund wurde zwischen den einzelnen Versuchen eine Auswaschphase von mindestens einem ganzen Tag eingehalten. Aus mehreren Gründen wurde die Tragedauer von 48 h gewählt. Eine Tragedauer von nur 24 h erwies sich in Vorversuchen als ungünstig, da nicht genügend Biofilm gebildet wurde, um die Vitalität zu beurteilen und die Bedeckung der

Prüfkörper zu quantifizieren. 48 h alter Biofilm zeigte in anderen Studien eine relativ reife Struktur, die ein räumlich komplexes Kanalsystem entwickelt hat, wie es in natürlichen lebenden Biofilmen zu finden ist (Costerton *et al.*, 1995; Gu *et al.*, 2012). Es wurden fünf Spülungen innerhalb von 48 h durchgeführt. Da der zeitliche Abstand zwischen zwei Entnahmepunkten entweder 30 min oder 11,5 h zum letzten Umspülen betrug, konnte eine Aussage sowohl über den Soforteffekt als auch über den Langzeiteffekt getroffen werden. Gerade die Persistenz der Wirkung ist eine Anforderung an Wirkstoffe in Zahnpasten. Sie ist abhängig von der Verweildauer der Substanz in der Mundhöhle (Brading & Marsh, 2003; Elworthy *et al.*, 1996). Von Interesse ist außerdem, welcher Effekt auf die Additive zurückzuführen ist und welcher auf klassische Zahnpastabestandteile wie Bindemittel, Lösungsmittel, Tenside oder Putzkörper. Dies war durch die Negativkontrolle mit Wasser und die Verwendung der Basispaste möglich.

Die Mundhygiene mit Zahnpasta oder anderen Mundspüllösungen war den Probanden während der Untersuchungen nicht erlaubt. Die temporäre Lagerung der Schiene außerhalb des Mundes in einer Kammer mit feuchter Atmosphäre war lediglich zum Essen und zum Zähneputzen mit Wasser gestattet. Auf diese Weise kann sich der Biofilm, der sich *in situ* bildet, von dem physiologischen Biofilm in dem Sinne unterscheiden, dass er nicht durch den mechanischen Einfluss der festen Nahrung gestört wird. Eine kontinuierliche Überwachung der Probanden während der zwei Tage des Experiments war nicht möglich. Deshalb muss bei der Evaluierung der Resultate auch die Compliance der Probanden berücksichtigt werden (West *et al.*, 2011).

5.4 Diskussion der Auswertungsverfahren

Verschiedene Methoden können eingesetzt werden, um einzelne adhärente Bakterien oder Bakterienagglomerate auf der Prüfkörperoberfläche nachzuweisen und sichtbar zu machen. Die Lichtmikroskopie oder die konfokale Laserscanmikroskopie dienen nach geeigneter Färbung der Darstellung lebender und toter Mikroorganismen (Hannig *et al.*, 2007). Rasterelektronenmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie bieten sich für die morphologische Beschreibung des Biofilms an. Diese Verfahren ermöglichen detaillierte Aufnahmen bis zu 200.000-facher Vergrößerung, haben aber den Nachteil einer aufwändigen Fixierung und anschließenden Einbettung (Hannig, 1999; Nyvad & Fejerskov, 1987). Die selektive Kultivierung von Bakterienarten ermöglicht lediglich die Erfassung eines Teils des Spektrums der im Zahnbiofilm vorhandenen Mikroorganismen. Es besteht ein Bedarf an einfachen, direkt anwendbaren Verfahren zur unmittelbaren Darstellung von Bakterien, wobei eine Entfernung der Bakterien aus dem natürlichen Umfeld vermeidbar sein sollte (Hannig *et al.*, 2007).

5.4.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Frage der Quantifizierung von Bakterien, die Biofilme besiedeln, wird kontrovers diskutiert. In der Vergangenheit wurden Methoden wie Transemissionselektronenmikroskopie, Plattenkulturtechniken und Lichtmikroskopie untersucht und eingesetzt. Die elektronenmikroskopische Quantifizierung von Bakterien ist aufgrund der aufwendigen Fixierungs- und Einbettungsverfahren zur Visualisierung des mikrobiellen Biofilms mit einem hohen Aufwand verbunden (C. Hannig & Hannig, 2009). Die Methode, Bakterienzellen mit Fluoreszenzfarbstoffen anzufärben und mikroskopisch darzustellen, wurde bereits 1983 von Netuschil angewendet. Als Farbstoffe wurden Ethidiumbromid und Fluoreszindiaceat verwendet (Netuschil *et al.*, 1998). Ethidiumbromid ist für die Quantifizierung weniger geeignet, da es mutagen, toxisch und instabil ist. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Vitalität der Bakterien nach einer Färbung mit Ethidiumbromid sehr schnell abnimmt (Tawakoli *et al.*, 2012). Als Alternative kann die Live-Dead-Färbemethode in Erwägung gezogen werden. Im Rahmen dieser Methode erfolgt eine Anfärbung der Bakterien, wobei die emittierte Lichtfarbe von der Vitalität der Bakterien abhängig ist. Dabei wird für lebensfähige Bakterien grünes Licht und für avitale Bakterien rotes Licht emittiert. Die Färbung erlaubt eine Differenzierung. Dies ermöglicht beispielsweise bei der Messung antimikrobieller Substanzen einen Vergleich der Reaktion des Biofilms mit dessen natürlichem Verhalten. Des Weiteren ist eine Differenzierung zwischen antiadhäsiven und antibakteriellen Präparaten möglich. Die Live-Dead-Methode basiert auf der Anwendung zweier unterschiedlicher Prinzipien der Penetration des bakteriellen Mikroorganismus. Einerseits erfolgt die Einbringung des Farbstoffes in die aktive Zelle über den Stoffwechsel, andererseits spielt die Permeabilität der bakteriellen Zellwand eine Rolle (Biazevic *et al.*, 2008; C. Hannig & Hannig, 2009; Tawakoli *et al.*, 2012).

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde der Farbstoff SYTO 9 verwendet, welcher durch die Membran diffundiert und eine Bindung mit den Nukleinsäuren eingeht. Die Bindung stellt sich grün fluoreszierend dar. Sowohl Zellen mit intakter Membran als auch Zellen mit beschädigter Membran werden von SYTO 9 angefärbt. Ein zweiter Farbstoff, Propidiumiodid, kann nur in geschädigte Zellen diffundieren und stellt sich rot fluoresziert dar. Aufgrund der höheren Affinität von Propidiumiodid zu Desoxyribonukleinsäuresequenzen werden avitale Zellen rot und intakte Bakterien grün angefärbt (Chung *et al.*, 1993). Aufgrund ihrer Konzentrationsabhängigkeit und ihrer unzureichenden Anwendbarkeit für multispezifische Biofilmmodelle werden diese Färbemethoden von Neuschil *et al.* (1998) kritisiert. Des Weiteren ist ein Vitalitätsverlust der grünen Zellen durch zu lange Belichtungszeiten im Mikroskop möglich. Wie die

Bakterien mit den Farbstoffen interagieren und wie sie die Vitalität der Bakterienzelle beeinflussen, muss differenziert untersucht werden, um zwischen den angefärbten Zellen und dem tatsächlichen Zustand des Biofilms zu differenzieren. Ein weiterer positiver Aspekt der Fluoreszenzmikroskopie ist, dass der Biofilm angefärbt werden kann, ohne ihn von der Trägeroberfläche zu lösen. Das Lösen des Biofilms, z.B. bei der Plattenkultivierungsmethode, kann zu Abweichungen zwischen verschiedenen Messmethoden führen (C. Hannig & Hannig, 2009; Tawakoli *et al.*, 2012).

5.4.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie stellt ein geeignetes Verfahren zur Untersuchung der ultrastrukturellen Morphologie des Biofilms dar. Weitere Methoden sind die Transmissionselektronenmikroskopie oder die Rasterkraftmikroskopie. Mehrere Untersuchungen oraler Biofilme wurden bereits mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie durchgeführt (C. Hannig *et al.*, 2009; Kour *et al.*, 2019; Wood *et al.*, 2000). Die aufwendige Präparation der Proben für die elektronenmikroskopische Untersuchung ermöglicht eine ergänzende Beschreibung der statistisch analysierten Fluoreszenzmikroskopie-Bilder durch REM-Bilder. Sowohl Übersichtsbilder als auch einzelne Bakterienzellen können mit Vergrößerungen von 500-fach bis 20.000-fach bis zu in den Mikrometerbereich dargestellt werden. Die fluoreszenzbasierte Untersuchung eignet sich zur Quantifizierung von lebenden und toten Bakterien, während die Rasterelektronenmikroskopie Oberflächenstrukturen detaillierter beschreiben kann. Außerdem lassen sich Artefakte besser als solche erkennen, wenn beide Methoden verwendet werden (Surman *et al.*, 1996). Die Qualität der Aufnahme spielt eine entscheidende Rolle bei der Interpretation rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen. Die Darstellung der Bilder ist grau. Wegen dieser Graustufen sind sowohl Auflösung als auch Kontrast wichtig (Bergmans *et al.*, 2005).

Die EDX-Analyse wurde durchgeführt, um die in der Oberflächenschicht vorhandenen Elemente nachzuweisen. Ziel der EDX-Analyse war der Nachweis, dass nach aufeinanderfolgendem Auftragen verschiedener Zahnpasten die Inhaltsstoffe tatsächlich als Niederschlag nachweisbar ist. Darüber hinaus sollten mögliche Veränderungen durch Zahnpasta-Inhaltsstoffe aufgezeigt werden. Ein Wirkmechanismus der antikariösen Wirkung der topischen Fluoridierung ist die Ausfällung von Calciumfluorid (Scholz *et al.*, 2019). Der Calciumgehalt von Rinderzähnen zu menschlichen Zähnen ist ähnlich (Davidson *et al.*, 1973), während der Fluoridgehalt in bovinen Zähnen geringer ist (Laurance-Young *et al.*, 2011). In einer Studie von Rodemer *et al.*, aus dem Jahr 2022 wurde eine ähnliche Analyse gewählt. Auch hier war eine Anreicherung von Fluorid in der Elementaranalyse nachweisbar (Rodemer *et al.*, 2022). In der Studie von Scholz

et al. (2019) wurde herausgearbeitet, dass die Pellikel die Fluoridausfällung reduziert. Eine Mineralausfällung von Calcium, Phosphor und Magnesium wurde nachgewiesen. Dies ist auch in dieser Studie bei den Durchgängen der Prüfkörper mit einem 47,5 h besiedeltem Biofilm der Fall. Die Mineralausfällung ist im Vergleich zu den mit Wasser gespülten Prüfkörper größer, was durch die Konzentration an Fluorid in den Pasten erklärt werden könnte. Dass auch bei dem Durchgang mit Wasser Mineralausfällung stattfindet, verdeutlicht die Pufferkapazität des Speichels. Es konnten Zahnpastabestandteile wie Silizium und Aluminium in den umspülten Biofilmen gefunden werden, somit kann eine Substantivität dieser Bestandteile vermutet werden. Schwefel weist auf den stattfindenden Stoffwechsel hin. Die Analyse erfolgte stichprobenartig und lediglich deskriptiv. Außerdem ist nicht klar, wie die jeweiligen Elemente gebunden sind. Unterschiede in den stichprobenartigen EDX-Analysen können durch die probandenabhängigen pH-Wert Unterschiede erklärt werden. Außerdem unterscheidet sich die Einstellung des Analyse Tools welche Elemente ausgewählt wurden, je nachdem welcher Peak ausgewählt wurde. Somit ist die Anzahl der untersuchten Elemente nicht in jeder Probe einheitlich.

5.4.3 Quantifizierung durch Scoring

Zur systematischen Erfassung der Biofilmbedeckung auf Schmelzoberflächen wurde bereits in früheren Untersuchungen ein Scoring-System eingesetzt (Rupf *et al.*, 2012). Die Erfassung sowohl dünn als auch mehrschichtig bedeckter Prüfkörper ist eine Anforderung an das Scoring-System.

Bei der Beurteilung der Vitalität ist das Beurteilungsverfahren nach Score-Werten insbesondere bei geringer Keimbesiedlung, wie sie bei mechanisch gereinigten Prüfkörpern auftritt, eingeschränkt. Es sei darauf hingewiesen, dass die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen Ausschnitte darstellen, sodass die Auswahl eines Teilbereichs möglich ist, der ein einzelnes, beispielsweise rot fluoreszierendes Bakterium darstellt. In diesem Fall wäre der Scoring-Wert eins. Im Gegensatz dazu wäre der Scoring-Wert für ein einzelnes grünes Bakterium fünf. Daraus wird ersichtlich, dass das Scoring-System hinsichtlich der Auswertung der Vitalität vor allem für Oberflächen aussagekräftig ist, die von einem mikrobiellen Biofilm bedeckt sind. In diesem Fall ist der betreffende Bildausschnitt aufgrund der Menge an Bakterien geringeren Schwankungen unterworfen. Bei stark besiedelten Prüfkörpern ist das Scoring-System als Referenz wichtig, da es sich an den Entwicklungsstadien des Biofilms orientiert. Da zwischen tiefem, mehrschichtigem und etabliertem Biofilm vs. vereinzelt vorliegender Bakterien differenziert wird, kann der Biofilm in seiner Gesamtstruktur bewertet werden (Rupf *et al.*, 2012).

5.4.4 Quantifizierung durch das Bildverarbeitungsprogramm ImageJ

Zur Auswertung der Fluoreszenzmikroskopbilder wurde die Software ImageJ verwendet. Entwickelt wurde diese frei verfügbare Software 1987 von Rasband. Sie ist eines der populärsten wissenschaftlichen Programme, um Bilddateien zu analysieren (Schneider *et al.*, 2012). Für die manuelle Auswahl der Bakterien und die Berechnung der Anzahl und Helligkeit der Pixel wurde diese Software verwendet. Zur Bestimmung der Bedeckung wurde die Pixelanzahl der ausgewählten Bakterien in den Farbbildern gemessen. Zur Quantifizierung der Vitalität wurden die grauen Bilder des roten und grünen Filters getrennt berechnet. Berücksichtigt wurde neben der Pixelanzahl auch die Leuchtkraft der Pixel. Infolgedessen erhalten überlagerte Bakterien aufgrund ihrer höheren Leuchtkraft einen höheren Wert. Auf diese Weise ist eine genauere Bestimmung der Vitalität eines komplexen Biofilms möglich. Allerdings kann dies auch zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen, insbesondere wenn die Biofilmdicke heterogen ist und das dargestellte Areal sowohl dicht besiedelte als auch aus schwach besiedelte Bereiche enthält. In Abhängigkeit von der Menge des vorliegenden Biofilms erfolgt eine Anpassung der Expositionszeit. Sie ist kürzer, wenn eine große Bedeckung und ein dicker Biofilm vorhanden sind, als wenn eine geringe Bedeckung und ein dünner Biofilm vorhanden sind. Wenn in einem Bild dicke und dünne Biofilme nebeneinander vorhanden sind, wird die Belichtungszeit an die dicken Bereiche angepasst. Dadurch wird vermieden, dass die Bakterien aufgehellt werden und sich auf dem Bild zu einem hellen Bereich zusammenschließen. Dies führt jedoch dazu, dass Bakterien in dünnen Bereichen weniger Belichtungszeit erhalten. Dadurch werden sie weniger hell dargestellt und erhalten bei der Auswertung fälschlicherweise niedrigere Werte. Außerdem ist nicht die Anzahl der Bakterien Gegenstand der Berechnung, sondern die Anzahl der Pixel. Dies hat zur Folge, dass unterschiedlich große Bakterien unterschiedliche Messwerte erhalten. Besonders beim Vergleich von Kokken und Stäbchen wird diese Diskrepanz deutlich. Teilweise sind die rot emittierenden Bakterien auch größer und suggerieren so höhere Avitalität. Außerdem ist die Deutung der Vitalitätswerte bei geringer Biofilmbedeckung eingeschränkt. Bei einer Besiedlung des Prüfkörpers mit nur wenigen Bakterien beeinflusst der Vitalitätswert einzelner Bakterien das Ergebnis stärker als bei einer größeren, repräsentativen Menge. Zusätzlich können Oberflächenstrukturen der Prüfkörper die Auswertung beeinflussen. Für Dentin wäre die Quantifizierung einer Biofilmbedeckung aufgrund der Eigenfluoreszenz der Dentintubuli stark erschwert. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Analyse mit dem Scoring-System subjektiver ist als die Analyse mit ImageJ, die Auswertung mit ImageJ jedoch die oben

genannten Schwächen aufweist. Mit anderen Techniken wie der Durchflusszytometrie hätten diese vermieden werden können (Gasol & Del Giorgio, 2000).

5.5 Diskussion der Ergebnisse - Einfluss der Zahnpasten

Die Ausbildung des Biofilms unterschied sich zwischen den Probanden unabhängig von der verwendeten Zahnpasta. Ursache hierfür können die Ernährungsweise, die Speichelmenge und das individuelle Mikrobiom der Probanden sein.

Nach 48 h *in situ* wurden im Biofilm überwiegend kokkenförmige Bakterien identifiziert. Ein Biofilm ähnlich der supragingivalen Plaque ist bei Platzierung der Prüfkörper im Molarenbereich zu erwarten.

Die *In-situ*-Studie bestätigt, dass die Anreicherung von Zahnpasten mit antibakteriell wirksamen Substanzen eine unterstützende Maßnahme im Konzept des Biofilmmanagements darstellen kann. Die bei der Anwendung der Pasten beobachtete Reduktion der Bakterienzahl bestätigt die Eignung chemischer Mittel als Ergänzung zur mechanischen Zahnreinigung bei Patienten mit verminderter Compliance (Martínez-Hernández *et al.*, 2020; Cate & Marsh, 1994).

5.5.1 Kontrollversuch mit Wasser und Basispaste

Eine bereits in vorangegangenen Untersuchungen bewährte Methode um den Effekt von Wirkstoffen darzustellen ist die negative Kontrolle mit Wasser (Martínez-Hernández *et al.*, 2020). Wie auch in vergleichbaren Studien waren auch auf ungestörtem Biofilm tote Bakterien zu finden (Arweiler *et al.*, 2004; C. Hannig *et al.*, 2007; Netuschil *et al.*, 1998). Die Vitalität der Gesamtbiomasse lag bei den verschiedenen Probanden durchschnittlich bei 77% was darauf hindeutet, dass die Handhabung der Biofilmproben *ex vivo* keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen hatte und dass abgestorbene und geschädigte Zellen einen geringen Anteil der Biofilme *in vivo* ausmachen. In einer Studie von Rabe *et al.* aus dem Jahr 2015 mit Schmelzplättchen auf Implantat Abudments zeigte sich nach 7 Tagen Tragedauer eine Biofilm-Vitalität von 71-98% (Rabe *et al.*, 2015). Dies deckt sich mit den vorliegenden Daten des Kontrolldurchganges. Die Prüfkörper wiesen überwiegend große Bakterienagglomerate und mehrschichtig organisierte Biofilme auf. Eine vollständige Biofilmbedeckung war bei den mit Wasser gespülten Prüfkörpern häufig. Die mittels Fluoreszenzmikroskopie gewonnenen Erkenntnisse wurden durch die Rasterelektronenmikroskopie bestätigt. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass interindividuelle Unterschiede einer Verallgemeinerung der Ergebnisse entgegenstehen. Die Basispaste ermöglichte eine Untersuchung der Wirkung von regulär vorkommenden Zahnpasta-

Bestandteilen wie Siliziumdioxid im Vergleich zu Wasser. Außerdem ließ sich so die Wirkung von Fluorid und Zink-Kurkuma zu den Zahnpasta-Bestandteilen differenzieren. Es kann angenommen werden, dass ein höherer Anteil an Siliziumdioxid-Putzkörpern eine Intensivierung der mechanischen Oberflächenreinigung zur Folge hat. In einer Studie von Fischer *et al.* (2022) konnte gezeigt werden, dass die Partikelgröße der Putzkörper einen Einfluss auf die Wirkung der Inhaltsstoffe (in der Studie: Natriumfluorid und Zinnfluorid) hat. Auch in dieser Studie reduzierte bereits die Basispaste die Biofilmvitalität im Vergleich zu Wasser signifikant.

5.5.2 Versuch mit Fluoridpaste

Der Nutzen der Verwendung fluoridhaltiger Zahnpasta im Vergleich zu nicht fluoridhaltiger Zahnpasta für die Kariesprävention ist gut belegt. In den meisten Studien ist das primäre Ergebnis jedoch das Kariesinkrement, gemessen als Veränderung der kariösen (fehlenden) und gefüllten Flächen oder des Zahnindexes aller bleibenden oder primären Zähne (D(M)FS/T oder D(M)fs/t) im Vergleich zum Ausgangswert (Walsh *et al.*, 2019). Die Hauptwirkung von Fluorid besteht darin, dass es die Demineralisierung verringert und die Remineralisierung früher kariöser Läsionen fördert. Die Wirkung auf die biologischen Aktivitäten kariogener Streptokokken wird ebenfalls angenommen (Koo, 2008). Es gibt eine Fülle von Belegen dafür, dass Fluorid selbst in niedrigen Konzentrationen die Physiologie mikrobieller Zellen beeinflussen kann (Marquis *et al.*, 2003). Dies bestätigt sich auch in dieser Untersuchung, da sowohl die Biofilmbildung als auch die Biofilmvitalität durch das Umspülen mit der Fluoridpaste signifikant reduziert wurde. Die Biofilmbildung wurde auf 37% reduziert, die Biofilmvitalität auf 42%. Diese signifikante Reduktion wurde 11,5 h nach dem letzten Spülen festgestellt, was eine Retention der antibakteriellen Inhaltsstoffe in der Mundhöhle nahelegt. Ein unmittelbarer Effekt wurde ebenfalls festgestellt, da ein erneutes Spülen und Untersuchen der Vitalität nach 30 min eine Reduktion auf 35% zeigte. Dies deckt sich mit einer Studie von Arweiler *et al.*, die für Aminfluorid, Zinnchlorid sowie eine natriumfluoridhaltige Zahnpasta eine statistisch signifikante und langanhaltende antibakterielle Wirkung von mindestens 12 h nach einmaligem Spülen nachweisen konnten (Arweiler *et al.*, 2021). In dieser Studie lagen die Vitalitätswerte für Aminfluorid nach 24 h bei 60%, jedoch handelte es sich um intraoral entnommene Biofilmp Proben. In einer weiteren Studie wurden die Auswirkungen von Natriumfluorid und Chlorhexidin auf die Struktur des Plaque-Biofilms auf der Schmelzoberfläche *in vivo* verglichen. Dabei führte die Exposition von NaF und CHX zu einer ähnlichen Reduktion der Gesamtvitalität. Es zeigte sich, dass CHX vor allem auf die Oberfläche der Bakterienzellen im gesamten Biofilm wirkte, während NaF tiefer in den Biofilm eindrang und mehr tote geschädigte Bakterien in den

mittleren und unteren Schichten des Biofilms produzierte (Rabe *et al.*, 2015). In der in dieser Studie untersuchten Fluoridpaste handelt es sich um eine Kombination aus Aminfluorid und Natriumfluorid. Da die Kombination verschiedener Wirkstoffe in Zahnpasten zu einer komplexen gegenseitigen Inaktivierung der einzelnen Wirkstoffe führen kann, sollte der gesamte Zubereitungsprozess sorgfältig daraufhin überprüft werden, ob die einzelnen Wirkstoffe in der Gesamtkombination noch wirksam sind (Jenkins *et al.*, 1990).

5.5.3 Versuch mit Zink-Kurkuma-Paste

Die Wirkung von Zinklösungen auf die Reduktion der Plaque-Azidogenität und des Plaque-Wachstums wurde bereits in einigen Studien nachgewiesen. Frühere Daten deuten darauf hin, dass Zinkionen das Plaquewachstum *in vivo* reduzieren können (Saxton *et al.*, 1986; Ye & Yip, 2002). Eine Studie aus dem Jahr 2012 mit einem ähnlichen Versuchsaufbau (Glasplättchen statt boviner-Prüfkörper) untersuchte den Plaqueindex, die Biofilmdicke und die mittlere bakterielle Vitalität von Biofilmen, die mit verschiedenen Konzentrationen von Zinkchlorid behandelt wurden. In dieser Studie konnte die Vitalität des Biofilms durch eine 20 nM Zinkchlorid-Lösung auf 32% reduziert werden (Gu *et al.*, 2012). Weitere Studien bestätigen die hemmende Wirkung auf das Wachstum von anaeroben Bakterien und Streptokokken (Sreenivasan *et al.*, 2008). In einer Studie von Kang *et al.* aus dem Jahr 2015 wurde die zeitliche Wachstumskurve von sieben Bakterienstämmen unter dem Einfluss von Mundspüllösungen mit Zinkchlorid (ZnCl_2) und Cetylpyridiniumchlorid untersucht. Von den untersuchten Bakterienstämmen ist bekannt, dass sie an der Pathophysiologie periimplantärer Erkrankungen und Halitosis beteiligt sind. Im Ergebnis hemmten ZnCl_2 und Cetylpyridiniumchlorid wirksam das Wachstum von sechs der sieben Bakterienstämme. Die Wirkung war noch stärker, wenn sie in Kombination angewendet wurden. In dieser Studie wurde eine Reduktion der Biofilmvitalität auf 34% ermittelt. Zinkionen zeigen somit mögliche hemmende Effekte auf die Biofilmbildung und haben ein vielversprechendes Potenzial für den Einsatz als antibakterieller Wirkstoff in zukünftigen Zahnpasta- und Mundpflegeprodukten.

Kurkuma wurde bereits in einigen Studien hinsichtlich seiner unterstützenden Wirkung bei Scaling und Rootplaning im Rahmen der Parodontitistherapie mit Chlorhexamed verglichen. In der Metaanalyse einer Studie erreichte Kurkuma in den ausgewerteten Studien ähnliche Werte wie Chlorhexamed. Index in diesen Studien war unter anderem der Plaqueindex (Zhang *et al.*, 2021), der auf die hier untersuchte Biofilmbedeckung übertragbar ist.

5.5.4 Mechanische Reinigung

Studien konnten zeigen, dass eine effektive Reduktion des Biofilms durch Zähneputzen stattfindet (Van Der Weijden & Slot, 2015), wobei die Spanne je nach Plaque-Score-Skala zwischen 36% und 65% liegt (Rosema *et al.*, 2014). Während des Zähneputzens wird mit dem Speichel als Suspensionsmedium und der mechanischen Unterstützung durch die Zahnbürste ein Zahnpastenbrei gebildet. Die Suspension fördert nicht nur die Verteilung der Wirkstoffe in der Mundhöhle, sondern verringert auch ihre Konzentration - je verdünnter die Suspension ist, desto geringer ist ihre Konzentration. Darüber hinaus verändert der Speichel aufgrund seiner Pufferkapazität den pH-Wert der Suspension, erhöht die Temperatur und ermöglicht die Reaktion von Speichelbestandteilen (z. B. Ca, Proteine) mit Zahnpastahilfsstoffen (Lippert, 2013). Studien, die die Häufigkeit des Zähneputzens und den Wirkstoff Fluorid in der Zahnpasta als separate Variablen betrachteten, stellten fest, dass der Effekt der Art der Zahnpasta nicht signifikant war, sondern nur die Häufigkeit des Zähneputzens mit dem Auftreten kariöser Läsionen assoziiert war (Grindefjord *et al.*, 1995; Leroy *et al.* 2005; Chu *et al.*, 2011). Im Jahr 2016 wurde von Valkenburg *et al.* ein Review veröffentlicht, in dem die Effektivität des Zähneputzens mit und ohne Zahnpasta verglichen wurde. Zähneputzen mit Zahnpasta entfernte durchschnittlich 49,2% des Biofilms, Zähneputzen mit Zahnbürste allein 50,3%. Es konnte also kein signifikanter Unterschied zwischen Zähneputzen mit und ohne Zahnpasta nachgewiesen werden. Dies bestätigen auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie. Die Biofilmbedeckung auf geputzten Prüfkörpern wies durchschnittlich 0,2% auf, es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Wasser, Basispaste, Fluoridpaste oder Zink-Kurkuma-Paste. Somit konnte keine zusätzliche Hemmung der Biofilmbildung durch die Verwendung der Basispaste bei der mechanischen Reinigung im Vergleich zu Wasser festgestellt werden. Jedoch zeigt sich eine erhöhte Vitalität der wenigen verbliebenen Bakterien.

5.5.5 Unmittelbarer Effekt und Substantivität

In dieser Studie konnte sowohl der unmittelbare Effekt 30 min nach Spülung, sowie die Substantivität der Pasten 11,5 h nach dem letzten Spülen nachvollzogen werden. In einer Studie aus dem Jahr 2021 von Arweiler *et al.*, zeigten Aminfluoridhaltige, Zinnchloridhaltige, pflanzliche oder natriumfluoridhaltige Zahnpasten statistisch signifikante Antiplaque-Effekte auf den etablierten Plaque-Biofilm und eine Substantivität von bis zu 24 h im Vergleich zum Ausgangswert (Arweiler *et al.*, 2021). Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Studie. Sowohl die Fluoridpaste als auch die Zink-Kurkuma-Paste wiesen nach 11,5 h einen signifikanten Effekt auf die Biofilmbildung und die Biofilmvitalität auf. Die Vitalität der Biofilme konnte zudem

auch unmittelbar beeinflusst werden. Innerhalb von 30 min wurde die Vitalität durch die Fluoridpaste um durchschnittlich weitere sieben Prozentpunkte und durch die Zink-Kurkuma-Paste um acht Prozentpunkte reduziert. Bei der Bedeckung konnte kein unmittelbarer Effekt festgestellt werden, jedoch war der langfristige Effekt signifikant. Schon Elworthy *et al.* (1996) arbeitete heraus, dass eine sofortige Antibiofilm-Wirkung von antibakteriellen Wirkstoffen in Zahnpasten zwar wünschenswert, aber nicht unbedingt erforderlich ist, da der Biofilm bereits durch das Zähneputzen entfernt wird. Da sich jedoch Bakterien nach dem Zähneputzen erneut auf den Zähnen und am Zahnfleischrand ansammeln und einen dentalen Biofilm bilden, ist es wichtig, dass antibakterielle Wirkstoffe adsorbieren und ihre antimikrobielle Wirkung über den Zeitpunkt der Anwendung hinaus aufrechterhalten. Auf diese Weise sollen sie eine erneute Bakterienbesiedlung verhindern, Bakterien abtöten oder ihr Wachstum bis zur nächsten Zahnreinigung hemmen und den Biofilm beeinflussen, der durch Zahnbürsten oder Interdentalreinigung nicht entfernt wird. Diese Retention oder Substantivität der antimikrobiellen Substanz, die als langsame Freisetzung in den aktiven Zustand definiert wird, ist äußerst wichtig. Sie sollte in der gesamten Zahnpastaformulierung getestet werden, da Wechselwirkungen in einer komplexen Zahnpasta die Substantivität aufheben könnten.

5.6 Schlussfolgerung

Mittels Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die vorliegenden experimentellen Pasten auf Basis von Zink, Kurkuma und Fluorid sowohl antiadhäsiv als auch antibakteriell auf die 48 h Biofilmbildung auf Schmelzoberflächen wirken. Es konnte außerdem bestätigt werden, dass abrasive Zahnpastabestandteile die Biofilmvitalität reduzieren. Die Wirkstoffe wiesen in dieser Untersuchung eine Substantivität auf sowie eine unmittelbare Wirkung auf die Biofilmvitalität. Die Elementanalyse der Proben gab zwar Aufschlüsse über vorkommende Mineralausfällung und eine Substantivität der Zahnpasta-Inhaltstoffe, jedoch keinen Aufschluss über die Wechselwirkungen. Eine statistische Auswertung sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

6 Literaturverzeichnis

1. Addy, M. & Shellis, R. (2006). Interaction between Attrition, Abrasion and Erosion in Tooth Wear. In KARGER eBooks (S. 17–31). <https://doi.org/10.1159/000093348>
2. Afseth, J., Helgeland, K. & Bonesvoll, P. (1983). Retention of Cu and Zn in the oral cavity following rinsing with aqueous solutions of copper and zinc salts. *European Journal Of Oral Sciences*, 91(1), 42–45. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1983.tb00773.x>
3. Allmyr, M., Panagiotidis, G., Sparve, E., Diczfalusy, U. & Sandborgh-Englund, G. (2009). Human exposure to triclosan via toothpaste does not change CYP3A4 activity or plasma concentrations of thyroid hormones. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 105(5), 339–344. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00455.x>
4. Ammon, H. P. T. & Wahl, M. A. (1991). Pharmacology of Curcuma longa. *Planta Medica*, 57(01), 1–7. <https://doi.org/10.1055/s-2006-960004>
5. Araújo, C. L. & Leon, L. L. (2001). Biological activities of curcuma longa L. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(5), 723–728. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762001000500026>
6. Arweiler, N. B., Hellwig, E., Sculean, A., Hein, N. & Auschill, T. M. (2004). Individual vitality pattern of in situ dental biofilms at different locations in the oral cavity. *Caries Research*, 38(5), 442–447. <https://doi.org/10.1159/000079625>
7. Arweiler, N. B., Müller-Breitenkamp, F., Heumann, C., Laugisch, O. & Auschill, T. M. (2021). Antibacterial Action, Substantivity and Anti-plaque Effect of Different Toothpaste Slurries - A Randomised Controlled Trial. *PubMed*. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.b2182977>
8. Azevedo, L. R., De Lima, A. A. S., Machado, M. Â. N., Grégio, A. M. T. & Del Vigna De Almeida, P. (2008). Saliva Composition and Functions: A Comprehensive Review. *The Journal Of Contemporary Dental Practice*, 9(3), 72–80. <https://doi.org/10.5005/jcdp-9-3-72>

9. Bergmans, L., Moisiadis, P., Van Meerbeek, B., Quirynen, M. & Lambrechts, P. (2005). Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM. *International Endodontic Journal*, 38(11), 775–788. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2005.00999.x>
10. Biazevic, M. G. H., Rissotto, R. R., Michel-Crosato, E., Mendes, L. A. & Mendes, M. O. A. (2008). Relationship between oral health and its impact on quality of life among adolescents. *Brazilian Oral Research*, 22(1), 36–42. <https://doi.org/10.1590/s1806-83242008000100007>
11. Brading, M. G. & Marsh, P. (2003). The oral environment: the challenge for antimicrobials in oral care products. *International Dental Journal*, 53(6), 353–362. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595x.2003.tb00910.x>
12. Bryan, N. S., Burleigh, M. & Easton, C. (2022). The oral microbiome, nitric oxide and exercise performance. *Nitric Oxide*, 125–126, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2022.05.004>
13. Buzalaf, M. A. R., Pessan, J. P., Honório, H. M. & Cate, J. T. (2011). Mechanisms of action of fluoride for caries control. In *Monographs in oral science* (S. 97–114). <https://doi.org/10.1159/000325151>
14. Carvalho, T. S., Colon, P., Ganß, C., Huysmans, M., Lussi, A., Schlueter, N., Schmalz, G., Shellis, R., Tveit, A. B. & Wiegand, A. (2015). Consensus report of the European Federation of Conservative Dentistry: erosive tooth wear—diagnosis and management. *Clinical Oral Investigations*, 19(7), 1557–1561. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1511-7>
15. Cate, J. T. & Marsh, P. (1994). Procedures for Establishing Efficacy of Antimicrobial Agents for Chemotherapeutic Caries Prevention. *Journal Of Dental Research*, 73(3), 695–703. <https://doi.org/10.1177/00220345940730031601>
16. Chaturvedi, T. (2009). Uses of turmeric in dentistry: an update. *Indian Journal Of Dental Research*, 20(1), 107. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.49065>
17. Cho, I. & Blaser, M. J. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 260–270. <https://doi.org/10.1038/nrg3182>

18. Christianson, D. (1991). Structural Biology of Zinc. In *Advances in Protein Chemistry* (S. 281–355). [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60538-0](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60538-0)
19. Chu, C. H., Lu, H. & Lo, E. (2011). Caries increment over 2 years in preschool children: a life course approach. *International Journal Of Paediatric Dentistry*, 22(2), 77–84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-263x.2011.01159.x>
20. Chung, K., Stevens, S. E., Lin, W. & Chen, W. (1993). Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds. *Letters in Applied Microbiology*, 17(1), 29–32. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.1993.tb01428.x>
21. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lappin-Scott, H. M. (1995). MICROBIAL BIOFILMS. *Annual Review Of Microbiology*, 49(1), 711–745. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>
22. Davidson, C., Boom, G. & Arends, J. (1973). Calcium Distribution in Human and Bovine Surface Enamel. *Caries Research*, 7(4), 349–359. <https://doi.org/10.1159/000259858>
23. DenBesten, P. K. (1999). Biological mechanisms of dental fluorosis relevant to the use of fluoride supplements. *Community Dentistry And Oral Epidemiology*, 27(1), 41–47. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.1999.tb01990.x>
24. Donlan, R. M. & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193. <https://doi.org/10.1128/cmr.15.2.167-193.2002>
25. Eccles, J. (1979). Dental erosion of Nonindustrial Origin. A Clinical Survey and Classification. *Journal Of Prosthetic Dentistry*, 42(6), 649–653. [https://doi.org/10.1016/0022-3913\(79\)90196-3](https://doi.org/10.1016/0022-3913(79)90196-3)
26. Elkerbout, T. A., Slot, D. E., Rosema, N. & Van der Weijden, G. (2019). How effective is a powered toothbrush as compared to a manual toothbrush? A systematic review and meta-analysis of single brushing exercises. *International Journal Of Dental Hygiene*, 18(1), 17–26. <https://doi.org/10.1111/idh.12401>
27. Elworthy, A. J., Greenman, J., Doherty, F., Newcombe, R. G. & Addy, M. (1996). The substantivity of a number of oral hygiene products determined by the duration of effects

- on salivary bacteria. *Journal Of Periodontology*, 67(6), 572–576.
<https://doi.org/10.1902/jop.1996.67.6.572>
28. Esser, M., Marx, R. & Tinschert, J. (1998). Materialkennwerte der Zahnhartsubstanz des Rindes im Vergleich zur humanen Zahnhartsubstanz. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, 53: 713-717.
29. Fatima, T., Haji Abdul Rahim, Z. & Lin, C. (2016). Zinc: a precious trace element for oral health care? *J Pak Med Assoc*, 66(8):1019-23.
30. Featherstone, J. (1999). Prevention and reversal of dental caries: Role of low level fluoride. *Community Dentistry And Oral Epidemiology*, 27(1), 31–40.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.1999.tb01989.x>
31. Featherstone, J. (2009). Remineralization, the Natural Caries Repair Process—The Need for New Approaches. *Advances in Dental Research*, 21(1), 4–7. <https://doi.org/10.1177/0895937409335590>
32. Featherstone, J. & Lussi, A. (2006). Understanding the chemistry of dental erosion. In *KARGER eBooks* (S. 66–76). <https://doi.org/10.1159/000093351>
33. Finney, M., Walker, J. T., Marsh, P. & Brading, M. G. (2003). Antimicrobial effects of a novel Triclosan/zinc citrate dentifrice against mixed culture oral biofilms. *International Dental Journal*, 53(6), 371–378. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595x.2003.tb00912.x>
34. Fischer, M. S., Schlueter, N., Rupf, S. & Ganß, C. (2022). In vitro evaluation of the effects of different particle types in toothpastes on the efficacy against enamel erosion and wear. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13922-7>
35. Flemming, H. & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
36. Ganß, C., Schulze, K. & Schlueter, N. (2013). Toothpaste and Erosion. In *Monographs in oral science* (S. 88–99). <https://doi.org/10.1159/000350475>
37. Gasol, J. M. & Del Giorgio, P. A. (2000). Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Scientia Marina*, 64(2), 197–224. <https://doi.org/10.3989/scimar.2000.64n2197>

38. Giertsen, E., Guggenheim, B., Thurnheer, T. & Gmür, R. (2000). Microbiological aspects of an in situ model to study effects of antimicrobial agents on dental plaque ecology. *European Journal Of Oral Sciences*, 108(5), 403–411. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2000.108005403.x>
39. Gilbert, R. & Ingram, G. (1988). The oral disposition of zinc following the use of an Anticalculus toothpaste containing 0.5% zinc citrate. *Journal Of Pharmacy And Pharmacology*, 40(6), 399–402. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1988.tb06303.x>
40. Govindarajan, V. S. & Stahl, W. H. (1980). Turmeric — chemistry, technology, and quality. *CRC Critical Reviews in Food Science And Nutrition*, 12(3), 199–301. <https://doi.org/10.1080/10408398009527278>
41. Graves, D. T., Corrêa, J. D. & Silva, T. (2018). The Oral Microbiota Is Modified by Systemic Diseases. *Journal Of Dental Research*, 98(2), 148–156. <https://doi.org/10.1177/0022034518805739>
42. Grindefjord, M., Dahllöf, G. & Modéer, T. (1995). Caries Development in Children from 2.5 to 3.5 Years of Age: A Longitudinal Study. *Caries Research*, 29(6), 449–454. <https://doi.org/10.1159/000262113>
43. Gu, H., Fan, D., Gao, J., Zou, W., Peng, Z., Zhao, Z., Ling, J. & LeGeros, R. Z. (2012). Effect of ZnCl₂ on plaque growth and biofilm vitality. *Archives Of Oral Biology*, 57(4), 369–375. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.10.001>
44. Guggenheim, B., Giertsen, E., Schüpbach, P. & Shapiro, S. (2001). Validation of an in vitro Biofilm Model of Supragingival Plaque. *Journal Of Dental Research*, 80(1), 363–370. <https://doi.org/10.1177/00220345010800011201>
45. Gülzow, H.-J. & Sudbrake, C. (2003). Ein moderner Wirkstoff: 40 Jahre Kariesschutz mit Aminfluorid. *Zm Online*. Abgerufen am 27. Dezember 2023, von <https://www.zm-online.de/artikel/2003/mit-farbe-zur-form/ein-moderner-wirkstoff-40-jahre-kariesschutz-mit-aminfluorid>
46. Hajishengallis, G. (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystone, pathobionts, and host response. *Trends in Immunology*, 35(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.09.001>

47. Hajishengallis, G., Darveau, R. P. & Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nature Reviews Microbiology*, 10(10), 717–725. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2873>
48. Hall, P., Green, A., Horay, C., De Brabander, S., Beasley, T., Cromwell, V., Holt, J. & Savage, D. (2003). Plaque antibacterial levels following controlled food intake and use of a toothpaste containing 2% zinc citrate and 0.3% Triclosan. *International Dental Journal*, 53(6), 379–384. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595x.2003.tb00913.x>
49. Hannig, C. & Hannig, M. (2009). The oral cavity—a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in Man. *Clinical Oral Investigations*, 13(2), 123–139. <https://doi.org/10.1007/s00784-008-0243-3>
50. Hannig, C., Hannig, M., Rehmer, O., Braun, G., Hellwig, E. & Al-Ahmad, A. (2007). Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. *Archives Of Oral Biology*, 52(11), 1048–1056. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.05.006>
51. Hannig, C., Sorg, J., Spitzmüller, B., Hannig, M. & Al-Ahmad, A. (2009). Polyphenolic beverages reduce initial bacterial adherence to enamel in situ. *Journal Of Dentistry*, 37(7), 560–566. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2009.03.017>
52. Hannig, C., Spitzmüller, B., Al-Ahmad, A. & Hannig, M. (2008). Effects of Cistus-tea on bacterial colonization and enzyme activities of the in situ pellicle. *Journal Of Dentistry*, 36(7), 540–545. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2008.04.002>
53. Hannig, M. (1999). Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials in vivo. *European Journal Of Oral Sciences*, 107(1), 55–64. <https://doi.org/10.1046/j.0909-8836.1999.eos107109.x>
54. Hannig, M. (2007). Der initiale orale Biofilm – pathogen oder protektiv? *Oralprophylaxe und Kinderzahnheilkunde*, 29.
55. Hannig, M. & Joiner, A. (2005). The structure, function and properties of the acquired pellicle. In *KARGER eBooks* (S. 29–64). <https://doi.org/10.1159/000090585>

56. Hardwick, K., Barmes, D. E. & Richardson, L. M. (2000). International Collaborative Research on Fluoride. *Journal Of Dental Research*, 79(4), 893–904.
<https://doi.org/10.1177/00220345000790040301>
57. Harrap, G. J., Best, J. & Saxton, C. A. (1984). Human oral retention of zinc from mouthwashes containing zinc salts and its relevance to dental plaque control. *Archives Of Oral Biology*, 29(2), 87–91. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(84\)90110-9](https://doi.org/10.1016/0003-9969(84)90110-9)
58. He, G., Pearce, E. & Sissons, C. (2002). Inhibitory effect of ZNCL2 on glycolysis in human oral microbes. *Archives Of Oral Biology*, 47(2), 117–129.
[https://doi.org/10.1016/s0003-9969\(01\)00093-0](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(01)00093-0)
59. Hellwig, E., Klimek, J. & Attin, T. (2013). *Einführung in die Zahnerhaltung*. Deutscher Ärzte-Verlag GmbH.
60. Hellwig, E. & Lennon, A. M. (2004). Systemic versus topical fluoride. *Caries Research*, 38(3), 258–262. <https://doi.org/10.1159/000077764>
61. Hojo, K., Nagaoka, S., Ohshima, T. & Maeda, N. (2009). Bacterial interactions in dental biofilm development. *Journal Of Dental Research*, 88(11), 982–990.
<https://doi.org/10.1177/0022034509346811>
62. Hong, L., Levy, S. M., Warren, J. J., Broffitt, B. & Cavanaugh, J. (2006). Fluoride Intake Levels in Relation to Fluorosis Development in Permanent Maxillary Central Incisors and First Molars. *Caries Research*, 40(6), 494–500. <https://doi.org/10.1159/000095648>
63. Inchingolo, A. D., Malcangi, G., Semjonova, A., Inchingolo, A. M., Patano, A., Coloccia, G., Ceci, S., Malcangi, G., Di Pede, C., Ciocia, A. M., Mancini, A., Palmieri, G., Barile, G., Settanni, V., De Leonardis, N., Rapone, B., Piras, F., Viapiano, F., Cardarelli, F., Di-palma, G. (2022). OralBiotica/Oralbiotics: The impact of oral microbiota on dental health and demineralization: A Systematic Review of the literature. *Children (Basel)*, 9(7), 1014.
<https://doi.org/10.3390/children9071014>
64. Ingram, G., Horay, C. & Stead, W. J. (1992). Interaction of Zinc with Dental Mineral. *Caries Research*, 26(4), 248–253. <https://doi.org/10.1159/000261447>

65. Jaeggi, T. & Lussi, A. (2006). Prevalence, Incidence and Distribution of Erosion. In *KARGER eBooks* (S. 44–65). <https://doi.org/10.1159/000093350>
66. Jakubovics, N. S., Goodman, S. D., Mashburn-Warren, L., Stafford, G. P. & Cieplik, F. (2021). The Dental Plaque Biofilm Matrix. *Periodontology 2000*, 86(1), 32–56. <https://doi.org/10.1111/prd.12361>
67. Jenkins, S., Addy, M. & Newcombe, R. G. (1990). The effect of triclosan, stannous fluoride and chlorhexidine products on: (II) Salivary bacterial counts. *Journal Of Clinical Periodontology*, 17(10), 698–701. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1990.tb01056.x>
68. Jin, L., Lamster, I. B., Greenspan, J. S., Pitts, N., Scully, C. & Warnakulasuriya, S. (2016). Global Burden of Oral Diseases: emerging concepts, management and interplay with systemic health. *Oral Diseases*, 22(7), 609–619. <https://doi.org/10.1111/odi.12428>
69. Jshipura, K., Muñoz-Torres, F. J., Fernández-Santiago, J., Patel, R. P. & López-Canales, A. (2019). Over-the-counter mouthwash use, nitric oxide and hypertension risk. *Blood Pressure*, 29(2), 103–112. <https://doi.org/10.1080/08037051.2019.1680270>
70. Kang, J. Y., Jang, Y. J., Kim, D. J. & Park, J. W. (2015). Antimicrobial Effectiveness of Cetylpyridinium Chloride and Zinc Chloride–Containing Mouthrinses on Bacteria of Halitosis and Peri-implant Disease. *International Journal Of Oral & Maxillofacial Implants*. <https://doi.org/10.11607/jomi.3824>
71. Kaufmann, M. & Bartholmes, P. (1992). Purification, Characterization and Inhibition by Fluoride of Enolase from *Streptococcus mutans* DSM320523. *Caries Research*, 26(2), 110–116. <https://doi.org/10.1159/000261494>
72. Kilian, M., Chapple, I., Hannig, M., Marsh, P., Meuric, V., Pedersen, A. M. L., Tonetti, M. S., Wade, W. G. & Zaura, E. (2016). The Oral Microbiome – an update for oral healthcare professionals. *British Dental Journal*, 221(10), 657–666. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.865>
73. Klimek, J. (2012, 3. September). *Aminfluorid – ein moderner Wirkstoff zur Kariesprophylaxe*. ZMK. Abgerufen am 27. Dezember 2023, von https://www.zmk-aktuell.de/fachgebiete/prophylaxe/story/aminfluorid--ein-moderner-wirkstoff-zur-kariesprophylaxe__727.html

74. Koo, H. (2008). Strategies to enhance the biological effects of fluoride on dental biofilms. *Advances in Dental Research*, 20(1), 17–21.
<https://doi.org/10.1177/154407370802000105>
75. Kour, K., Kaur, S. & Singh, P. (2019). Comparative evaluation of the efficacy of Chloro-hexidine mouthwash as a supplement to regular tooth brushing. *International Journal Of Oral Health Dentistry*, 5(2), 97–103. <https://doi.org/10.18231/j.ijohd.2019.022>
76. Krishnan, K. V., Chen, T. & Bj, P. (2016). A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Diseases*, 23(3), 276–286.
<https://doi.org/10.1111/odi.12509>
77. Kumar, S., Tadakamadla, J. & Johnson, N. W. (2016). Effect of toothbrushing frequency on incidence and increment of dental caries. *Journal Of Dental Research*, 95(11), 1230–1236. <https://doi.org/10.1177/0022034516655315>
78. Lang, N. P. (2014). Commentary: Bacteria play a critical role in the etiology of periodontal disease. *Journal Of Periodontology*, 85(2), 211–213.
<https://doi.org/10.1902/jop.2013.130699>
79. Laurance-Young, P., Bozec, L., Gracia, L. H., Rees, G. D., Lippert, F., Lynch, R. J. & Knowles, J. C. (2011). A review of the structure of human and bovine dental hard tissues and their physicochemical behaviour in relation to erosive challenge and remineralisation. *Journal Of Dentistry*, 39(4), 266–272. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2011.01.008>
80. Lee, Y. J., Elzinga, E. J. & Reeder, R. J. (2005). Sorption Mechanisms of Zinc on Hydroxyapatite: Systematic Uptake Studies and EXAFS Spectroscopy Analysis. *Environmental Science & Technology*, 39(11), 4042–4048. <https://doi.org/10.1021/es048593r>
81. Leroy, R., Bogaerts, K., Lesaffre, E. & Declerck, D. (2005). Multivariate survival analysis for the identification of factors associated with cavity formation in permanent first molars. *European Journal Of Oral Sciences*, 113(2), 145–152. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2005.00199.x>
82. Li, M., Xiao, X., Liu, R., Chen, C. & Huang, L. (2007). Structural characterization of zinc-substituted hydroxyapatite prepared by hydrothermal method. *Journal Of Materials*

- Science: Materials in Medicine*, 19(2), 797–803. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3213-4>
83. Lippert, F. (2013). An Introduction to Toothpaste - Its Purpose, History and Ingredients. In *Monographs in oral science* (S. 1–14). <https://doi.org/10.1159/000350456>
84. Listl, S., Galloway, J., Mossey, P. & Marcenes, W. (2015). Global economic impact of dental diseases. *Journal Of Dental Research*, 94(10), 1355–1361. <https://doi.org/10.1177/0022034515602879>
85. L  e, H. (2000). Oral hygiene in the prevention of caries and periodontal disease. *International Dental Journal*, 50(3), 129–139. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595x.2000.tb00553.x>
86. Loesche, W. J. (1979). Clinical and Microbiological Aspects of Chemotherapeutic Agents Used According to the Specific Plaque Hypothesis. *Journal Of Dental Research*, 58(12), 2404–2412. <https://doi.org/10.1177/00220345790580120905>
87. Lynch, R. J. (2011). Zinc in the mouth, its interactions with dental enamel and possible effects on caries; A review of the literature. *International Dental Journal*, 61, 46–54. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595x.2011.00049.x>
88. Marquis, R. E., Clock, S. A. & Mota-Meira, M. (2003). Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. *Fems Microbiology Reviews*, 26(5), 493–510. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2003.tb00627.x>
89. Marsh, P. (1994). Microbial Ecology of Dental Plaque and its Significance in Health and Disease. *Advances in Dental Research*, 8(2), 263–271. <https://doi.org/10.1177/08959374940080022001>
90. Marsh, P. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*, 149(2), 279–294. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26082-0>
91. Marsh, P. (2004). Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Research*, 38(3), 204–211. <https://doi.org/10.1159/000077756>

92. Marsh, P. (2010). Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dental Clinics Of North America*, 54(3), 441–454.
<https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.03.002>
93. Marsh, P. & Bradshaw, D. J. (1995). Dental plaque as a biofilm. *Journal Of Industrial Microbiology*, 15(3), 169–175. <https://doi.org/10.1007/bf01569822>
94. Marsh, P., Head, D. A. & DeVine, D. (2015). Ecological Approaches to Oral Biofilms: Control without Killing. *Caries Research*, 49(Suppl. 1), 46–54.
<https://doi.org/10.1159/000377732>
95. Marsh, P., Moter, A. & DeVine, D. (2010). Dental plaque Biofilms: Communities, conflict and control. *Periodontology 2000*, 55(1), 16–35. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00339.x>
96. 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(11), 3843–3853. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03250-3>
97. Mathur, S., Srivastava, R. & Khatri, R. (2011). Chlorhexidine: The gold standard in chemical plaque control. *National Journal Of Physiology, Pharmacy And Pharmacology*, 1, 45–50.
98. Mayer, I., Apfelbaum, F. & Featherstone, J. (1994). Zinc ions in synthetic carbonated hydroxyapatites. *Archives Of Oral Biology*, 39(1), 87–90. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(94\)90040-x](https://doi.org/10.1016/0003-9969(94)90040-x)
99. Miller WD, The microorganisms of the human mouth (1890) White, S.S. and Co., Philadelphia
100. Mukhopadhyay, A., Basu, N., Ghatak, N. & Gujral, P. K. (1982). Anti-inflammatory and irritant activities of curcumin analogues in rats. *Agents And Actions*, 12(4), 508–515.
<https://doi.org/10.1007/bf01965935>
101. Nagasri, M., Madhulatha, M., Sv, M., Kumar, P. A., Ch, K. & Pm, K. (2015). Efficacy of curcumin as an adjunct to scaling and root planning in chronic periodontitis patients: a

- clinical and microbiological study. *Journal Of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 7(6), 554. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.163537>
102. Nagpal, M. & Sood, S. (2013). Role of curcumin in Systemic and Oral health: An Overview. *Journal Of Natural Science, Biology, And Medicine*, 4(1), 3. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.107253>
103. Nakamichi, I., Iwaku, M. & Fusayama, T. (1983). Bovine Teeth as Possible Substitutes in the Adhesion Test. *Journal Of Dental Research*, 62(10), 1076–1081. <https://doi.org/10.1177/00220345830620101501>
104. Netuschil, L., Reich, E., Unteregger, G., Sculean, A. & Brex, M. (1998). A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. *Archives Of Oral Biology*, 43(4), 277–285. [https://doi.org/10.1016/s0003-9969\(97\)00121-0](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(97)00121-0)
105. Nyvad, B. & Fejerskov, O. (1987). Transmission electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *European Journal Of Oral Sciences*, 95(4), 297–307. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1987.tb01845.x>
106. O'Mullane, D., Baez, R. J., Jones, S. & Whitford, G. M. (2016). Fluoride and oral health. *ResearchGate*. https://doi.org/10.1922/CDH_3707O
107. Peres, M. A., Macpherson, L. M. D., Weyant, R. J., Daly, B., Venturelli, R., Mathur, M. R., Listl, S., Celeste, R. K., Guarnizo-Herreño, C. C., Kearns, C., Benzian, H., Allison, P. & Watt, R. G. (2019). Oral Diseases: a global public health challenge. *The Lancet*, 394(10194), 249–260. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(19\)31146-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(19)31146-8)
108. Petersen, P. E. & Phantumvanit, P. (2012). Perspectives in the Effective Use of Fluoride in Asia. *Journal Of Dental Research*, 91(2), 119–121. <https://doi.org/10.1177/0022034511429347>
109. Phan, T., Buckner, T., Sheng, J., Baldeck, J. D. & Marquis, R. E. (2003). Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms. *Oral Microbiology And Immunology*, 19(1), 31–38. <https://doi.org/10.1046/j.0902-0055.2003.00109.x>

110. Pulido-Morán, M., Moreno-Fernández, J., Ramírez-Tortosa, C. L. & Ramírez-Tortosa, M. C. (2016). Curcumin and health. *Molecules*, 21(3), 264. <https://doi.org/10.3390/molecules21030264>
111. Rabe, P., Twetman, S., Kinnby, B., Svensäter, G. & Davies, J. R. (2015). Effect of Fluoride and Chlorhexidine Digluconate Mouthrinses on Plaque Biofilms. *The Open Dentistry Journal*, 9(1), 106–111. <https://doi.org/10.2174/1874210601509010106>
112. Rajendiran, M., Trivedi, H. M., Chen, D., Gajendrareddy, P. & Chen, L. (2021). Recent development of active ingredients in mouthwashes and toothpastes for periodontal diseases. *Molecules*, 26(7), 2001. <https://doi.org/10.3390/molecules26072001>
113. Righolt, A., Jevdjevic, M., Marcenes, W. & Listl, S. (2018). Global-, Regional-, and Country-Level economic impacts of dental diseases in 2015. *Journal Of Dental Research*, 97(5), 501–507. <https://doi.org/10.1177/0022034517750572>
114. Rodemer, T., Pütz, N. & Hannig, M. (2022). Influence of hydroxyapatite nanoparticles on the formation of calcium fluoride surface layer on enamel and dentine in vitro. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21545-1>
115. Rosema, N., Slot, D. E., Van Palenstein Helderman, W., Wiggelinkhuizen, L. & Van der Weijden, G. (2014). The efficacy of powered toothbrushes following a brushing exercise: a systematic review. *International Journal Of Dental Hygiene*, 14(1), 29–41. <https://doi.org/10.1111/idh.12115>
116. Rosier, B. T., Jäger, M. D., Zaura, E. & Krom, B. P. (2014). Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Frontiers in Cellular And Infection Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00092>
117. Rošin-Grget, K. (2013). The cariostatic mechanisms of fluoride. *Acta Medica Academica*, 42(2), 179–188. <https://doi.org/10.5644/ama2006-124.85>
118. Rugg-Gunn, A. J. & Bánóczy, J. (2013). Fluoride toothpastes and fluoride mouthrinses. *Acta Medica Academica*, 42(2), 168–178. <https://doi.org/10.5644/ama2006-124.84>
119. Rupf, S., Balkenhol, M., Sahrhage, T. O., Baum, A., Chromik, J. N., Ruppert, K., Wissenbach, D. K., Maurer, H. H. & Hannig, M. (2012). Biofilm inhibition by an

- experimental dental resin composite containing octenidine dihydrochloride. *Dental Materials*, 28(9), 974–984. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.04.034>
120. Saxton, C. A., Harrap, G. J. & Lloyd, A. (1986). The effect of dentifrices containing zinc citrate on plaque growth and oral zinc levels. *Journal Of Clinical Periodontology*, 13(4), 301–306. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1986.tb02226.x>
121. Schiøtt, C. R., Løe, H., Jensen, S., Kilian, M., Davies, R. & Glavind, K. (1970). The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human oral flora. *Journal Of Periodontal Research*, 5(2), 84–89. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1970.tb00697.x>
122. Schlüter, N., Winterfeld, T. & Ganß, C. (2015). Mechanische und chemische Kontrolle des Supragingivalen Biofilms. *Der Freie Zahnarzt*, 59(10), 66–80. <https://doi.org/10.1007/s12614-015-5451-z>
123. Schneider, C. A., Rasband, W. & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
124. Scholz, K. J., Federlin, M., Hiller, K., Ebensberger, H., Ferstl, G. & Buchalla, W. (2019). EDX-analysis of fluoride precipitation on human enamel. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49742-5>
125. Selwitz, R. H., Ismail, A. I. & Pitts, N. (2007). Dental caries. *The Lancet*, 369(9555), 51–59. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)60031-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(07)60031-2)
126. Shahzad, M., Millhouse, E., Culshaw, S., Edwards, C., Ramage, G. & Combet, E. (2015). Selected dietary (poly)phenols inhibit periodontal pathogen growth and biofilm formation. *Food & Function*, 6(3), 719–729. <https://doi.org/10.1039/c4fo01087f>
127. Singh, A., Yadav, S., Sharma, K., Firdaus, Z., Aditi, P., Neogi, K., Bansal, M., Gupta, M., Shanker, A., Singh, R. K. & Prakash, P. (2018). Quantum curcumin mediated inhibition of gingipains and mixed-biofilm of Porphyromonas gingivalis causing chronic periodontitis. *RSC Advances*, 8(70), 40426–40445. <https://doi.org/10.1039/c8ra08435a>
128. Siqueira, W. L., Custódio, W. & McDonald, E. (2012). New Insights into the Composition and Functions of the Acquired Enamel Pellicle. *Journal Of Dental Research*, 91(12), 1110–1118. <https://doi.org/10.1177/0022034512462578>

129. Sreenivasan, P. K., Furgang, D., Markowitz, K., McKiernan, M., Tischio-Bereski, D., DeVizio, W. & Fine, D. H. (2008). Clinical anti-microbial efficacy of a new zinc citrate dentifrice. *Clinical Oral Investigations*, 13(2), 195–202. <https://doi.org/10.1007/s00784-008-0227-3>
130. Stötzel, C., Müller, F. A., Reinert, F., Niederdraenk, F., Barralet, J. E. & Gbureck, U. (2009). Ion adsorption behaviour of hydroxyapatite with different crystallinities. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, 74(1), 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.06.031>
131. Sugano, N. (2012). Biological Plaque Control: Novel Therapeutic Approach to Periodontal disease. *Journal Of Oral Science*, 54(1), 1–5. <https://doi.org/10.2334/josnurd.54.1>
132. Surman, S., Walker, J., Goddard, D. T., Morton, L., Keevil, C. W., Weaver, W. M., Skinner, A., Hanson, K. L., Caldwell, D. E. & Kurtz, J. B. (1996). Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. *Journal Of Microbiological Methods*, 25(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(95\)00085-2](https://doi.org/10.1016/0167-7012(95)00085-2)
133. Takahashi, N. & Nyvad, B. (2008). Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Research*, 42(6), 409–418. <https://doi.org/10.1159/000159604>
134. Tawakoli, P. N., Al-Ahmad, A., Hoth-Hannig, W., Hannig, M. & Hannig, C. (2012). Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clinical Oral Investigations*, 17(3), 841–850. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0792-3>
135. Theilade, E. (1986). The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *Journal Of Clinical Periodontology*, 13(10), 905–911. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1986.tb01425.x>
136. Thomassen, T. M., Van der Weijden, F. A. & Slot, D. E. (2021). The efficacy of powered toothbrushes: A systematic review and network meta-analysis. *International Journal Of Dental Hygiene*, 20(1), 3–17. <https://doi.org/10.1111/idh.12563>
137. Tilak, J. C., Banerjee, M., Mohan, H. & Devasagayam, T. (2004). Antioxidant availability of turmeric in relation to its medicinal and culinary uses. *Phytotherapy Research*, 18(10), 798–804. <https://doi.org/10.1002/ptr.1553>

138. Touger-Decker, R. & Van Loveren, C. (2003). Sugars and dental caries. *The American Journal Of Clinical Nutrition*, 78(4), 881S-892S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.4.881s>
139. Valkenburg, C., Slot, D. E., Bakker, E. W. P. & Van der Weijden, F. A. (2016). Does dentifrice use help to remove plaque? A systematic review. *Journal Of Clinical Periodontology*, 43(12), 1050–1058. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12615>
140. Van der Weijden, F. A. & Slot, D. E. (2015). Efficacy of homecare regimens for mechanical plaque removal in managing gingivitis A Meta Review. *Journal Of Clinical Periodontology*, 42(S16). <https://doi.org/10.1111/jcpe.12359>
141. Van Loveren, C. (2001). Antimicrobial Activity of Fluoride and Its in vivo Importance: Identification of Research Questions. *Caries Research*, 35(Suppl. 1), 65–70. <https://doi.org/10.1159/000049114>
142. Walsh, T., Worthington, H. V., Glenny, A., Marinho, V. C. & Jerončić, A. (2019). Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries. *The Cochrane Library*. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd007868.pub3>
143. Wang, X., Tewari, N., Sato, F., Tanimoto, K., Thangavelu, L., Makishima, M. & Bhalwal, U. K. (2022). Biphasic Functions of Sodium Fluoride (NaF) in Soft and in Hard Periodontal Tissues. *International Journal Of Molecular Sciences*, 23(2), 962. <https://doi.org/10.3390/ijms23020962>
144. Wellek, S. & Blettner, M. (2012). On the Proper Use of the Crossover Design in Clinical Trials. *Deutsches Arzteblatt International*. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2012.0276>
145. West, N., Davies, M. & Amaechi, B. T. (2011). In vitro and in situ Erosion Models for Evaluating Tooth Substance Loss. *Caries Research*, 45(Suppl. 1), 43–52. <https://doi.org/10.1159/000325945>
146. Windisch, W. (2003). Development of zinc deficiency in ⁶⁵Zn labeled, fully grown rats as a model for adult individuals. *Journal Of Trace Elements in Medicine And Biology*, 17(2), 91–96. [https://doi.org/10.1016/s0946-672x\(03\)80004-4](https://doi.org/10.1016/s0946-672x(03)80004-4)

147. Wong, M. C., Glenny, A., Tsang, B. W., Lo, E. C., Worthington, H. V. & Marinho, V. C. (2010). Topical fluoride as a cause of dental fluorosis in children. *Cochrane Library*.
<https://doi.org/10.1002/14651858.cd007693.pub2>
148. Wood, S. C., Kirkham, J., Marsh, P., Shore, R., Nattress, B. & Robinson, C. (2000). Architecture of Intact Natural Human Plaque Biofilms Studied by Confocal Laser Scanning Microscopy. *Journal Of Dental Research*, 79(1), 21–27.
<https://doi.org/10.1177/00220345000790010201>
149. Wu, J., Peters, B. A., Dominianni, C., Zhang, Y., Pei, Z., Yang, L., Ma, Y., Purdue, M. P., Jacobs, E. J., Gapstur, S. M., Li, H., Alekseyenko, A. V., Hayes, R. B. & Ahn, J. (2016). Cigarette smoking and the oral microbiome in a large study of American adults. *The ISME Journal*, 10(10), 2435–2446. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.37>
150. Xing, C., Xu, P., Zhou, X., Deng, M., Cheng, L., Li, M., Li, Y. & Xu, X. (2015). Arginine promotes fluoride uptake into artificial carious lesions in vitro. *Australian Dental Journal*, 60(1), 104–111. <https://doi.org/10.1111/adj.12278>
151. Ye, J. & Yip, H. C. (2002). Supragingival Calculus: Formation and Control. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13(5), 426–441.
<https://doi.org/10.1177/154411130201300506>
152. Zaura, E. & Cate, J. T. (2003). Dental Plaque as a Biofilm: A Pilot Study of the Effects of Nutrients on Plaque pH and Dentin Demineralization. *Caries Research*, 38(Suppl. 1), 9–15. <https://doi.org/10.1159/000074357>
153. Zhang, Y., Huang, L., Mazurel, D., Zheng, H., Yang, J. & Deng, D. (2021). Clinical Efficacy of curcumin versus chlorhexidine as an adjunct to scaling and root planing for the treatment of periodontitis: A Systematic review and Meta-analysis. *Phytotherapy Research*, 35(11), 5980–5991. <https://doi.org/10.1002/ptr.7208>
154. Zijlstra, V., Van Leeuwen, M. B. M., Degener, J. E., Abbas, F., Thurnheer, T., Gmür, R. & Harmsen, H. J. M. (2010). Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth. *PLOS ONE*, 5(2), e9321. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009321>

7 Danksagung

Meinen herzlichen Dank möchte ich Herrn Professor Dr. Stefan Rupf zum Ausdruck bringen, der mir als Doktorvater das Thema anvertraute und mich bei der Durchführung dieser Arbeit stets unterstützte. Dank seiner konstruktiven, zügigen, fairen und verlässlichen Betreuung war es mir möglich, diese Arbeit abzuschließen.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen wissenschaftlichen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. M. Hannig für die Unterstützung während der Versuche bedanken, insbesondere bei Herrn Norbert Pütz für die Hilfe bei den Analysen am Rasterelektronenmikroskop. Des Weiteren möchte ich meinen Versuchspartnern für ihre Bereitschaft, an dieser Studie teilzunehmen, meinen Dank aussprechen.

Ich bedanke mich bei meinen Chefs Dr. Sebastian Janke und Dr. Gesine Hengelhaupt - dank ihres Vertrauens und gewährter zeitlichen Freiräume sowie durch fortwährende Ermutigung konnte diese Arbeit fertiggestellt werden.

Ich danke meinen Eltern für ihre Liebe und ihr bedingungsloses Entgegenbringen von Unterstützung und Geborgenheit, meinem Bruder für seine anhaltende Ermutigung zum Selbstvertrauen und ich danke Jacco dafür, dass er mein Leben mit seiner Liebe und seinem Humor bereichert.

8 Lebenslauf

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

9 Anhang

9.1 Materialliste

Prüfsubstanzen	
Steriles Wasser	Ampuwa®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland (DEU)
Basispaste	Theiss Naturwaren GmbH, Homburg, DEU
Fluoridpaste	Theiss Naturwaren GmbH, Homburg, DEU
Zink-Kurkuma-Paste	Theiss Naturwaren GmbH, Homburg, DEU
Geräte	
Tiefziehgerät	Erkopress ES 2004, Erkodent GmbH, Pfalzgrafenweiler, DEU
Schleifmaschine	Phoenix 3000, Buehler, Düsseldorf, DEU
Trennschleifmaschine	WOCO 50 P, Conrad GmbH, Clausthal, DEU
Lichtmikroskop	Stereo Zoom Mikroskop SMZ-140, Motiv GmbH, Wetzlar, DEU
Ultraschallgerät	Sonorex Super RK 100 H, Bandelin, Berlin, DEU
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager.M2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DEU
Kamera	AxioCam MRm, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DEU
Wipp-Tisch	Rocky®, Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau, DEU
Rasterelektronenmikroskop	XL 30 ESEM FEG, FEI Company, Eindhoven, Niederlande
energie-dispersiven Röntgenspektrometer (EDX/EDS)	EDX Phoenix, EDAX Inc., Mahwah, USA
Gerät zum Sputtern	Sputter Coater SCD 040, Oerlikon Balzers Coating Germany GmbH, Bingen, DEU
Chemikalien	

Thymol	Thymollösung 0,1%, Apotheke des Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg, DEU
Natriumhypochlorid	Natriumhypochlorid-Lösung 3% DAC, Hedinger, Stuttgart, DEU
Isopropylalkohol	Isopropylalkohol 70%, Hedinger, Stuttgart, DEU
Glutaraldehyd	Glutaraldehyd, 50% -Lösung in Wasser, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU
Hexamethyldisilazan	Hexamethyldisilazane 98+%, thermo Fisher GmbH, kandel, DEU
Cacodylat	Cacodylsäure natriumsalz trihydrat, carl roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEU
LIVE/DEAD Kit	LIVE/DEAD®BacLight™
Natriumchlorid	NaCl 0,9% Spüllösung, 1000 ml Plastipr®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, DEU
Bidestilliertes Wasser	Destilliertes Wasser, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, DEU
Vergälltes Ethanol	Ethanol $\geq$ 99,8% vergällt, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEU
Reines Ethanol	Ethanol $\geq$ 99,5%, Ph. Eur., reinst, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEU
Natronlauge	Natriumhydrosid Plätzchen zur Analyse EMSURE® ISO, merck KGaA, Darmstadt, DEU
Essigsäure	Essigsäure (Eisessig) 100% wasserfrei zur Analyse EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Hilfsmaterialien	
Alginat	Alginat Blueprint, Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, DEU
Superhartgips IV	Die-Stone, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, DEU
Tiefziehfolie	DURAN®, Scheu Dental GmbH, Iserlohn, DEU
SiC Schleifpapier	CarbiMet™, Buehler, Illinois, USA
Silikon	President light body, Coltène/Whaledent GmbH & Co.KG, Langenau, DEU

Anhang

Aluminium Stummel	SEM Specimen Stubs–Short Pin, Agar Scientific Ltd, Essex, England
Klebefolie	Leit-Tabs, Plano GmbH, Wetzlar, DEU
Putty Material	Optosil® Comfort® Putty, Heraeus Holding GmbH, Hanau, DEU
Kohlefaden	Hochreine Kohlefäden für Kohlebedampfung Klasse CT4, Micro to Nano, Haarlem, Niederlande
Software	
AxioVision SE64 Rel. 4.9	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DEU
ImageJ 1.52	NIH, Bethesda, Maryland, USA
GraphPad Prism 10	GraphPad Prism, Version 10.0.0 für Mac, GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, 1995-2025 GraphPad Software
DataTab	DATAtab Team (2024). DATAtab: Online Statistics Calculator. DATAtab e.U. Graz, Austria