

**In Vitro-Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit  
eines mit Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat modifizierten  
Composites gegenüber kariogenen und parodontopathogenen  
Bakterien**

**Dissertation**

**zur Erlangung des medizinischen Grades  
doctor medicinae dentariae  
(Dr. med.dent.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich Schiller Universität Jena**

**von**

**Katja Müller  
geboren am 30.06.1977 in Suhl**

**und**

**Susann Krehan  
geboren am 09.06.1980 in Erfurt**

## **Gutachter**

- 1. Prof. Dr. Wolfgang Pfister, Universität Jena**
- 2. Prof. em. Dr. Dieter Welker, Universität Jena**
- 3. Prof. Dr. Jörgen G. Nóren, Universität Göteborg**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.02. 2011**

## Inhaltsverzeichnis

### **Abkürzungsverzeichnis**

<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1. Composites	4
1.2. Biokompatibilität	8
1.3. Biotop Mundhöhle	10
1.3.1. Speichel	10
1.3.2. Pellikel	11
1.3.3. Plaque	13
1.3.4. Karies	15
1.3.5. Relevante orale Mikroorganismen	16
1.4. Grundprinzipien plaquehemmender Füllwerkstoffe	21
<b>2. Ziele der Arbeit</b>	<b>24</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>25</b>
3.1. Werkstoffe	25
3.2. Prüfkörperherstellung und –lagerung	27
3.3. Mikroorganismen, Nährmedien und synthetischer Speichel	28

3.4.	Prüfverfahren	31
3.4.1.	Wirkung von Bis[-2(methacryloyloxy)ethyl]phosphat auf das Wachstum von Mikroorganismen	31
3.4.2.	Wirkung von Werkstoffeluaten auf das Wachstum von Mikroorganismen	33
3.4.3.	Versuche zur Anlagerung von Mikroorganismen	37
3.4.4.	Statistik	39
3.4.5.	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung	40
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
4.1.	Ergebnisse der Versuche mit Bis[-2(methacryloyloxy)ethyl]phosphat	41
4.2.	Ergebnisse der Versuche mit Eluaten	48
4.3.	Ergebnisse der Versuche zur Anlagerung der Mikroorganismen	55
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
5.1.	Methodendiskussion	62
5.2.	Diskussion der Ergebnisse	66
<b>6.</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	<b>94</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>A. naeslundii</b>	- Actinomyces naeslundii
<b>A. viscosus</b>	- Actinomyces viscosus
<b>Bis-EDMA</b>	- 2,2-Bis[4(3-methacryloyl-oxy)ethoxyphenyl]propan
<b>Bis-GMA</b>	- 2,2-Bis[4(3-methacryloyl-oxy-2hydroxy)propoxyphenyl]propen
<b>BPH</b>	- Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat
<b>C. albicans</b>	- Candida albicans
<b>DMSO</b>	- Dimethylsulfoxid
<b>F. nucleatum</b>	- Fusobacterium nucleatum
<b>KBE</b>	- Koloniebildende Einheiten
<b>Masse%</b>	- Masseprozent
<b>MDPB</b>	- 12-Methacryloyloxydodecylpyridiniumbromid
<b>PBS</b>	- (engl.: phosphat buffered saline) Phosphat-gepufferte Salzlösung
<b>P. gingivalis</b>	- Porphyromonas gingivalis
<b>REM</b>	- Rasterelektronenmikroskop
<b>S. anginosus</b>	- Streptococcus anginosus
<b>S. gordonii</b>	- Streptococcus gordonii
<b>S. milleri</b>	- Streptococcus milleri
<b>S. mitis</b>	- Streptococcus mitis
<b>S. mutans</b>	- Streptococcus mutans
<b>S. oralis</b>	- Streptococcus oralis
<b>S. salivarius</b>	- Streptococcus salivarius
<b>S. sanguinis</b>	- Streptococcus sanguinis
<b>TEGDMA</b>	- Triethylenglycoldimethacrylat
<b>Gew.%</b>	- Gewichtsprozent
<b>UDMA</b>	- Urethandimethacrylat
<b>Vol.%</b>	- Volumenprozent

## Zusammenfassung

Composite-Kunststoffe nehmen in der modernen Zahnheilkunde eine herausragende Stellung ein. Aufgrund der vergleichsweise höheren Plaque- und Bakterienadhärenz an diesen Füllmaterialien werden immer wieder Versuche unternommen, plaque- und somit auch karies- und parodontitishemmende Composites durch Zugabe antimikrobieller Substanzen zu entwickeln.

Anliegen dieser Arbeit war es, die Eigenschaften eines mit Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat modifizierten Composites bezüglich seiner antimikrobiellen Wirksamkeit auf ausgewählte Mikroorganismen zu untersuchen.

Für die vorliegende In vitro-Studie wurde aufgrund seiner guten Durchmischbarkeit das fließfähige Nano-Hybrid-Composite Grandio Flow<sup>®</sup> der Firma VOCO ausgewählt, welches mit dem potenziell antimikrobiellen Agens Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat (BPH) versetzt wurde. Dieses verfügt über drei funktionelle Gruppen. Während die zwei enthaltenen Methacrylat-Gruppen der Einbindung in die Composite-Matrix dienen, soll die antibakterielle Wirkung über die ebenfalls enthaltene Hydroxyl-Gruppe vermittelt werden.

Die Modifikation erfolgte unter sterilen Bedingungen durch homogene Mischung von 95 Gew.% Grandio Flow mit 5 Gew.% BPH. Für nachfolgende Versuchsabläufe standen Prüfkörper gleicher Menge aus modifiziertem und handelsüblichem Material zur Verfügung.

Als Testkeime dienten die kariogenen und parodontopathogenen Erreger *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces viscosus* sowie *Candida albicans*. Für diese Keime konnte in den Vorversuchen eine wachstumshemmende BPH-Wirkung unterschiedlichen Ausmaßes ermittelt werden, die differierende Empfindlichkeiten der getesteten Spezies vermuten ließen.

Im ersten Versuchsabschnitt wurde der Einfluss von Eluaten genormter Prüfkörper auf das Wachstumsverhalten der ausgewählten Mundhöhlenspezies untersucht. Mit Ausnahme von *Candida albicans* waren bei allen Spezies Tendenzen erkennbar, die auf eine Abnahme der KBE mit steigendem Eluat-Anteil hinwiesen.

Einen weiteren Aspekt dieser Arbeit stellten die Anlagerungsversuche dar, die der Prüfung der direkten oberflächenvermittelten Werkstoffwirkungen dienen. Um Rückschlüsse auf etwaige alterungsbedingte Veränderungen der antimikrobiellen Materialeigenschaften ziehen zu können, wurden sowohl frisch hergestellte als auch artifiziell gealterte Prüfkörper hinsichtlich des Adhärenzverhaltens einer *Streptococcus mutans*-Monokultur und eines Mischkultur-Ansatzes, bestehend aus *Actinomyces viscosus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* und *Streptococcus sanguinis* untersucht.

Die Auswertung beider Kultur-Ansätze brachte die Erkenntnis, dass an den getesteten Prüfkörpern mit Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat-Zusatz vergleichsweise weniger Bakterien adhärirten. Besonders deutlich war dieser Effekt direkt nach der Polymerisation. Hier zeigte sich, dass an frischen BPH-haltigen Prüfkörpern signifikant weniger bakterielle Plaque akkumulierte als an BPH-freien gleichen Alters. Beim Vergleich der gealterten Prüfkörper ließ sich diese Reduktion nicht nachweisen, was die Vermutung nahe legt, dass sich der Hemmeffekt, beispielsweise aufgrund des Ausbleibens einer festen Einbindung von BPH in die Composite-Matrix, aufbraucht.

Sollten weiterführende werkstoffkundliche Untersuchungen den Nachweis der biologischen Eignung von Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat erbringen, wäre eine Anwendung in temporären Füllwerkstoffen zur Hemmung der Besiedlung durch kario- und parodontopathogene Erreger denkbar.

## **1. Einleitung**

Die Anforderungen an Füllwerkstoffe haben sich im Laufe der letzten Jahrzehnte erweitert.

Während im Mittelpunkt des zahnärztlichen Interesses nach wie vor in erster Linie fachspezifische und wirtschaftliche Aspekte, wie leichte und sichere Handhabung sowie mechanische, chemische und biologische Eignung der Materialien stehen, gewinnt die Ästhetik im Zuge eines gestiegenen Körperbewusstseins für den Patienten immer mehr an Bedeutung.

Waren in der Vergangenheit weiße Restaurationen ästhetisch ausreichend, werden heute Forderungen nach Restaurationen laut, die vom natürlichen Zahn in Transluzenz und Optik nicht mehr zu unterscheiden sind. Schon deshalb sind Composites nicht mehr aus der modernen konservierenden Zahnheilkunde wegzudenken.



## 1.1. Composites

Die Grundlage der heutigen Composites wurde 1962 mit Bowen`s Durchbruch der Synthese des Bis-GMA-Monomers (mehrfunktionelle Methacrylate) und die Einführung silanisierter Füllstoffe geschaffen.

Seit ihrer Einführung in die Zahnheilkunde Anfang der 70iger Jahre unterliegen besonders die organische Matrix und die anorganischen Füllstoffe (disperse Phase) der Composites einer steten Weiterentwicklung.

Die ersten Füllstoffe, so genannte Makrofüller, wiesen eine durchschnittliche Größe von 0,1-100 µm auf [Lutz et al. 1983, Kullman 1990]. Sie waren durch hohe mechanische Festigkeit [Chung 1990] bei gleichzeitig schlechter Polierbarkeit charakterisiert [Roulet und Roulet-Mehrens 1982, Lutz et al. 1983], was sich in vermehrter Plaqueanlagerung und Abrasion, sowie verstärkter Verfärbungstendenz äußerte [Lutz et al. 1983].

Den nächsten Schritt in der Füllkörperentwicklung stellten die so genannten homogenen Mikrofüller-Composites mit einer Partikelgröße  $< 1 \mu\text{m}$  dar [Lutz et al. 1983, Hellwig et al. 1999, Janda 1988]. Mit ihnen konnte aber ein nur geringer Füllstoffgehalt von 50 % erzielt werden [Janda 1988]. Das hatte zur Folge, dass die Composites zwar ästhetisch ansprechender, besser polierbar, abrasionsfester und weniger plaqueretentiv waren, gleichzeitig aber eine erhöhte Polymerisationsschrumpfung, geringere Zug- und Biegefestigkeit sowie einen erhöhten Wärmeausdehnungskoeffizienten aufwiesen [Lutz et al. 1983].

Die Zugabe von zersplitterten Vorpolymerisaten [Kullman 1990] oder gesinterten Silizium-Dioxid-Teilchen [Roulet 1987] zu den Mikrofüllern sollte dieser nachteiligen Entwicklung entgegenwirken. Bei einem Füllergehalt von 70-80 % konnte so unter Beibehalt der bereits erzielten Vorzüge, wie der guten Polierbarkeit, Ästhetik sowie des relativ günstigen Verschleißverhaltens, die Polymerisationsschrumpfung minimiert werden. Unter Belastung oder bei der

Polymerisation kam es nun aber teilweise an der Grenzfläche Vorpolymerisat-Matrix zu Rissen.

Mitte der 80iger Jahre wurden die Hybridcomposites entwickelt, die mit ihren Mikro- ( $< 0,15 \mu\text{m}$ ) und Makrofüllern ( $< 10 \mu\text{m}$ ), die günstigen physikalischen und ästhetischen Eigenschaften der vorangegangenen Generationen vereinen sollten.

Der Gesamtgehalt an Füllstoff wurde auf bis zu 85 % gesteigert und setzte sich aus 10-15 Gew.% Mikro- und 85-90 Gew.% Makrofüllern zusammen [Lutz et al. 1983, Hellwig et al. 1999, Janda 1988]. Dadurch konnte eine Reduktion der Polymerisationsschrumpfung auf 2-3 Vol.% erzielt werden [Reinhardt 1991].

Die Composites zeichneten sich durch sehr gute physikalische Eigenschaften, verbesserte Ästhetik aufgrund guter Polierfähigkeit und schmelzähnlicher Transluzenz aus [Chung 1990, Hellwig et al. 1999, Kullman 1990, Lutz et al. 1983, Roulet 1987].

Durch optimierte Mahlverfahren gelang es in jüngster Zeit, die Partikelgröße der Makrofüller auf  $< 1 \mu\text{m}$  zu reduzieren. In der Literatur findet sich eine Einteilung aufgrund ihrer Füllkörpergröße in Fein- ( $< 5 \mu\text{m}$ ), Feinst- ( $< 3 \mu\text{m}$ ) und Submikrometer-Hybrid-Composites ( $< 1 \mu\text{m}$ ) [Kunzelmann et al. 1999].

Füllstoffe moderner Composites bestehen aus feingemahlenem Quarz, Lithium-Aluminium-Silikat-Gläsern, Borosilikat und hochdisperssem, amorphem Siliziumdioxid [Schmalz und Arenholt-Bindslev 2005].

Der zweite wichtige Bestandteil der Composites, die organische Matrix, setzt sich im unpolymerisierten Zustand aus Monomeren, Initiatoren, Stabilisatoren, Farbstoffen und Pigmenten zusammen. Sie ist ausschlaggebend für toxische Wirkung, mechanische Eigenschaften, Farbstabilität sowie Wasseraufnahmeverhalten, Schrumpfung, Polymerisationsgrad und Viskosität eines Composites.

Bei den Monomeren handelt es sich fast ausschließlich um multifunktionelle hochmolekulare Methacrylate, wie das von Bowen synthetisierte Bis-GMA (Bisphenol-A-Glycidylmethacrylat), sowie UDMA (Urethandimethacrylat), Bis-EDMA (2,2-Bis[4(3-methacryloyl-oxy)ethoxyphenyl]-propan) und TEGDMA (Triethylenglycoldimethacrylat) [Janda 1988].

Die Vernetzung zu Polymeren kann durch Autopolymerisation, Lichtpolymerisation oder durch Kombination beider Verfahren (dualhärtende Systeme) erfolgen [Krejci und Lutz 1986]. Grundlage all dieser Systeme ist der Zerfall von Initiator-molekülen in Radikale, welche die Polymerisation durch Reaktion mit den Doppelbindungen der Monomere aktivieren [Viohl 1985].

Die Aufgabe der Verbundphase ist es, die Einbindung der hydrophilen Füllkörper in die hydrophobe Kunststoffmatrix zu ermöglichen. Dies wird durch Silanisierung der Füller mit Hilfe von Vinyltriethoxysilanol oder 3-Methacryloyloxypropyltrimethoxysilan ermöglicht [Hellwig et al. 1999, Janda 1988, Roulet 1987].

Obwohl die mechanischen Werte wie Druckfestigkeit, Biegefestigkeit und Vickershärte durch die Silanisierung signifikant erhöht wurden und zusätzlich ein höherer Füllkörpergehalt möglich war, stellt der Verbund dennoch eine Schwachstelle von Composite-Materialien dar [Blunck und Haller 1999, Hellwig et al. 1995, Roulet 1985].

Moderne Composites stehen heute als universelles Füllungsmaterial in stopfbarer und fließfähiger Form für alle Kavitätenklassen zur Verfügung, finden aber auch als Fissurenversiegler, Stumpfaufbaumaterialien, Wurzelkanalsealer, Provisorienwerkstoffe und adhäsive Befestigungsmaterialien für Inlays und kieferorthopädische Apparaturen Verwendung [Schmalz et al. 2005].

## 1.2. Biokompatibilität

Die biologische Verträglichkeit eines Werkstoffes wird als Biokompatibilität bezeichnet. Bezogen auf die Eignung eines Werkstoffes kann zwischen chemischer Biokompatibilität, die sich auf die stoffliche Seite des Materials bezieht, und funktioneller Biokompatibilität, die die Struktur oder physikalischen Eigenschaften eines Materials betrifft, unterschieden werden.

Als Medizinprodukte unterliegen Dentalwerkstoffe strengen Auflagen hinsichtlich der Prüfung ihrer Biokompatibilität. Ein dreistufiges Testverfahren, welches auf Autian (1974) zurückgeht und von Langeland und Cotton (1980) weiterentwickelt wurde, dient der Eignungsfeststellung [Gängler et al. 2005]. Hierbei werden zunächst einfache, auf Zellkulturen basierende In-vitro-Prüfungen durchgeführt, die bei positivem Verlauf in aufwändigeren In-vivo-Prüfungen an Versuchstieren fortgeführt und verifiziert werden.

Kann der Nachweis der biologischen Unbedenklichkeit in diesen Testverfahren erbracht werden, schließen sich klinische Studien zur Bewährung des Werkstoffes unter Realbedingungen an [Schmalz et al. 2005, Welker et al. 2002].

Ziel all dieser Testmethoden ist es, die Verträglichkeit zahnärztlicher Werkstoffe in Bezug auf ihr systemisches, lokales und allergisches Potential zur Gewebeschädigung zu ermitteln [Schmalz et al. 2005].

Auch in der heutigen Zeit haben die von Paracelsus (1493-1541) postulierten toxikologischen Grundregeln wie „all Ding sind Gift und nichts ist ohn` Gift; allein die Dosis macht, das ein Ding kein Gift ist“ noch Bestand [Paracelsus, Preu, Leupoldt 1838]. Prinzipiell bergen alle in der Zahnmedizin verwendeten Füllungswerkstoffe ein toxikologisches Risiko, welches durch sachgerechte Indikationsstellung, Verwendung geprüfter Materialien und werkstoffgerechte Verarbeitung minimiert werden kann.

Dies trifft auch für die Verwendung von Composites zu. Durch unsachgemäße Verarbeitung, z.B. ungenügende Lichtpolymerisation kann es zum Anstieg des schon von vornherein bestehenden Restmonomergehaltes kommen, was sich wiederum negativ auf ihre Gewebeverträglichkeit auswirken kann. Weitere Nachteile stellen die Schrumpfung während der Polymerisation und damit verbundene strukturelle Unzulänglichkeiten dar, die eine erhöhte Bakterieninvasion und -adhäsion nach sich ziehen können.

### **1.3. Biotop Mundhöhle**

#### **1.3.1. Speichel**

Der Speichel erfüllt eine wichtige protektive Funktion für die Erhaltung der oralen Homöostase und überzieht als dünner Film (1µm) die gesamte Mundhöhlenschleimhaut. Er wird in der Hauptsache von den drei großen paarigen Speicheldrüsen Glandula parotidea, Glandula submandibularis und Glandula sublingualis produziert.

Die täglich sezernierte Gesamtmenge variiert zwischen 1,0 und 1,5 Litern [Sauerwein 1974]. Die Speichelproduktion unterliegt im Tagesablauf einem zirkadianen Rhythmus, welcher durch emotionale, psychische und Umweltfaktoren beeinflusst wird. Dabei kann man zwischen Ruhespeichel und stimuliertem Speichel differenzieren, die sich hinsichtlich ihres pH-Wertes und ihrer Pufferkapazität unterscheiden.

Speichel besteht zum überwiegenden Teil aus Wasser (99 %) sowie aus organischen und anorganischen Stoffen (1%), deren Konzentrationen individuell stark variieren. Die wichtigsten anorganischen Speichelbestandteile sind Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium, Chlorid, Phosphat, Hydrogencarbonat und Fluorid. Sein organischer Anteil setzt sich aus makromolekularen Proteinen, Glykoproteinen und Enzymen sowie aus niedermolekularen Substanzen wie Harnstoff, Harnsäure, Ammoniak und Glukose zusammen [Buddecke 1981].

Zu den wichtigsten Funktionen des Speichels gehören seine Spülfunktion und die Pufferung von Säuren durch Phosphat, Bicarbonat und Proteine. Desweiteren besitzt er antibakterielle Aktivität durch die enthaltenen Antikörper, Lysozym, Laktoferrin und Laktoperoxidase. Bestandteile wie Fluorid, Phosphat, Calcium und Statherin dienen der Mineralisation. Der Speichel leitet mit Hilfe

seiner Enzyme (Amylase, Proteasen) die Verdauung ein und erleichtert als Gleitmittel den Schluck- und Kauakt sowie die Phonetik [Marsh und Martin 1999].

### **1.3.2. Pellikel**

Durch selektive Adsorption von Proteinen und anderen Makromolekülen aus dem Speichel kommt es bereits wenige Minuten nach der Zahnreinigung an der Phasengrenze zwischen Zahnoberfläche und Mundhöhle zur Ausbildung einer Biopolymerschicht [Norde 1984], auch Pellikel oder *pellicula dentis* genannt [Dawes et al. 1963, Zuhrt 1964]. Ihre Dicke variiert lokalisationsabhängig von wenigen Nanometern bis mehreren Mikrometern [Hannig 1999].

Die Pellikel enthält neben Speichelkomponenten, wie Enzymen und Proteinen, Bestandteile bakteriellen Ursprungs und der Nahrung sowie Gewebszellreste. Ionische und hydrophobe Kräfte, Oberflächenladungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte bilden die Grundlage der Pellikelbildung [Scannapieco 1994].

Das sekundäre Schmelzoberhäutchen schützt die Zahnhartsubstanz in mehrfacher Hinsicht. Es verringert die Friktion antagonistischer Zahngruppen [Nikiforuk 1985], hemmt die Ausfällung von Kalziumsalzen an der Schmelzoberfläche [Hay 1995, Madapallimattam 1990] und wirkt kariesprotektiv, indem es die Löslichkeit der Schmelzoberfläche reduziert und den Austritt von Mineralstoffen aus der Zahnhartsubstanz unterdrückt.

Neben all den positiven Eigenschaften die der Pellikel zugesprochen werden, ist sie aber auch Wegbereiter für die orale Biofilm-Bildung, indem sie die Adhäsion von Bakterien durch Veränderung der physikalischen und

chemischen Eigenschaften der Schmelzoberfläche ermöglicht [Pruitt et al. 1969, Van Pelt et al. 1983].

Die Fähigkeit oraler Mikroorganismen an der Zahnoberfläche zu adhären, ist von großer Bedeutung für die weitere bakterielle Akkumulation bzw. Proliferation und damit auch für die Pathogenität des Zahnbelages. Den ersten Schritt der bakteriellen Kolonisation stellt die Anheftung der Mikroorganismen an die pellicelbedeckte Zahnoberfläche dar.

Die Erstbesiedler, so genannte Pionierkeime, besitzen multiple Rezeptoren für Speichelproteine und können diese spezifisch erkennen [Hasty et al. 1992]. Bei Annäherung der Mikroorganismen werden durch Konformationsänderung molekulare Bindungsstellen demaskiert, sodass eine feste Bindung an die Zahnoberfläche möglich wird [Douglas 1994].

Zu den Erstbesiedlern zählen verschiedene Streptokokken-Arten, vor allem *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis* und *Streptococcus mutans*, aber auch grampositive Stäbchenbakterien wie *Actinomyces viscosus* und *naeslundii* [Rönström et al. 1977, Socranscy et al. 1977, Theilade et al. 1982, Liljemark et al. 1986].

### **1.3.3. Plaque**

Plaque ist definiert als weicher, variabel dicker, weiß bis gelblicher, sub- und supragingivaler Biofilm, der sich weder chemisch noch mit scharfem Wasserstrahl entfernen lässt [Nolden 1994]. Sie ist ein histologisch strukturiertes Produkt bakterieller Kolonisation und Proliferation einer Vielzahl grampositiver und -negativer aerober und anaerober Bakterien [Hellwig et al. 1995]. In Abhängigkeit von der Lokalisation weist ihre bakterielle Zusammensetzung eine hohe Variabilität auf [Marsh 1992, Marsh und Bradshaw 1995].



Die Plaqueentstehung kann zeitlich in unterschiedliche Stadien eingeteilt werden. Bereits innerhalb weniger Minuten nach der Reinigung kommt es auf der Zahnoberfläche zur Entstehung des sekundären Schmelzoberhäutchens. Erste bakterielle Besiedlung durch grampositive Kokken [Kinniment et al. 1996] lässt sich nach circa 4 Stunden nachweisen [Müller 2001]. Im Verlauf von 24 Stunden kommt es zur Anlagerung weiterer grampositiver Kokken (*S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. anginosus*) und einer geringen Anzahl grampositiver Stäbchen (*A. viscosus*, *A. naeslundii*) [Weiger et al. 1997].

Die anfangs lockere Bindung der Bakterien wird später durch eine feste ersetzt [Müller 2001]. Der Anteil der Streptokokken nimmt innerhalb des zweiten bis vierten Tages zugunsten von Aktinomyzeten, gramnegativen Kokken und Stäbchen ab.

Grundlegend stellt die interbakterielle Aggregation (Koadhäsion, Koaggregation) eine wesentliche Voraussetzung für das Plaquewachstum dar. So ermöglichen Pionierbakterien durch Schaffung einer geeigneten ökologischen Basis es anderen Keimen, an der Zahnhartsubstanz zu adhären, denen dies sonst nicht möglich wäre [Rosan und Lamont 2000].

Die individuelle Wachstumsrate, Lokalisation und mikrobielle Zusammensetzung der Plaque sind abhängig von Faktoren, wie Nährstoffverfügbarkeit, Speichelzusammensetzung und -fließrate, auch Alter und systemische Erkrankungen des Wirtes sind von Bedeutung.

Der Plaquebiofilm ist nach circa 10-14 Tagen ungestörter Entwicklung vollständig ausgereift. Innerhalb dieses Zeitraumes verändert sich seine mikrobielle Zusammensetzung milieubedingt kontinuierlich. Durch Absinken des Plaque-pH-Wertes und Abnahme der Sauerstoffspannung mit zunehmendem Alter beziehungsweise Dicke des Biofilmes, kommt es zur Verschiebung der Bakterienflora zugunsten der Anaerobier [Marsh und Martin 1999].

Die gereifte Plaque weist eine heterogene Struktur auf, in der sich Bakterienkolonien übereinander lagern, die durch extrazelluläre Polysaccharide

zusammen gehalten werden. Sie bilden dabei auf der Oberfläche pilzähnliche Strukturen, die bis in die wässrige Phase reichen. Der Biofilm ist von Poren und Kanälen durchzogen, welche einen konvektiven Stofftransport in tiefere Schichten des Biofilmes gestatten [Costerton und Lewandowski 1995]. Das Vorhandensein dentaler Plaque an sich, stellt ein physiologisches Merkmal dar [Seymour und Heasman 1995, Bradshaw et al. 1996]. Ihr wird sogar eine gewisse Schutzwirkung vor Besiedlung der Mundhöhle durch pathogene Fremdkörper zugesprochen [Costerton et al. 1995, Fine 1995, Bradshaw und Marsh 1999]. Erst ab einem bestimmten Reifegrad und geänderter bakterieller Zusammensetzung kommt es zu einem pathologischen Milieuwechsel in der Plaque [Marsh 1999].

#### **1.3.4. Karies**

Bei ausreichender Substratzufuhr in Form von niedermolekularen Kohlenhydraten, produzieren die Mikroorganismen organische Säuren als Stoffwechselprodukte. Die Akkumulation dieser bewirkt das Absinken des pH-Wertes in den sauren Bereich [Pratten und Wilson, 1999]. Aufgrund der gestiegenen Plaquemasse kann dies nicht mehr durch den Speichel abgepuffert werden. Es kommt in der Folge zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Re- und Demineralisation zugunsten der Demineralisation [Marsh und Bradshaw 1995, Bowden und Hamilton 1998].

Diesen destruktiven Einflüssen stehen ausgeprägte Resistenzfaktoren gegenüber. Als wichtigster Schutzfaktor ist hier der Speichel anzusehen, welcher vor allem mit seiner Spülfunktion zur Neutralisation und Remineralisation beiträgt. Zusätzlich leistet er durch enthaltene antibakterielle Enzyme (Lactoferrin, Lysozym, Peroxidase), Lipide und sekretorische Antikörper einen Beitrag zur Immunabwehr.

Der Kariesentstehung kann nachweislich auch durch eine Nahrungsumstellung entgegengewirkt werden. In verschiedenen Studien wurde dem Zusammenhang zwischen Zuckerkonsum und Kariesentwicklung auf den Grund gegangen. So ergab sich beispielsweise aus der Vipeholm-Studie, dass die Kariogenität der Kohlenhydrate weniger von ihrer absoluten Menge, als vielmehr von ihrer Zufuhrhäufigkeit im Tagesverlauf abhängt [Gustafsson et al. 1953]. Dass die Entstehung kariöser Läsionen mit dem Austausch von Zucker durch den Zuckeraustauschstoff Xylit praktisch verhindert werden kann, wurde in den Turku-Studien nachgewiesen [Scheinin und Mäkinen 1975].

### **1.3.5. Relevante orale Mikroorganismen**

Als eine Art natürliches Biotop bietet die Mundhöhle über 300 verschiedenen Arten von Mikroorganismen eine Lebensgrundlage [Lehmann 1991].

Von besonderer kariogener Bedeutung sind hierbei die Vertreter der zahlenmäßig stark vertretenen Gattung *Streptococcus*. Sie stellen ca. die Hälfte der Speichelorganismen und ein Viertel der Plaqueflora dar [König 1987].

Diese aerotoleranten Keime zeichnen sich dadurch aus, dass sie auf nahezu jeder Oberfläche adhärieren und sich rasch an Milieuänderungen anpassen können.

#### ***Streptococcus mutans***

Obwohl Karies grundsätzlich durch eine ganze Reihe azidogener Mikroorganismen verursacht werden kann, spielt in vivo *Streptococcus mutans* (aus der Gruppe der Mutans-Streptokokken) eine zentrale Rolle. Unter anaeroben Bedingungen verstoffwechselt dieser Nahrungskohlenhydrate zu

organischen Säuren, wie Milch -, Essig -, und Propionsäure wohingegen über aerobe Glycolyse ausschließlich Milchsäure entsteht [Marsh und Martin 1999]. Die Synthese extrazellulärer Polysaccharide erlaubt eine feste Anhaftung an Zahnoberflächen während die Produktion von intrazellulären Polysacchariden als Nahrungsreservoir für Zeiten geringer Substratzufuhr dient. Im Gegensatz zu vielen anderen Mikroorganismen weist *S. mutans* eine ausgeprägte Säurebeständigkeit auf, die ihn selbst unter sauren Bedingungen ( $\text{pH} < 5,5$ ) in der Plaque existieren und Säure produzieren lässt. Dabei schleust *S. mutans* gegen ein Konzentrationsgefälle Säure aktiv aus dem Zellinneren aus [Marsh und Martin 1999].

Krasse stellte 1986 die wichtigsten Thesen zur Rolle von *S. mutans* bei der Kariesentstehung wie folgt zusammen:

Im Experiment kann Karies durch *S. mutans* induziert werden. Das Auftreten von Karies korreliert mit der Anwesenheit von *S. mutans* in Speichel und Plaque. Die Besiedlung der Zahnhartsubstanz mit *S. mutans* geht meist der Entwicklung einer Karies voraus und ist auf demineralisierten Zahnflächen höher als auf gesunden. Bei Patienten mit hoher Kariesprävalenz sind tendenziell mehr Zahnflächen mit *S. mutans* besiedelt als bei Patienten mit niedriger. Die Kariesinzidenz kann durch gegen *S. mutans* gerichtete antibakterielle Maßnahmen drastisch reduziert werden.

Obwohl *S. mutans* nicht der einzige kariesauslösende Keim ist, wird er doch aus den genannten Gründen als wesentlicher Initiator der Karies angesehen [Nikiforuk 1985].

### ***Streptococcus sanguinis***

*S. sanguinis* gehört neben *S. milleri*, *S. mitis*, *S. mutans* und *S. salivarius* der sogenannten Viridans-Gruppe an [Müller 1989]. Die Streptokokken der

Sanguinis-Gruppe gelten als bedeutendste und gleichfalls früheste Pellikelbesiedler [Marsh und Bradshaw 1993, Liljemark et al. 1997]. Diese Bakterien synthetisieren extrazelluläre Polysaccharide, die im Gegensatz zu denen der Mutans-Gruppe wasserlöslich und damit primär nicht plaquefördernd sind. Sie begünstigen als Substrat-Lieferant die Kolonisierung der Mutans-Streptokokken und fördern ihr Wachstum [Marsh und Martin 1999]. Optimale Kultivierungsbedingungen liegen für *S. sanguinis* in einem pH-Bereich von 7,2 bis 7,8 und einem Temperaturoptimum von 37 °C vor. Da es sich um fakultative Anaerobier handelt, begünstigt eine mit Kohlendioxid angereicherte Atmosphäre das Kulturwachstum.

### ***Actinomyces viscosus***

Hierbei handelt es sich um grampositive, gerade oder leicht gebogene 0,1-2µm dicke Stäbchen bzw. um schlanke, leicht gewellte bis 1µm dicke Fadenbakterien mit echten Verzweigungen. Sie weisen ein kapnophiles Wachstum auf, sind unbeweglich und nicht säurefest. *A. viscosus* benötigt zur Vermehrung organisch gebundenen Stickstoff, ist ähnlich wie *S. sanguinis* auf das Vorhandensein solider Oberflächen angewiesen und gilt ebenfalls als ein Erstbesiedler der Zahnhartsubstanz [Dummer, Harrison 1982].

Als fakultativer Anaerobier wächst auch *A. viscosus* besonders gut unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Durch die Produktion von Urease schützt sich dieses Bakterium gegen zu starke Ansäuerung seines Umfeldes. Geschieht dies unter physiologischen Bedingungen nur in geringen Mengen, so kann bei erhöhtem Substrat- bzw. niedrigem Stickstoffangebot die Ureasefreisetzung um das 50fache gesteigert werden, was ihm kariesprotektive Wirksamkeit verleiht. Er wird ätiologisch mit Karies, insbesondere Wurzelkaries, sowie mit

Parodontalerkrankungen und Gingivitis assoziiert. Außerdem begünstigt er die Anlagerung des parodontopathogenen Keims *Porphyromonas gingivalis* durch Koaggregation und fördert darüber hinaus dessen Wachstum durch von ihm freigesetzte Succinate [Köhler und Mochmann 1975].

### ***Porphyromonas gingivalis***

*Porphyromonas gingivalis* ist ein Vertreter aus der großen heterogenen Familie der Bacteroidaceae. Es handelt sich dabei um ein gramnegatives, unbewegliches, obligat anaerobes Bakterium, das sich mikroskopisch als sporenloses, oft sehr kurzes, kokkoides Stäbchen darstellt. Seine Energiegewinnung stellt *P. gingivalis* nicht durch die Verstoffwechslung von Kohlenhydraten, sondern durch die proteolytische Fermentation von Aminosäuren sicher [Marsh und Martin 1999].

Aufgrund optimaler Wachstumsbedingungen, wie geringem Sauerstoffpartialdruck, niedrigem Redoxpotential und ausreichender Stickstoffkonzentration ist dieser Keim vorzugsweise im Rahmen einer Gingivitis in subgingivalen Arealen anzutreffen. Seine Virulenzfaktoren machen es der Immunabwehr unmöglich, eine Infektion mit *P. gingivalis* vollständig unter Kontrolle zu bringen. Hat sich der Keim erst einmal in den parodontalen Taschen manifestiert, so ist er durch rein lokal-mechanische Parodontalbehandlung nicht vollständig zu eliminieren, sondern bedarf zusätzlicher chemotherapeutischer Maßnahmen [Chan und Slots 1999].

Unter physiologischen Bedingungen ist dieser Keim nicht in der Mundflora anzutreffen, kommt aber im Speichel und auf den Schleimhäuten in transienter Form vor.

***Fusobacterium nucleatum***

Fusobakterien stehen der Familie der Bacteroidaceae nahe. Häufigster in der Mundhöhle vorkommender Vertreter dieser Gattung gramnegativer, obligater Anaerobier, ist *Fusobacterium nucleatum*. Es kommt in großer Zahl in subgingivaler Plaque vor und kann sich sowohl kommensal verhalten, als auch ätiologisch mit Parodontalentzündungen assoziiert sein. Ähnlich wie bei *P. gingivalis* erfolgt seine Energiegewinnung vorwiegend durch den Abbau von Aminosäuren. Kohlenhydrate können durch *F. nucleatum* nur in geringem Maße katabolisiert und zur Synthese intrazellulärer Polysaccharide aufgenommen werden. Aufgrund seiner Fähigkeit mit nahezu allen oralen Bakterienspezies koaggregieren zu können, nimmt es bei der Biofilm-Bildung eine wichtige Vermittlerrolle zwischen Pionier- und Nachfolgerkeimen ein. Erst durch die Kolonisierung dieses Keimes wird es an sich schlecht haftenden Bakterien ermöglicht, zu adhären und ihre pathogenen Eigenschaften zu entfalten [Berger 1981].

***Candida albicans***

Diese dimorphe Pilzspezies kann bei 25-50% der Bevölkerung in Mundhöhlenabstrichen nachgewiesen werden. Sie tritt in zweierlei Gestalt, als Sprosspilz und in der Hyphenphase in Erscheinung. Kohlenhydrate werden von *C. albicans* als Nahrungsgrundlage in großer Anzahl oxidativ verwertet. Ihr anaerober Metabolismus, die Gärung, ist auf Glukose, Maltose und in geringem Maße auch Galaktose beschränkt und stellt somit keine Nahrungskonkurrenz für den kariogenen Keim *S. mutans* dar [Holmes et al 1995]

*C. albicans* hat die Eigenschaft mit oralen Streptokokken, wie *S. gordonii*, *S. oralis* und *S. sanguinis* [Holmes et al. 1995] sowie mit oralen *Actinomyces*-Arten

[Grimaudo und Nesbitt 1996] zu koaggregieren. Vom wirtseigenen Immunsystem wird *C. albicans* verzögert oder nicht erkannt, da dieser Pilz durch Mutation seine Struktur laufend ändern kann (phänotypisches „switching“) [Marsh und Martin 1999].

Trotz seines Vorkommens in der Tiefe kariöser Läsionen und seiner Fähigkeit einige Zucker in Säuren zu metabolisieren, wird *C. albicans* nur eine geringe kariesätiologische Bedeutung beigemessen [Costerton et al 1995].



#### **1.4. Grundprinzipien plaquehemmender Füllwerkstoffe**

Prinzipiell gibt es drei verschiedene Varianten antimikrobielle Effekte in dentalen Füllungsmaterialien hervorzurufen.

Es besteht die Möglichkeit, karieshemmende Substanzen fest in den Füllwerkstoff einzubinden (non-agent-releasing) oder aber diese so zuzugeben, dass sie während ihrer Verweildauer in der Mundhöhle freigesetzt werden (agent-releasing). Ein anderer Ansatz besteht in der Modifikation der Oberflächenenergie der Materialien, um die elektrostatische Adhäsion von Bakterien zu erschweren [Quirynen und Bollen 1995]. Durch ihre Reduktion kommt es zur Selektion von Mikroorganismen und verminderter Plaqueretention [Quirynen 1994].

Bei der Freisetzung karieshemmender Substanzen kann zwischen einem System mit abnehmender und einem mit konstanter Wirkstofffreisetzung unterschieden werden [Rawls 1991]. Beide Systeme bergen die potentielle Gefahr, die Biokompatibilität des Werkstoffes durch Diffusion in benachbarte Gewebe (Pulpa und Parodont) einzuschränken und die Werkstoffeigenschaften qualitativ zu beeinträchtigen. Aufgrund der abnehmenden Wirkstoffkonzentration kommt es zusätzlich zu einer zeitlichen Limitierung der kariesprotektiven Wirkung [Imazato et al. 1994].

Die Problematik bei den non-agent-releasing Füllwerkstoffen besteht in der oftmals verminderten Wirksamkeit, bedingt durch die feste Bindung der antimikrobiellen Komponente [Ebi et al 2001].

Bei handelsüblichen Composites weisen weder Fülleranteil noch Matrix antibakterielle Eigenschaften auf, so dass eine ungehemmte Besiedlung durch Mikroorganismen möglich ist. Die erhöhte Plaqueanlagerungs-Tendenz von Kunststoffen und Composites im Vergleich zu anderen Füllungswerkstoffen wird durch verschiedene Studien belegt [Dummer und Harrison 1982, Kramer et al. 1990, Skjörland und Sönju 1982, Svanberg et al. 1990]. Da eine vermehrte

Plaquanlagerung mit einem erhöhten Sekundärkariesrisiko [Imazato et al. 1994] und einem meist vorzeitigen Füllungs austausch einhergeht [Friedl et al. 1995], ist die Entwicklung antibakterieller Composites aus kariespräventiver Sicht wünschenswert.

Unterschiedliche antimikrobielle Substanzen wurden bereits auf ihre Wirksamkeit nach ihrem Zusatz zu konventionellen Composites untersucht. Dabei handelt es sich neben Fluoriden auch um silberhaltige Verbindungen und verschiedene Monomere, wie MDPB.

Es werden beispielsweise drei verschiedene Ansätze Fluorid an Monomere zu binden von Peutzfeldt [1997] beschrieben: ein Methacrylyl-Fluorid, Acryl-Amin-HF-Salz [Rawls 1987] und ein Acryl-Amin-BF<sub>3</sub>-Lewis-Salz [O`Connell 1988]. Diese werden kovalent in das Polymernetzwerk integriert und können als Copolymere mit den Dentalmonomeren reagieren. Zur Freisetzung von Fluorid kommt es durch eine chemische Reaktion infolge Wasseraufnahme, die die strukturelle Integrität aufrechterhalten und zu keinerlei Beeinträchtigung der werkstoffkundlichen Eigenschaften führen soll.

Ein weiterer viel versprechender Ansatz Composites mit antimikrobiellen Eigenschaften zu versehen, ist die Zugabe des Monomers Methacrylyloxydodecylpyridinbromid (MDPB). Das Syntheseprodukt aus Dodecylpyridinbromid und einer Methacrylyl-Gruppe wird als Copolymer kovalent in die Matrix konventioneller Dentalmonomere eingebunden. Ohne sich negativ auf die Polymerisation oder mechanischen Eigenschaften der Composites auszuwirken, inhibierte MDPB das Wachstum von *Streptococcus mutans* nachweislich. Die Zugabe von 0,4-0,5% MDPB verändert das Wasseraufnahmeverhalten von Composites auf Bis-GMA-Basis nicht, kann aber zu einer vermehrten Verfärbungstendenz führen. Durch die feste Einbindung von MDPB in die Polymermatrix wird eine permanente kariespräventive Wirkung durch Hemmung der bakteriellen Adhäsion an der Füllungsoberfläche erwartet [Imazato 1994, 1995, 1999].

Untersuchungen von Kowitz belegten, dass der Zusatz antibakterieller Substanzen, wie beispielsweise Halo (Halo Scientific, Monterey, MA) in Konzentrationen größer einem Masseprozent zum Composite Herculite (Firma Kerr) deutliche antibakterielle Wirkung bei gleichzeitiger Farbstabilität auch nach Alterung zeigt [Kowitz 1999]. In einem Alterungsversuch konnte Vaidyanathan (1999) keine Differenzen zwischen Composites mit ein Masseprozent Halo Zusatz und ohne Zusatz hinsichtlich ihrer Farbstabilität nachweisen. In Agardiffusionsversuchen konnte er eine mit steigender Halo-Konzentration zunehmende Größe der Bakterien-Inhibitionszone ermitteln, die über die Versuchsdauer konstant blieb [Vaidyanathan 1999].

Trotz einiger Erfolge bei der Entwicklung von Composites mit antimikrobiellen Eigenschaften, stellen die Dauerhaftigkeit der Wirkung, die Erzielung therapeutisch bzw. klinisch wirksamer Effekte sowie die Frage der Freisetzung von Zusätzen bzw. deren Biokompatibilität noch Schwerpunkte der weiteren Forschung dar.

## 2. Ziele der Arbeit

Die bakterielle Besiedlung von Füllwerkstoffen begünstigt die Entstehung von Karies und möglicherweise Parodontitis.

Das darin begründete Interesse, Materialien mit Eigenschaften zu entwickeln, die den Ansprüchen der modernen zahnärztlichen Therapie genügen, gewinnt immer mehr an Bedeutung.

Um die bakterielle Besiedlung von Füllungsmaterialien und damit das Sekundärkariesrisiko zu reduzieren, wird an der Entwicklung von pellicel- und plaqueabweisenden Werkstoffen gearbeitet.

Im Einzelnen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Weist Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat als reiner Wirkstoff antibakterielle Wirkung auf?
2. Wird das bakterielle Wachstumsverhalten durch Freisetzung des Wirkstoffes aus dem experimentellen Kunststoff quantitativ und qualitativ beeinflusst?
3. Wirkt der Zusatz hemmend auf die mikrobielle Adhäsion an der Prüfkörperoberfläche?
4. Ist langfristig eine BPH-vermittelte Reduktion des Bakterienwachstums feststellbar?

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Werkstoffe**

##### ***Composite***

In der vorliegenden Arbeit kam aufgrund seiner guten Durchmischbarkeit das fließfähige Nano-Hybrid-Composite Grandio Flow<sup>®</sup> (VOCO, Cuxhaven) zur Anwendung. Dieses lichthärtende Material besteht aus einer Methacrylatmatrix (Bis-GMA, TEGDMA, HEDMA), in die anorganische nanoskalige Füllstoffe (80Gew.%) eingebracht wurden.

Die oberflächenmodifizierten Nanopartikel sind laut Herstellerangaben gleichmäßig in die Harzmatrix eingebettet und sollen als hochwirksame Quervernetzer dienen. Als Ergebnis dieser Technologie resultiert ein hinsichtlich Festigkeit und Schrumpfung mit hochviskösen Composites vergleichbares Füllungsmaterial. Von der Firma VOCO empfohlene Anwendungsgebiete umfassen minimalinvasive Kavitäten, erweiterte Fissurenversiegelungen, keilförmige Defekte bzw. Zahnhalskaries, Reparaturen von Füllungen und Verblendungen, Befestigung lichtdurchlässigen Zahnersatzes sowie das Auskleiden von Kavitäten im Sinne der CBF-Technik (composite-bonded-to-flowable).

**Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat**

Als potentiell antimikrobiell wirksames Agens wurde Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat (Produktnummer: 496758) der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) verwendet (Abb. 1). Dieses, bei Raumtemperatur flüssige Material, zeichnet sich durch drei funktionelle Gruppen aus. Während die zwei enthaltenen Methacrylat-Gruppen der Einbindung in die Composite-Matrix dienen, soll die Hydroxyl-Gruppe die antimikrobielle Wirkung vermitteln.

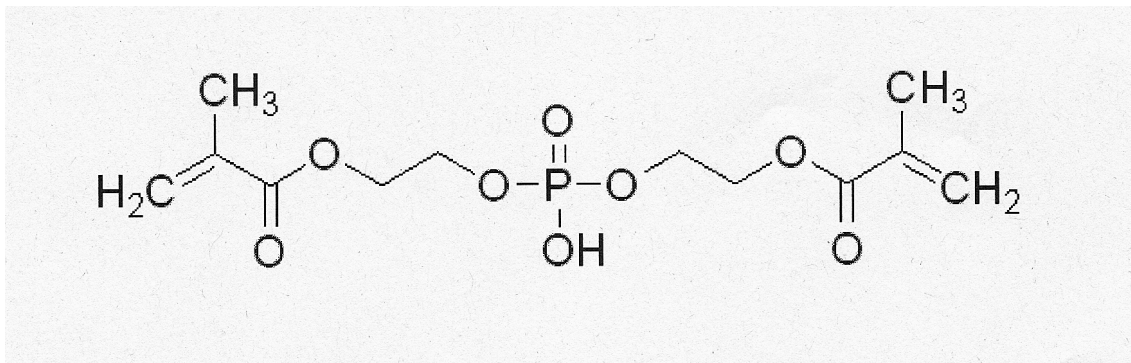


Abb. 1: Strukturformel Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat

### 3.2. Prüfkörperherstellung und -lagerung

Die Anfertigung des experimentellen Werkstoffes erfolgte unter sterilen Bedingungen durch homogene Mischung von 95 Gew.% Grandio Flow und 5 Gew.% Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat in einem lichtundurchlässigen Gefäß.

Im Rahmen dieser In-vitro-Studie wurden 16 Prüfkörper aus unbehandeltem Composite-Material, sowie weitere 16 aus dem experimentellen Werkstoff unter Einhaltung der vom Hersteller empfohlenen Verarbeitungshinweise hergestellt. Nach dem Aufbringen von Messingringen (Durchmesser 5 mm, Höhe 2 mm) auf Glasobjektträger wurden diese randbündig befüllt, mit einem zweiten Objektträger abgedeckt und anschließend im Polymerisationsofen (Dentacolor XS der Firma Kulzer) jeweils 180 s von beiden Seiten lichtgehärtet.

Die entstandenen 32 Prüfkörper wurden 10 Minuten in 70%igem Alkohol desinfiziert und anschließend mit 500 ml Aqua dest. abgespült.

Zur Alterung wurden die Prüfkörper mit je 1,0 ml PBS bedeckt und anschließend bei 37°C inkubiert, wobei Flüssigkeitsverluste regelmäßig durch Aqua dest. ausgeglichen wurden.

### 3.3. Mikroorganismen, Nährmedien und synthetischer Speichel

Die Auswahl der in diesen Versuchsreihen verwandten Keime erfolgte aufgrund ihrer klinischen Relevanz hinsichtlich der Karies- und Parodontitisätiologie.

Es kamen die in Tabelle 1 aufgezeigten Stämme zur Anwendung:

Tab. 1: verwendete Stämme

Spezies	Katalogisierung
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175
<i>Streptococcus sanguinis</i>	ATCC 10556 1602 KHS (klinisches Isolat)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277 D5-2-2 (klinisches Isolat)
<i>Actinomyces viscosus</i>	ATCC 15987
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATCC 25586
<i>Candida albicans</i>	ATCC 76615

Um ein optimales Keimwachstum zu gewährleisten, wurden die Streptokokken-Stämme vor Versuchsbeginn frisch überimpft und 24 Stunden bei 37°C aerob kultiviert. Aufgrund ihrer Generationsdauer verlängerte sich bei *P. gingivalis*, *A. viscosus* sowie *C. albicans* die Kultivierung auf 48 Stunden. Für die Anzüchtung der Keime wurde jeweils das optimale Nährmedium ausgewählt, welche in den Tabellen 2 und 3 dargestellt sind.



Tab. 2: verwendete flüssige Nährmedien

Spezies	Nährmedium und Hersteller
<i>Streptococcus mutans</i>	Herz-Hirn-Glucose-Bouillon (Oxoid, Basinstoke, UK)
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Herz-Hirn-Glucose-Bouillon (Oxoid, Basinstoke, UK)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Schaedler-Bouillon mit 8% Schafblut (Oxoid, Basinstoke, UK)
<i>Actinomyces viscosus</i>	Schaedler-Bouillon mit 8% Schafblut (Oxoid, Basinstoke, UK)
<i>Candida albicans</i>	Sabouraud-Bouillon (Immunpräparate Berlin, D)

Tab. 3: verwendete feste Nährmedien

Spezies	Nährmedium und Hersteller
<i>Streptococcus mutans</i>	Columbia-Agar mit 8% Schafblut (Oxoid, Basinstoke, UK)
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Columbia-Agar mit 8% Schafblut (Oxoid, Basinstoke, UK)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Schaedler-Agar mit 8% Schafblut (Oxoid, Basinstoke, UK)
<i>Actinomyces viscosus</i>	Schaedler-Agar mit 8% Schafblut (Oxoid, Basinstoke, UK)
<i>Candida albicans</i>	Sabouraud-Agar (BioMerieux, Marcy l'Etoile, F)

Die Inkubationszeit der Streptokokken betrug sechs Stunden in flüssigem sowie 48 Stunden auf festem Nährmedium.

Die Anaerobier und *C. albicans* benötigten in flüssigem Nährmedium 24 Stunden Inkubationszeit. Auf festem Nährboden wurden die Anaerobier sieben Tage und *C. albicans* 48 Stunden kultiviert.

### ***Zusammensetzung des synthetischen Speichels***

Die Herstellung des im Anlagerungsversuch verwandten Kunstspeichels erfolgte in Anlehnung an Böning. Die genaue Zusammensetzung ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Tab. 4: Zusammensetzung synthetischer Speichel

Bestandteil	Menge
Muzin	4,0 g
Natriumhydrogencarbonat	1,2 g
Kaliumchlorid	1,2 g
Kaliumthiocyanat	0,1 g
Magnesiumchloridhexahydrat	0,05 g
Calciumchloriddihydrat	0,15 g
Harnstoff	0,3 g
Harnsäure	0,05 g
Aqua dest.	1000 ml

### 3.4. Prüfverfahren

#### 3.4.1. Wirkung von Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat auf das Wachstum von Mikroorganismen

##### *Verdünnungsreihen*

Ziel dieser Versuche war es, die antibakteriellen Eigenschaften des reinen Zusatzes in Bezug auf das Keimwachstum nachzuweisen.

Die Verifizierung der Wirkung von Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat auf die ausgewählten Spezies erfolgte anhand von Suspensionen in absteigenden Konzentrationen von 10% bis 0,01%. Zunächst wurde eine Stammlösung, die anteilig 10% BPH, 1% DMSO und 89% PBS enthielt, angefertigt. DMSO diente in 1%iger Konzentration als Lösungsvermittler zwischen dem lipophilen BPH und dem hydrophilen PBS.

Ausgehend von dieser Stammlösung wurde bei gleichbleibendem DMSO-Anteil der BPH-Anteil systematisch verringert, so dass letztendlich, wie in Tabelle 5 dargestellt, zwölf Konzentrationen einschließlich einer Kontrolle (1%iges DMSO-PBS-Gemisch) zur Verfügung standen.

Tab. 5: verwendete BPH-Konzentrationen

BPH-Konzentration in %											
10	5	2,5	1,25	0,64	0,32	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01	K0

### ***Keimsuspensionen***

Die Keimkulturen wurden mittels Watteträger vom festen Nährmedium entnommen und in 3 ml PBS solange gelöst, bis die Trübung der Lösung dem entsprechenden Mac Farland Standard entsprach. Der Abgleich der Aerobier- und *Candida albicans*-Keimsuspensionen erfolgte mit dem MacFarland Standard 1 ( $3 \times 10^8$  Keime/ml) und die der Anaerobier mit MacFarland Standard 4 (entspricht  $1,2 \times 10^9$  Keime/ml). Durch Zugabe von 200  $\mu$ l Keimsuspension zu 20 ml Nährbouillon entstand ein 1%iges Keim-Nährbouillongemisch, welches für die Anaerobier-Kultivierung zusätzlich mit 2 ml Schafblut versetzt wurde.

### ***Versuchsablauf***

Die Anfertigung einer homogenen Mischung aus Bisphosphat- und Keim-Nährbouillonlösung geschah durch Zugabe von je 20  $\mu$ l Bisphosphat-Suspension zu je 180  $\mu$ l Keim-Nährbouillon.

Dies wurde in einer Mikrotiterplatte für jede der zwölf Konzentrationen (10% - 0,01% + KO) in achtfacher Weise durchgeführt, so dass achtmal zwölf Proben resultierten. Die Inkubation der fertig bestückten Mikrotiterplatte erfolgte bakterienspezifisch.

Die Inkubationszeit der Streptokokken betrug unter aeroben Bedingungen bei 37°C 6 Stunden und die von *Candida albicans* 24 Stunden. *Porphyromonas gingivalis* und *Actinomyces viscosus* wurden einer vierundzwanzigstündigen Inkubation bei 37°C in anaerobem Milieu unterzogen.

### 3.4.2. Wirkung von Werkstoffeluat auf das Wachstum von Mikroorganismen

#### *Eluation*

Zielstellung dieser Versuchsreihe war es, eine durch Freisetzung von Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat aus dem modifizierten Composite hervorgerufene antimikrobielle Wirkung nachzuweisen.

Dazu wurden die nach der Herstellung desinfizierten, mit Aqua dest. abgespülten Prüfkörper in je 1,5 ml PBS eluiert und 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank gelagert.

Nach Verstreichen der Inkubationszeit und Abpipettieren der Eluate erfolgte die Lagerung der Proben bis zur weiteren Verwendung in verschließbaren Eppendorfgefäßen im Gefrierschrank bei -20°C.

Für jeden Versuchsdurchlauf wurde eine Eluatprobe unter gleichmäßiger Durchmischung bei 37°C aufgetaut und durch Zusatz von PBS eine absteigende Verdünnungsreihe inklusive Kontrolle angefertigt (Abb. 2), sodass die in Tabelle 6 aufgeführten Konzentrationen resultierten.

Tab. 6: verwendete Eluat-PBS-Konzentrationen

Konzentrationen Eluat : PBS							
1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	KO

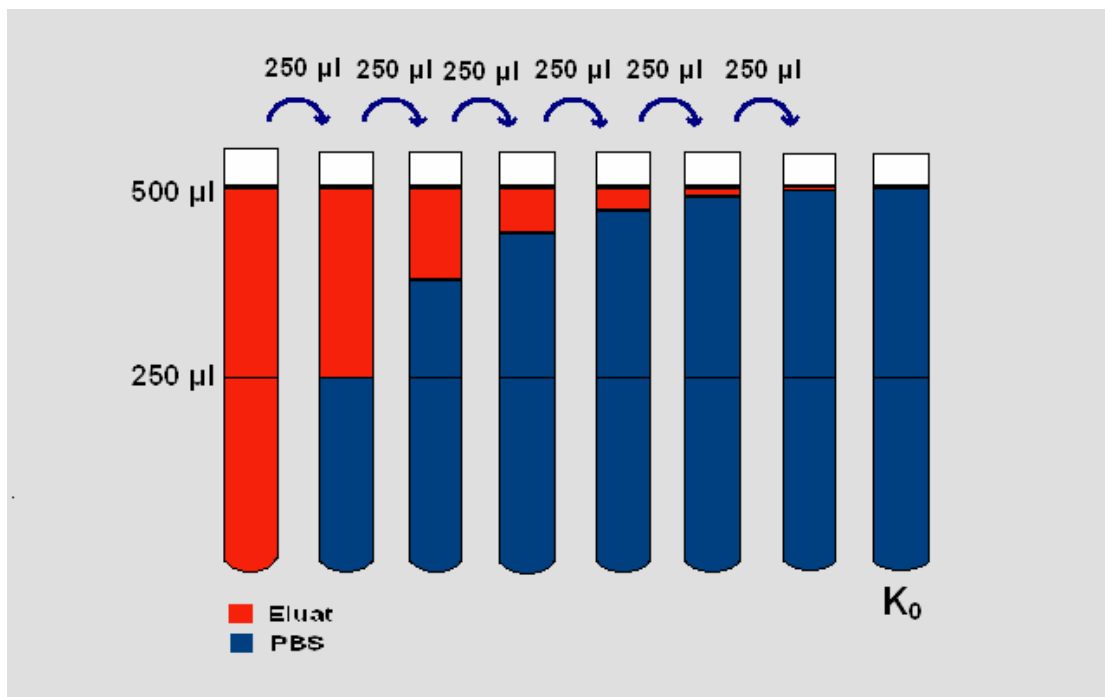


Abb. 2: Schema der Eluat-PBS-Verdünnungsreihe

### ***Keimsuspension***

Mittels Watteträger erfolgte die Entnahme der Bakterien vom festen Nährmedium und anschließende Lösung in PBS bis die Trübung der Suspensionen dem jeweiligen Mac Farland Standard entsprach. Die Aerobier- und *Candida albicans*-Keimsuspensionen wurden mit dem Mac Farland Standard 1 ( $3 \times 10^8$  Keime/ml) und die der Anaerobier mit Mac Farland Standard 4 ( $1,2 \times 10^9$  Keime/ml) abgeglichen. Ein 1%iges Keim-Nährbouillon-Gemisch entstand durch Zugabe von 20 µl Keimsuspension zu 20 ml Nährbouillon.

### ***Versuchsablauf***

Je Eluatkonzentration wurden acht Proben zu 20  $\mu$ l in eine Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend mit je 180  $\mu$ l Keim-Nährbouillonlösung zu einer homogenen Suspension vermischt. Die Inkubation der befüllten Mikrotiterplatte erfolgte entsprechend der keimspezifischen Anforderungen.

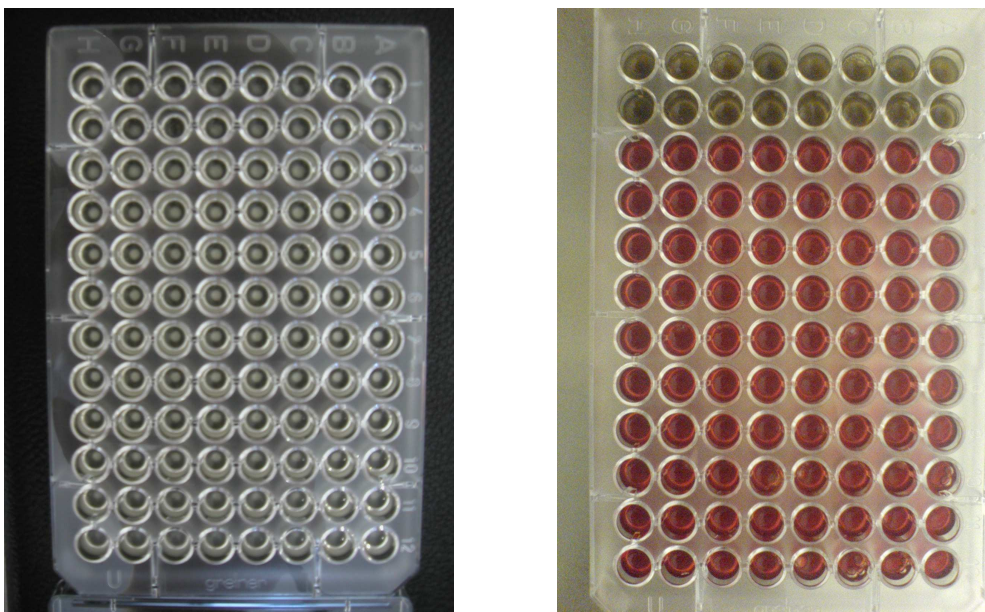


Abb. 3 und 4: mit Proben beschickte Mikrotiterplatten

Nach Ablauf der Inkubationszeit und erneuter Durchmischung für 20 s mittels Vortex wurden je 10  $\mu$ l Suspension entnommen, auf dem entsprechenden Nährmedium ausgespatelt und bei 37 °C inkubiert.

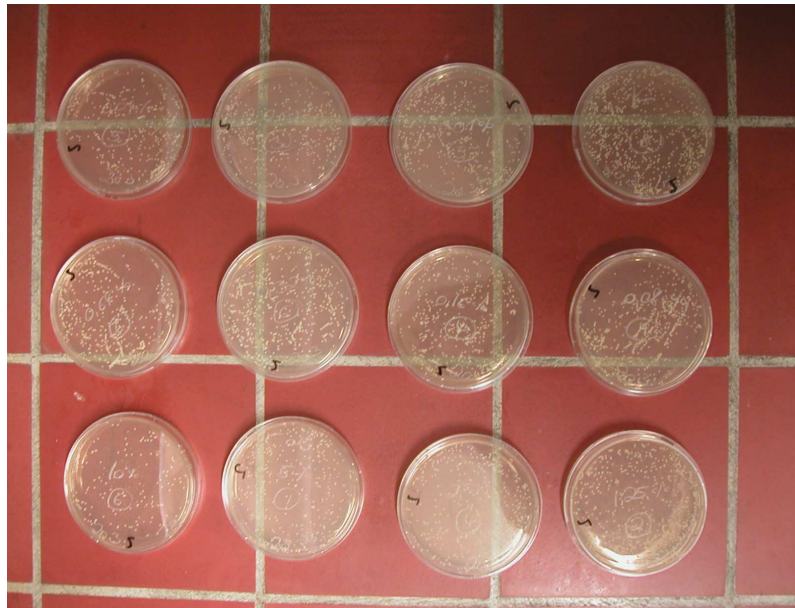


Abb. 5: Candida-Kulturen auf Sabouraud-Agar

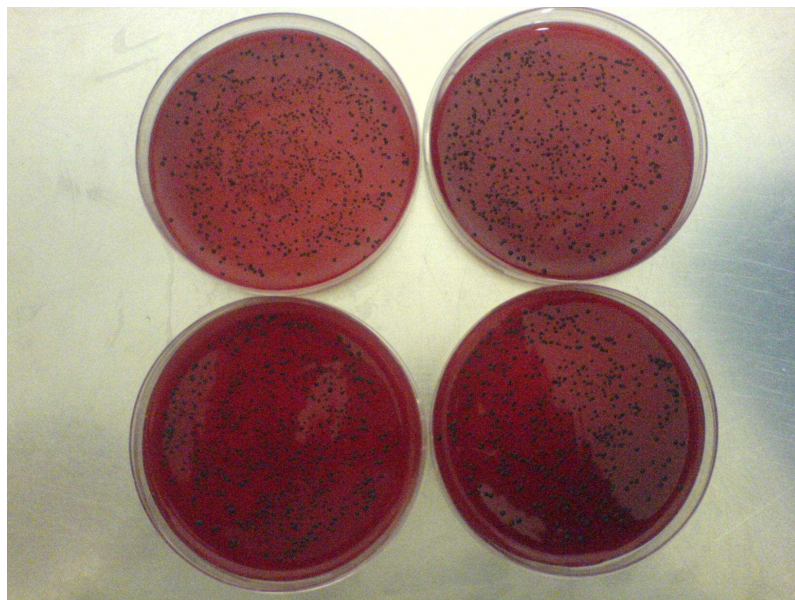


Abb. 6: Porphyromonas gingivalis auf Schaedler-Agar



### **3.4.3. Versuche zur Anlagerung der Mikroorganismen**

Um Rückschlüsse auf eine langfristige Wirkung des experimentellen Werkstoffes ziehen zu können, wurden die im Folgenden beschriebenen Versuche anhand frisch angefertigter und gealterter Prüfkörper durchgeführt. Bei den verwendeten 32 Prüfkörpern handelte es sich um gealterte und neue mit und ohne Zusatz, in jeweils gleicher Anzahl.

#### ***Monokultur***

Die Durchführung dieses Anlagerungsversuches geschah anhand von *S. mutans* ATCC 25175 als wichtigstem kariogenem Erreger.

Unmittelbar vor der Versuchsdurchführung erfolgte die Desinfektion aller Prüfkörper für 20 Minuten in je 2 ml 70%igem Alkohol. Es schlossen sich die Spülung mit Aqua dest. und Inkubation in je 2 ml künstlichem Speichel bei 37°C an.

Nach Ablauf einer Stunde wurde der Speichel abpipettiert und durch 2 ml Keim-Nährbouillongemisch, bestehend aus 1% Keimsuspension und 99% Schaedlerbouillon, ersetzt.

Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei 37°C erfolgte die Durchmischung des Überstandes, eine hundertfache Verdünnung mit PBS und anschließende Ausspatelung 10 µl dieser Lösung auf Columbiaagar.

Die keimbesickten Nährböden wurden für weitere 48 Stunden zur Inkubation im Brutschrank aufbewahrt.

### ***Mischkultur***

Die Mischkultur-Anlagerung wurde anhand von *A. viscosus* ATCC 15987, *F. nucleatum* ATCC 25586, *P. gingivalis* D-5-2-2 und *S. sanguinis* (1602, KHS) und nachfolgend aufgeführten Bouillons, die in stets gleicher Menge (2 ml) zugegeben wurden, durchgeführt.

In den Anaerobier-Nährbouillon-Ansätzen waren 88,9% Schaedlerbouillon, 10% Schafblut, 1% Keimgemisch und 0,1% Vitamin K enthalten. Die Mischung der Ansätze von *A. viscosus* und *F. nucleatum* geschah im Verhältnis 5:4.

Für die Aerobier-Kultur wurde ein 1%iges Keim-Schaedlerbouillon-Gemisch hergestellt.

Alle Prüfkörper, gealterte sowie neu angefertigte, wurden vor Versuchsbeginn in 70%igem Alkohol über einen Zeitraum von 20 Minuten desinfiziert und danach mit Aqua dest. abgespült.

Sodann wurden die Prüfkörper für eine Stunde in künstlichem Speichel bei 37°C inkubiert. Nach Abpipettieren des Speichels und Zugabe von Streptokokken-Suspension schloss sich eine weitere Stunde Inkubation bei gleichen Bedingungen an.

Nun erfolgte der Austausch Streptokokken-Suspension durch 10%ige Kanamycinlösung zur Vermeidung einer Hemmung der Anaerobier durch übermäßiges Streptokokken-Wachstum. Die Antibiotikallösung wurde nach 15 Minuten Einwirkzeit bei Raumtemperatur abpipettiert und die Prüfkörper mit PBS gespült.

Auf die sich nun anschließende Zugabe des Anaerobier-Gemisches (*A. viscosus* und *F. nucleatum*) zu den Prüfkörpern und einstündige Inkubation dieser bei 37 °C, folgte die Versetzung dieser Suspension mit *P. gingivalis*-Lösung und anschließende Kultivierung für weitere 21 Stunden.

Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde der Überstand um das Hundertfache verdünnt und je 10 µl der resultierenden Lösung auf je vier verschiedenen Agar-Böden pro Prüfkörper ausgespatelt. Zum Kultivieren von *A. viscosus* ATCC 15987 kamen Schaedlerplatten, für *F. nucleatum* ATCC 25586 Schaedleragar mit Vancomycin, für *P. gingivalis* D-5-2-2 Schaedlerplatten mit Kanamycin und für *S. sanguinis* (1602, KHS) Columbiaagar zum Einsatz.

Die Nährböden wurden weitere 48 Stunden für die Aerobierkultivierung bzw. 7 Tage für die Anaerobierkultivierung inkubiert.

#### **3.4.4. Statistik**

Für die statistische Auswertung der von uns ermittelten Ergebnisse bedienen wir uns des t-Testes nach Student. Der Vergleich zwischen den Ergebnissen ist ab  $p < 0,05$  signifikant.

### **3.4.5. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung**

Um die mikrobiellen Verhältnisse auf den Prüfkörperoberflächen sichtbar zu machen, wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchungsverfahren angewendet.

Hierzu wurden nochmals Mono- und Mischkulturversuche durchgeführt. An den herkömmlichen Versuchsaufbau schloss sich die Fixierung der Proben mittels Glutaraldehyd an. Sodann folgte eine Waschung mit Cakodylat-Puffer sowie Dehydrierung mit einer aufsteigenden Ethanolreihe von 30% bis 70%.

Die weiteren Arbeitsschritte einschließlich der Kritisch-Punkt-Trocknung erfolgten durch Mitarbeiter des Institutes für Ultraforschung.

Die nachfolgende Fotodokumentation erfolgte exemplarisch an ausgewählten Stellen der Objektoberflächen.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Ergebnisse der Versuche mit Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]-phosphat**

Im Rahmen dieses Versuchsabschnittes sollte geklärt werden, welche Wirkung reines BPH auf ausgewählte Keime der Mundflora besitzt.

Das Keimwachstum unter dem Einfluss elf verschiedener BPH-Konzentrationen (0,01% - 10%) wurde hierzu mit dem einer Kontrolllösung ohne BPH-Zusatz verglichen. Die daraus resultierenden positiven und negativen Werte gaben Aufschluss über wachstumsfördernde bzw. -hemmende Eigenschaften des Bisphosphates.

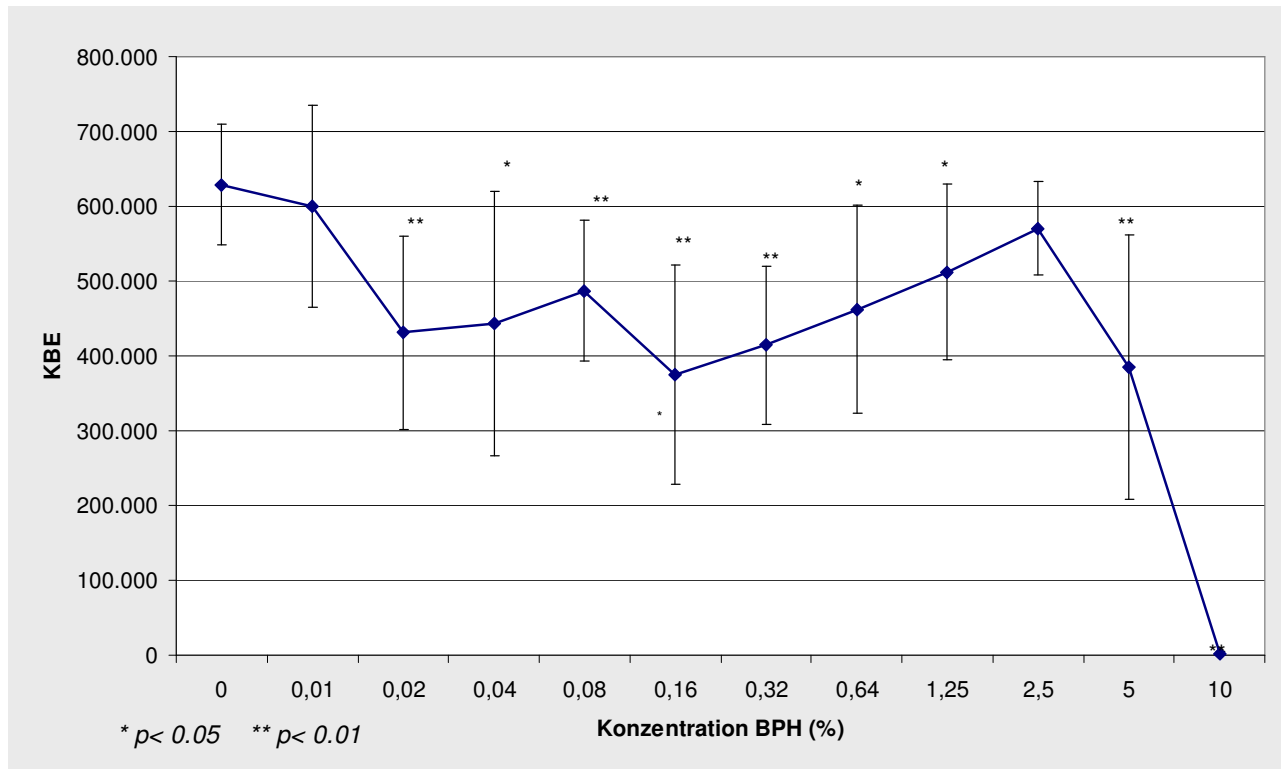
***Streptococcus mutans***

Abb. 7: Wirkung von Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat (BPH) auf das Wachstum von *Streptococcus mutans* ATCC 25175

In allen getesteten BPH-Konzentrationen, außer 0,01% und 2,5%, war ein signifikanter Hemmeffekt auf das Wachstum von *Streptococcus mutans* ATCC 25175 nachweisbar (0,01%, 0,16%, 0,64%, 1,25%, 5%, 10%  $p < 0,01$ ; 0,02%, 0,32%  $p < 0,05$ ), welcher ab einem BPH-Gehalt von 5% am stärksten ausgeprägt war. Dies spiegelt sich im KBE-BPH-Diagramm durch einen zunächst flach abfallenden Kurvenverlauf wider, der ab 5% BPH-Gehalt in einen steilen übergeht und im Bereich der 10%igen BPH-Konzentration schließlich im Nullpunkt mündet (Abb. 7, Tab. 7 im Anhang).

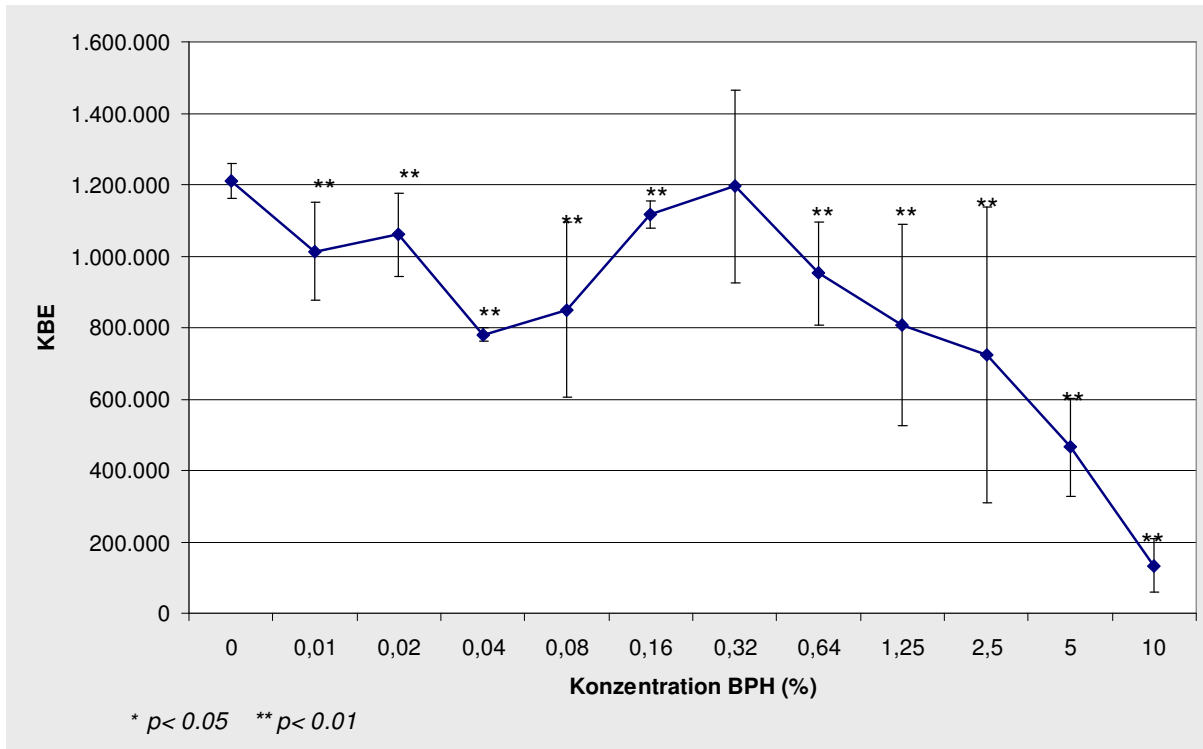
***Streptococcus sanguinis***

Abb. 8: Wirkung von Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat (BPH) auf das Wachstum von *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556

Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat hatte mit Ausnahme der 0,32%igen in allen getesteten Konzentrationen eine signifikant hemmende Wirkung auf das Wachstum von *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 ( $p < 0,01$ ), was sich besonders deutlich in den mittleren bis höheren Konzentrationen zeigte. Beginnend bei 0,64% BPH-Gehalt wies die Kurve im KBE-BPH-Diagramm in diesem Bereich einen stetig gegen Null abfallenden Verlauf auf.

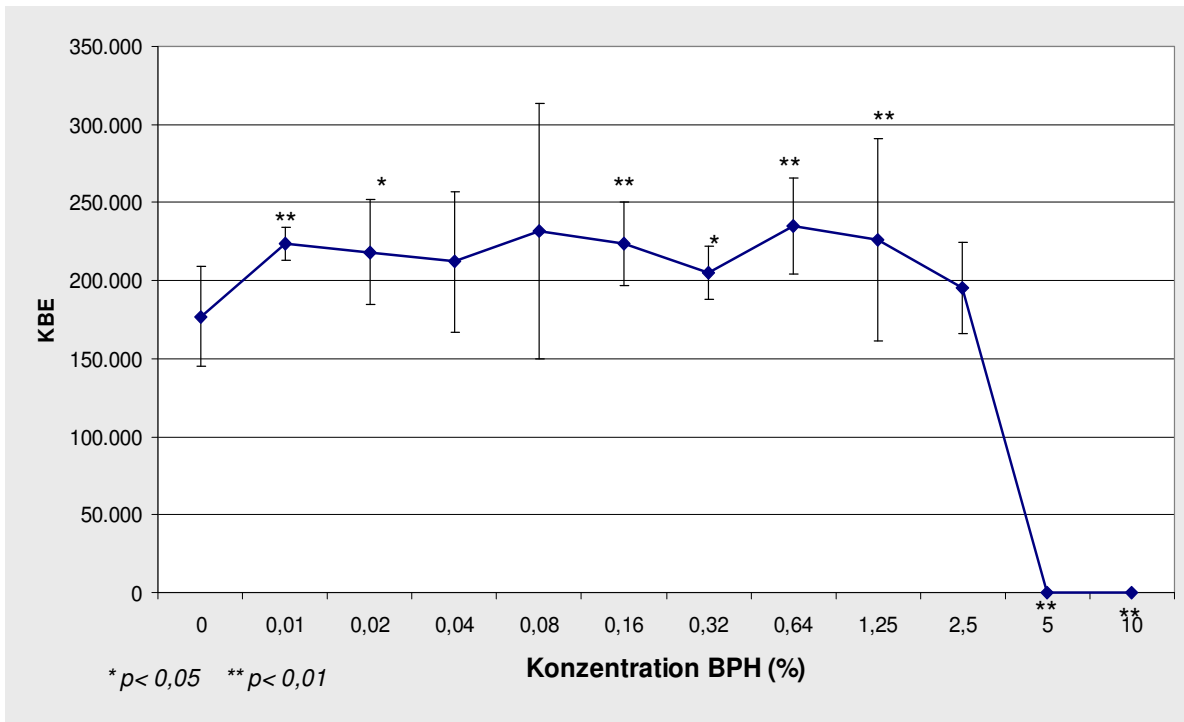
***Actinomyces viscosus***

Abb. 9: Wirkung von Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat (BPH) auf das Wachstum von *Actinomyces viscosus* ATCC 15987

Durch BPH bedingte signifikante Wachstumshemmungen von *Actinomyces viscosus* ATCC 15987 konnten in den Konzentrationen von 0,01%, 0,16%, 0,64%, 1,25%, 5% und 10% ( $p < 0,01$ ) sowie 0,02% und 0,32% ( $p < 0,05$ ) dokumentiert werden. Charakteristisch für die Kurve im KBE-BPH-Diagramm von *Actinomyces viscosus* ATCC 15987 war nach kurzem Anstieg ein plateauartiger Verlauf, der erst ab 1,25%iger BPH-Konzentration deutlich abfiel und ab 5% im Nullbereich verlief.



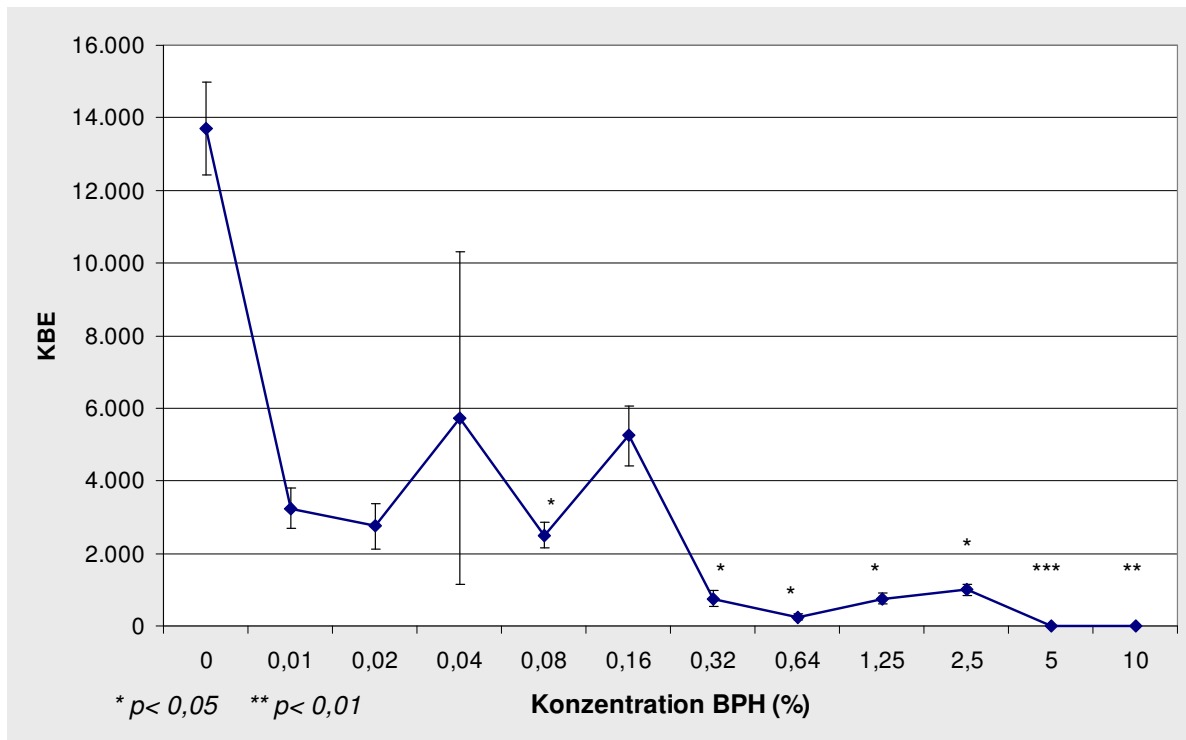
***Porphyromonas gingivalis***

Abb. 10: Wirkung von Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat (BPH) auf das Wachstum von *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

Signifikante Keimreduktionen von *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 konnten für BPH-Konzentrationen von 0,08%, 0,32%, 0,64%, 1,25% und 2,5% ( $p < 0,05$ ) sowie 5% und 10% ( $p < 0,01$ ) registriert werden. Ab einer BPH-Konzentration von 5% war kein Keimwachstum mehr nachweisbar. Dies drückte sich im Verlauf der KBE-BPH-Kurve durch einen zunächst starken Abfall im Bereich niedriger BPH-Konzentrationen und anschließend allmählich gegen Null tendierenden Verlauf aus. Ab BPH-Konzentrationen von 5% verlief die Kurve schließlich durch Null, was einer totalen Hemmung entsprach.

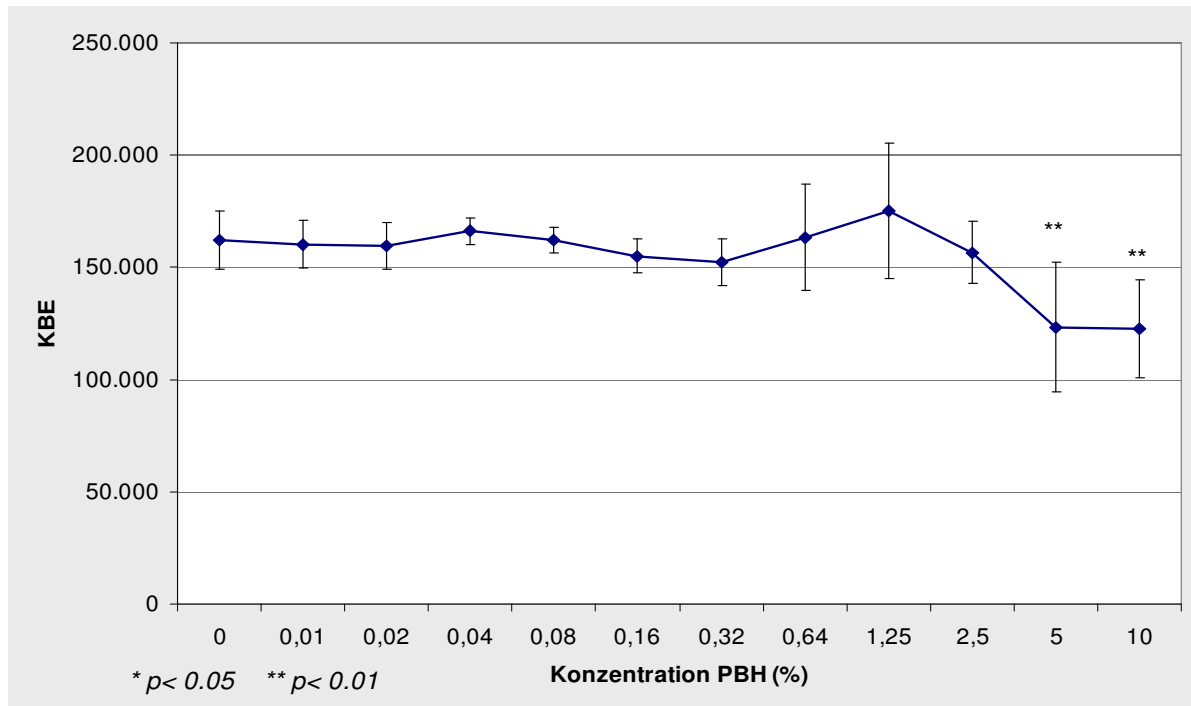
***Candida albicans***

Abb. 11: Wirkung von Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat (BPH) auf das Wachstum von *Candida albicans* ATCC 76615

Eine signifikante Hemmung des Wachstums von *Candida albicans* ATCC 76615 konnte lediglich in 5 und 10%iger Bisphosphat-Konzentration beobachtet werden ( $p < 0,01$ ). Die Kurve von *Candida albicans* beschrieb im KBE-BPH-Diagramm anfangs einen plateauhaften Verlauf, der ab 1,25% BPH-Konzentration abfiel. Allerdings wurden stets hohe Zahlen koloniebildender Einheiten registriert.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass sich Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat bereits in geringen Konzentrationen hemmend auf das Wachstum der getesteten Streptokokken-Spezies auswirkte. Die Keimzahlen von *S. sanguinis* reduzierten sich bereits ab einer 0,01%igen BPH-Konzentration und die von *S. mutans* ab 0,02%. Die parodontopathogenen Erreger sprachen erst auf höhere Konzentrationen an, *A. viscosus* ab 1,25% und *P. gingivalis* ab 0,08% BPH-Zusatz. *C. albicans* erwies sich als relativ resistent, da eine signifikante Wachstumshemmung erst ab 5%igem BPH-Anteil nachgewiesen werden konnte.

#### **4.2. Ergebnisse der Versuche mit Eluaten**

Diese Versuchsreihe diente der Untersuchung des Einflusses verschiedener Eluat-Konzentrationen auf das Wachstum ausgewählter Vertreter der Mundflora. Dies geschah vergleichend anhand von Eluaten BPH-haltiger und BPH-freier Prüfkörper sowie mitlaufender Kontrollen (ohne Eluat).

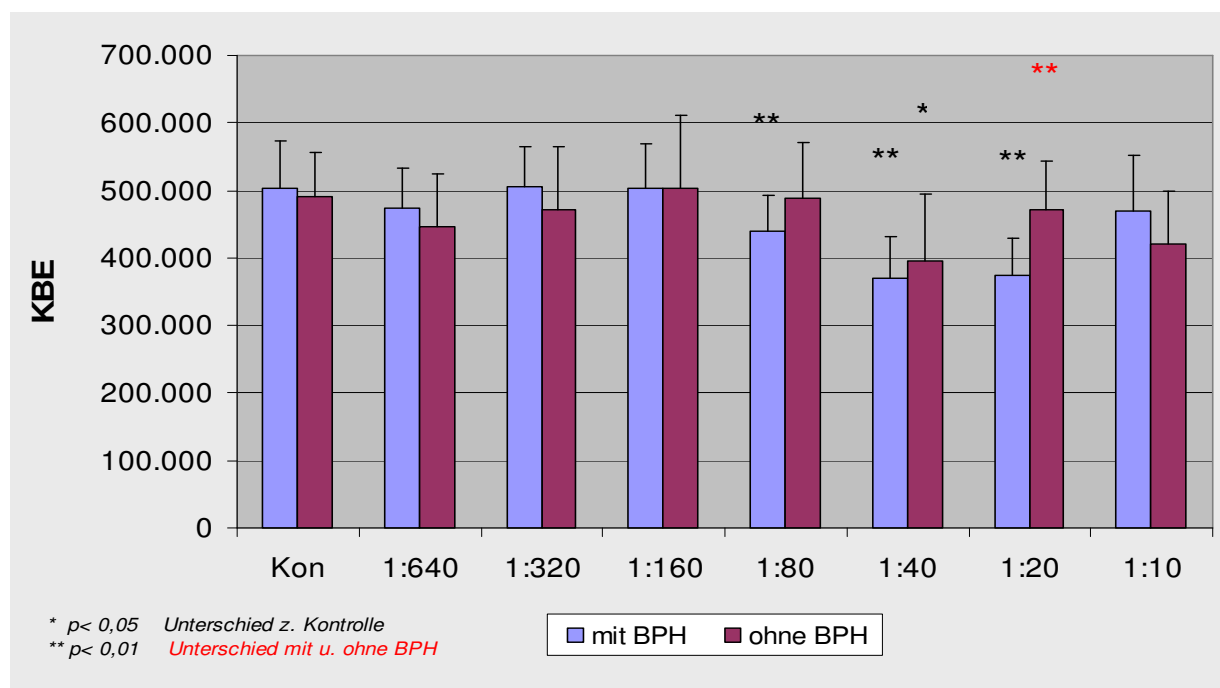
**Streptococcus mutans**

Abb. 12: Einfluss verschiedener Eluat-Konzentrationen der Composite-Prüfkörper mit und ohne Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat (BPH) auf das Wachstum von Streptococcus mutans ATCC 25175

Im Vergleich der Prüfkörper ohne BPH mit der Kontrolle konnten signifikant geringere Zahlen koloniebildender Einheiten einzig in der Eluatkonzentration 1:40 nachgewiesen werden ( $p < 0,05$ ). Im Gegensatz dazu konnten beim Vergleich der Prüfkörper mit BPH zur Kontrolle sogar in drei Eluat-Konzentrationen, 1:20, 1:40 und 1:80, signifikant niedrigere KBE-Zahlen ermittelt werden ( $p < 0,01$ ). Die Gegenüberstellung der KBE-Werte von Prüfkörpern mit und ohne BPH-Zusatz jeweils gleicher Eluatkonzentration erbrachte ausschließlich in der Konzentration 1:20 signifikant niedrigere KBE-Zahlen bei den mit BPH versetzten Prüfkörpern ( $p < 0,01$ ).

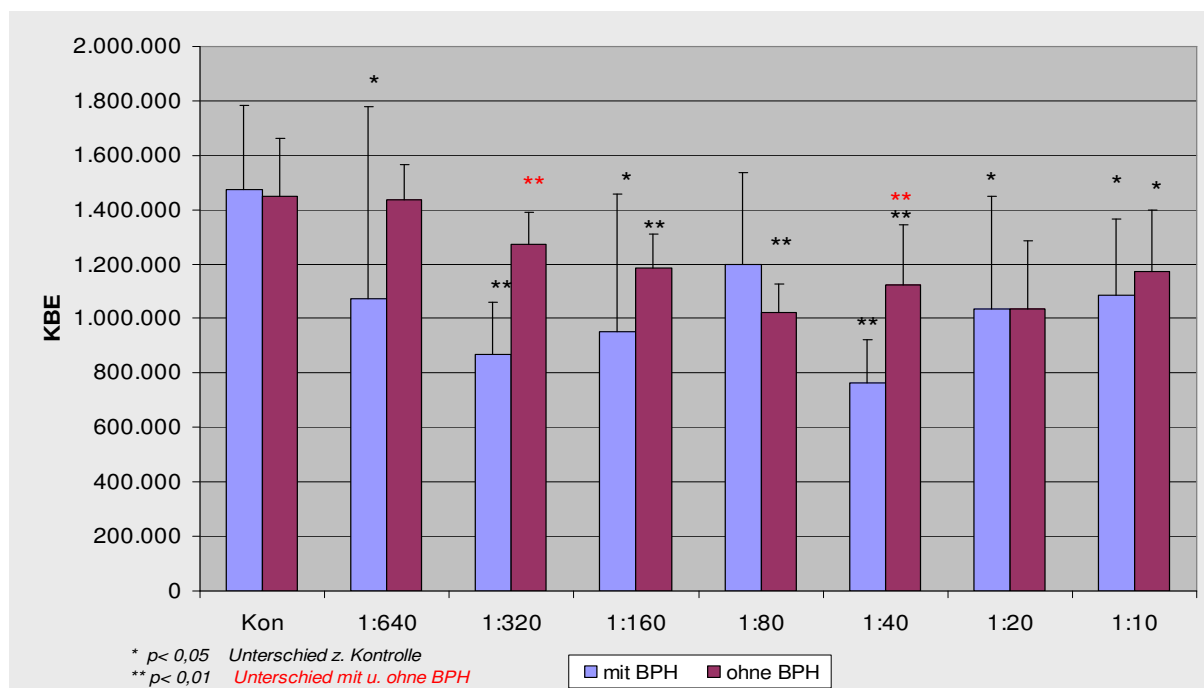
***Streptococcus sanguinis***

Abb. 13: Einfluss verschiedener Eluat-Konzentrationen der Composite-Prüfkörper mit und ohne Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat (BPH) auf das Wachstum von *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556

Signifikant reduzierte KBE-Zahlen wurden beim Vergleich der Eluate von Prüfkörpern ohne BPH-Zusatz mit der Kontrolle für die Konzentrationen 1:160, 1:80, 1:40 ( $p < 0,01$ ) und 1:10 ( $p < 0,05$ ) ermittelt. Ebenso wurden signifikant weniger koloniebildende Einheiten aus den Eluaten der Prüfkörper mit BPH in den Konzentrationen 1:640, 1:160, 1:20 und 1:10 ( $p < 0,05$ ) sowie 1:40 und 1:320 ( $p < 0,01$ ) in Bezug zu den Kontroll-Eluaten kultiviert. In identischen Eluat-Konzentrationen der Prüfkörper mit und ohne BPH waren vergleichsweise weniger koloniebildende Einheiten von *S. sanguinis* in den Konzentrationen 1:320 und 1:40 bei den Eluaten mit BPH nachweisbar ( $p < 0,01$ ).

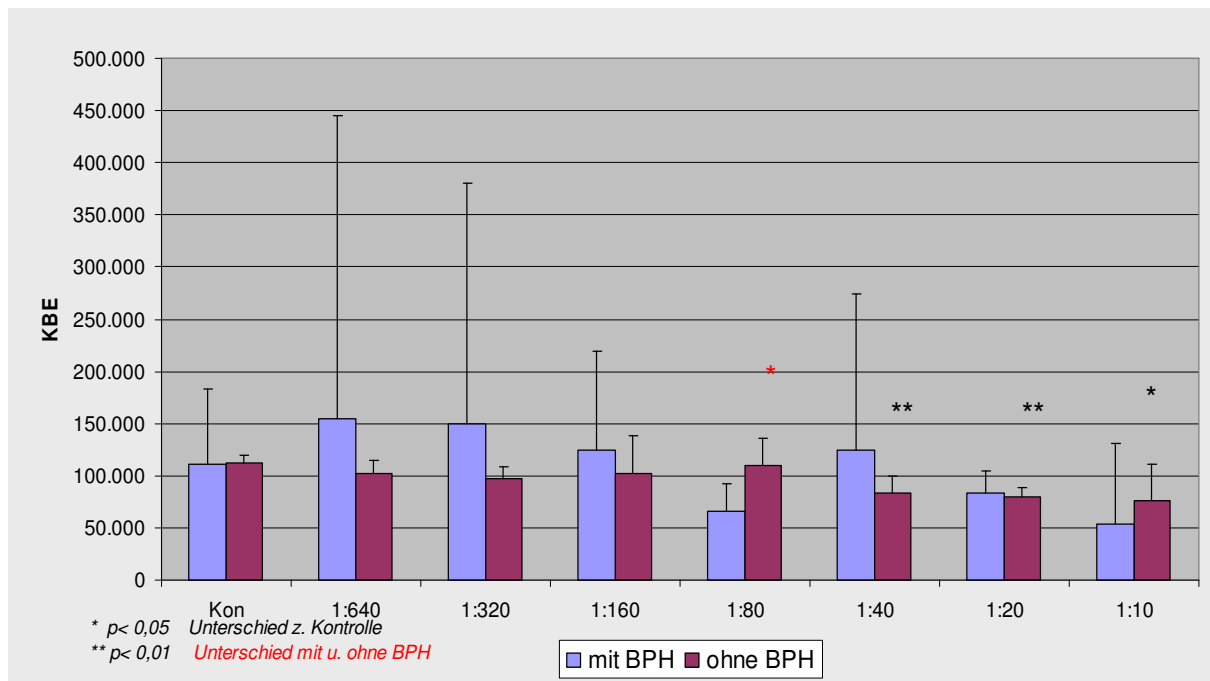
**Actinomyces viscosus**

Abb. 14: Einfluss verschiedener Eluat-Konzentrationen der Composite-Prüfkörper mit und ohne Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat (BPH) auf das Wachstum von *Actinomyces viscosus* ATCC 15987

Die vergleichende Auswertung der ermittelten KBE von Prüfkörpern ohne BPH-Zusatz und der Kontrolle erbrachte lediglich in der Konzentration 1:10 eine signifikante Verminderung von *A. viscosus* ( $p < 0,05$ ). In den Eluat-Konzentrationen 1:20 und 1:40 der Prüfkörper ohne BPH waren ebenfalls geringere KBE-Werte als in der Kontrolle nachweisbar ( $p < 0,01$ ). Nach der Kultivierung der Eluate resultierten ausschließlich in der Konzentration 1:80 signifikant weniger koloniebildende Einheiten aus den Eluaten der Prüfkörper mit BPH im Vergleich zu denen ohne BPH ( $p < 0,05$ ).

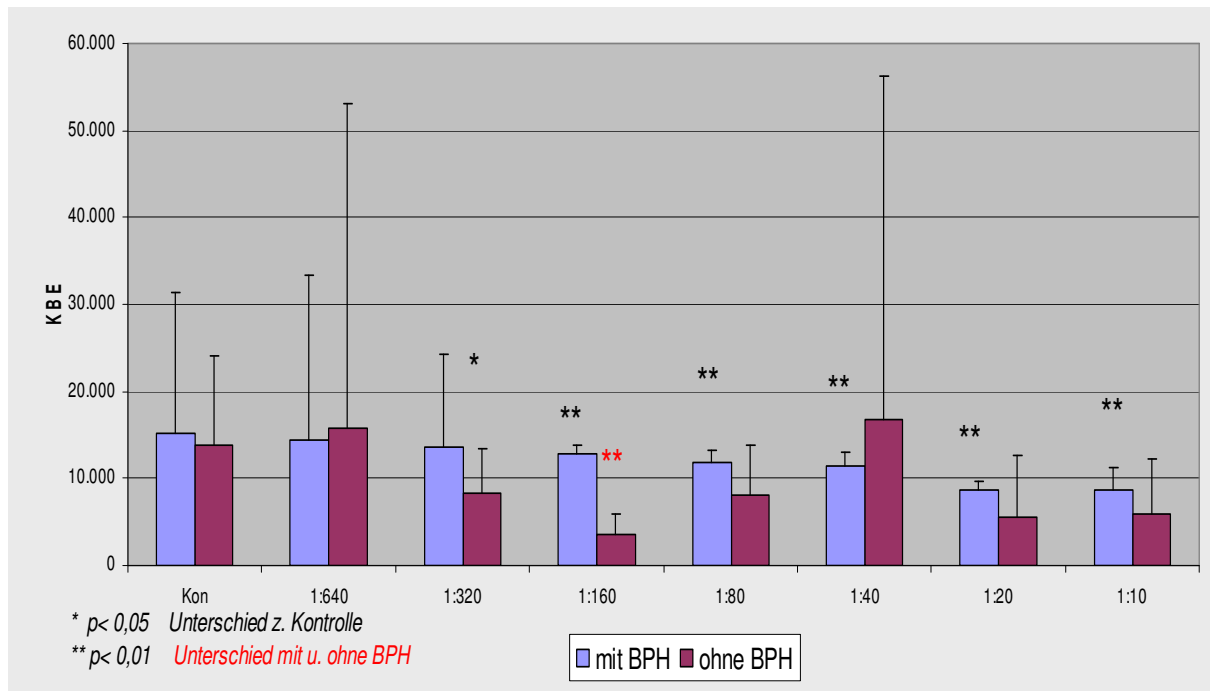
***Porphyromonas gingivalis***

Abb. 15: Einfluss verschiedener Eluat-Konzentrationen der Composite-Prüfkörper mit und ohne Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat (BPH) auf das Wachstum von *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

Aus den Eluaten der Prüfkörper ohne BPH resultierte im Vergleich zur Kontrolle in der Konzentration 1:320 eine reduzierte Zahl koloniebildender Einheiten ( $p < 0,05$ ). Die Gegenüberstellung der KBE-Zahlen der Prüfkörper-Eluate mit BPH und der Kontrolle erbrachte signifikant niedrigere Werte in den Konzentrationen 1:160, 1:80, 1:40, 1:20 und 1:10 ( $p < 0,01$ ). In der Konzentration 1:160 wurden entgegen vorheriger Erwartungen sogar höhere KBE-Zahlen für die Eluate der Prüfkörper mit BPH als für jene ohne BPH registriert ( $p < 0,01$ ).



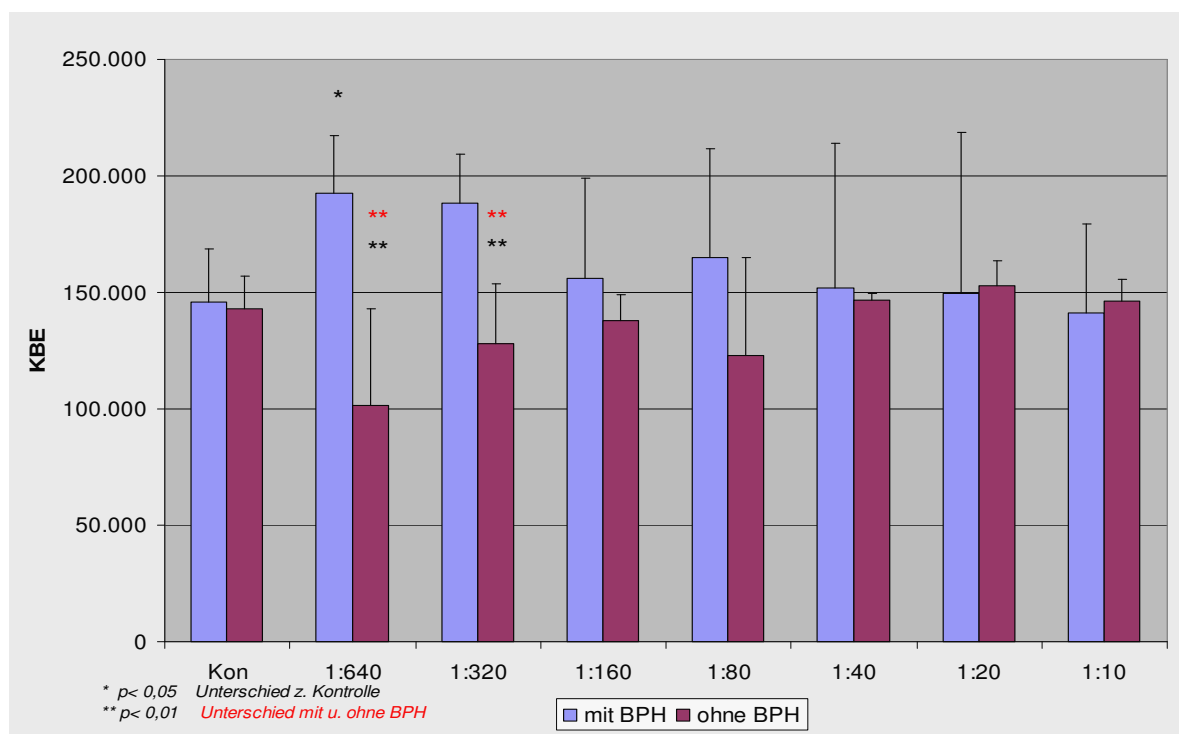
**Candida albicans**

Abb. 16: Einfluss verschiedener Eluat-Konzentrationen der Composite-Prüfkörper mit und ohne Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat (BPH) auf das Wachstum von *Candida albicans* ATCC 76615

Der Vergleich koloniebildender Einheiten der Prüfkörper-Eluate ohne BPH mit denen der Kontrolle zeigte signifikant höhere Werte in den Konzentrationen 1:640 und 1:320 ( $p < 0,01$ ). Signifikant erhöhte KBE-Zahlen wurden auch in der Konzentration 1:640 bei den Prüfkörper-Eluaten mit BPH im Vergleich zur Kontrolle registriert. Die Auswertung der Prüfkörper-Eluate mit und ohne BPH jeweils gleicher Konzentration erbrachte vergleichsweise höhere KBE-Werte für die Eluate mit BPH in den Konzentrationen 1:640 und 1:320 ( $p < 0,01$ ).

Mit Ausnahme von *Candida albicans* waren bei allen getesteten Spezies Tendenzen erkennbar, die auf eine indirekte Korrelation zwischen dem jeweiligen Eluat-Anteil und der KBE-Zahl schließen ließen, welche besonders ausgeprägt im Bereich höherer Eluat-Anteile zu sein schienen.

Signifikante Reduktionen der KBE-Zahlen im direkten Vergleich der Prüfkörper mit und ohne BPH jeweils gleicher Konzentrationen waren für *S. mutans* in der Eluat-Konzentration 1:20, für *A. viscosus* in 1:80 sowie für *S. sanguinis* in den Konzentrationen 1:320 und 1:40 nachweisbar. Im Unterschied dazu wurden sowohl für *P. gingivalis* in der Konzentration 1:160 als auch für *C. albicans* in den Konzentrationen 1:640 und 1:320 erhöhte KBE-Zahlen bei den Prüfkörper-Eluaten mit BPH ermittelt als bei jenen ohne BPH.

### **4.3. Ergebnisse der Versuche zur Anlagerung der Mikroorganismen**

Mit Hilfe dieser Versuchsanordnung wurde das Anlagerungsverhalten ausgewählter Spezies der Mundhöhlenflora an bisphosphathaltigen und -freien Prüfkörpern untersucht. Diese qualitative und quantitative Analyse wurde vergleichend an frischen sowie künstlich gealterten Prüfkörpern durchgeführt.

### Monokultur (*Streptococcus mutans*)

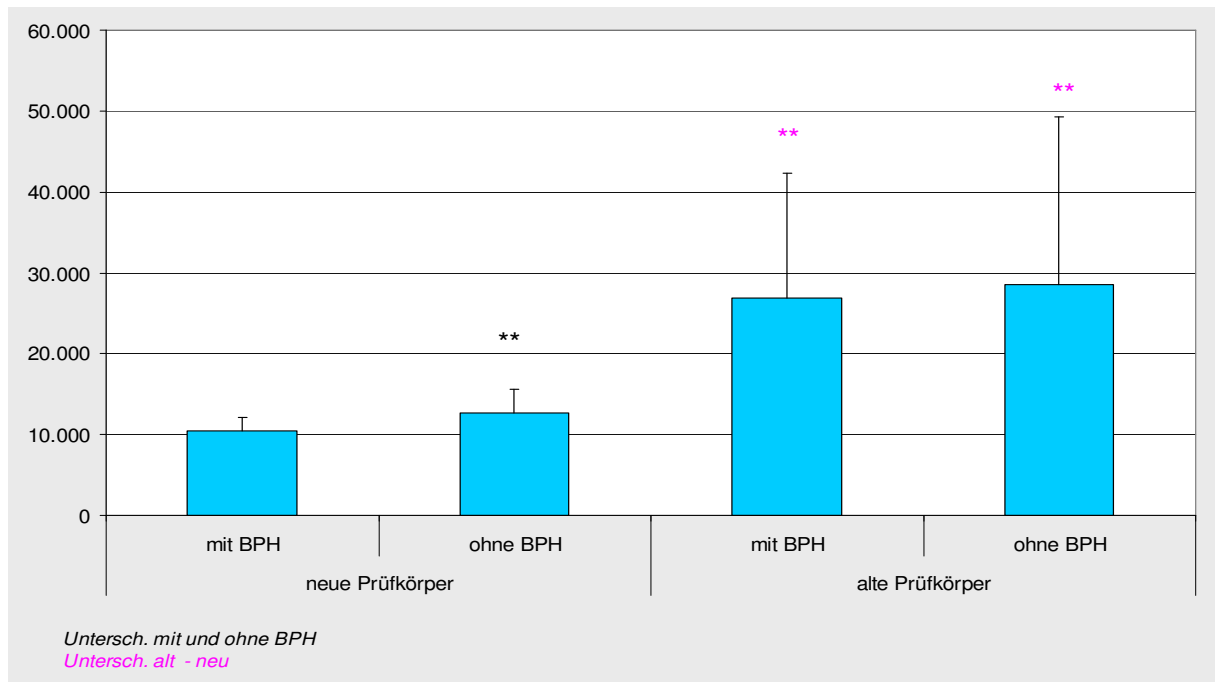


Abb. 17: Anlagerung von *Streptococcus mutans* ATCC 25175 an frische und gealterte Composite-Prüfkörper mit und ohne Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat (BPH)

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass frische Prüfkörper ohne Zusatz eine signifikant stärkere Bakterienanlagerung ( $p < 0,01$ ) aufwiesen als mit Bisphosphat versetzte gleichen Alters.

Bei der Gegenüberstellung alter und neuer gleichartiger Prüfkörper zeichnete sich eine vermehrte Keimbesiedlung ( $p < 0,01$ ) an den alten Prüfkörpern ab.

Allerdings konnten keine aussagekräftigen Differenzen im Anlagerungsverhalten zwischen gealterten Prüfkörpern mit und ohne BPH festgestellt werden.

Um die in den Anlagerungsversuchen gewonnenen Ergebnisse zu untermauern, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt, die zum einen den optischen Nachweis des Vorhandenseins der Mikroorganismen auf der Werkstoffoberfläche erbringen und zum anderen die quantitativen Unterschiede des Keimbesatzes zwischen frischen und gealterten Prüfkörpern hervorheben sollten.

Die bakterielle Besiedlung der Prüfkörper nach Beimpfung mit *S. mutans* ATCC 25175 und einstündiger Inkubation ist in Abb. 18 und 19 dargestellt. Während Abb. 18 lockere mehrschichtige Verbände kokkoider Bakterien-Ketten auf der Oberfläche eines frischen Prüfkörpers zeigt, illustriert Abb. 19 einen dichten mehrschichtigen Rasen kugelförmiger Bakterien auf der Oberfläche eines gealterten Prüfkörpers. Aufgrund der Verschleierung durch die bakteriellen Auflagerungen ist in beiden Abbildungen eine Beurteilung der Werkstoffoberfläche nicht möglich.

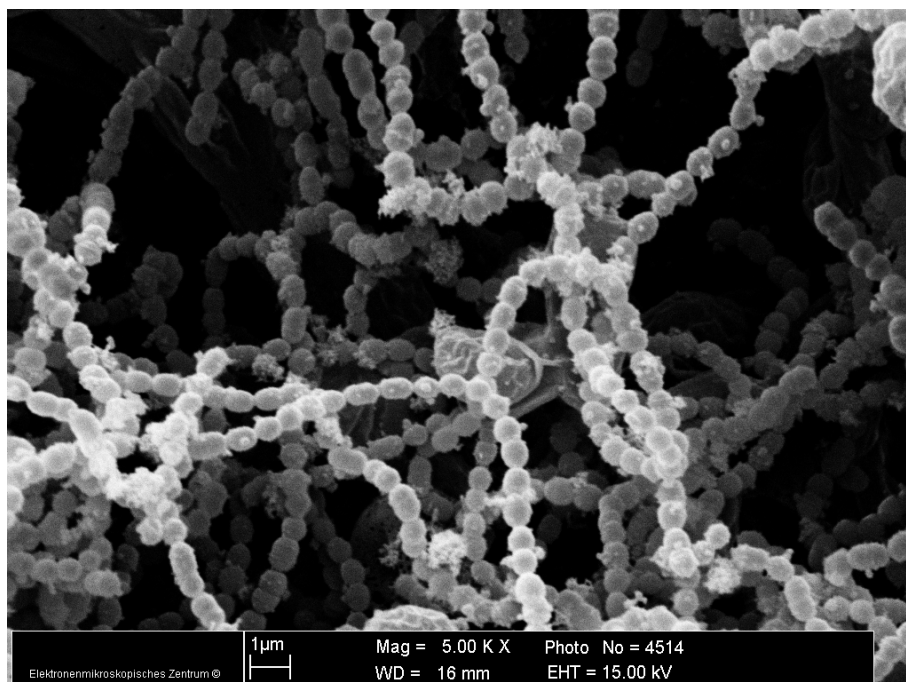


Abb. 18: REM-Aufnahme eines frischen Prüfkörpers nach Monokulturanlagerung

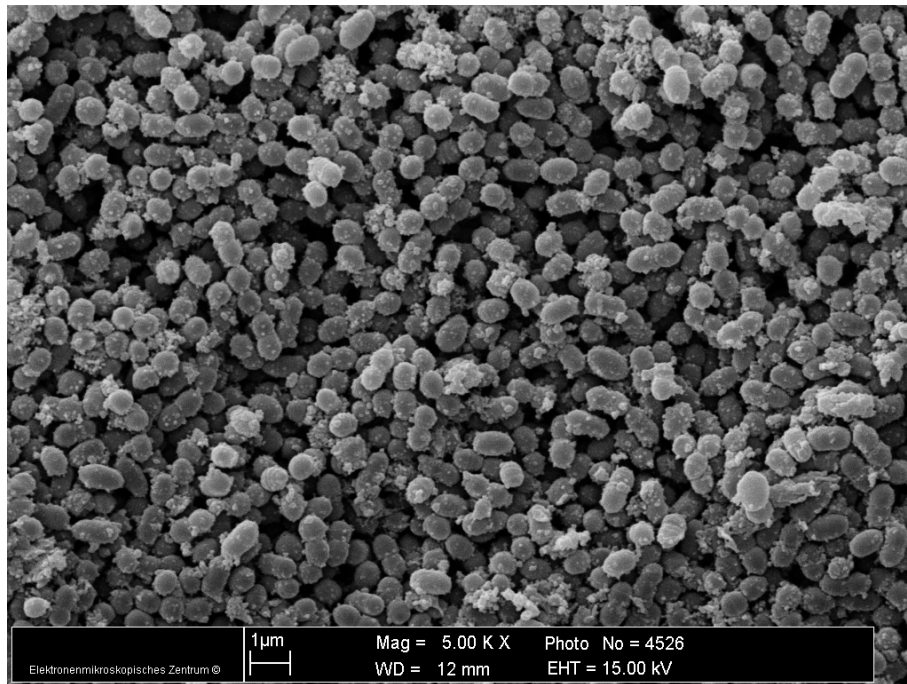


Abb. 19: REM-Aufnahme eines gealterten Prüfkörpers nach Monokulturanlagerung

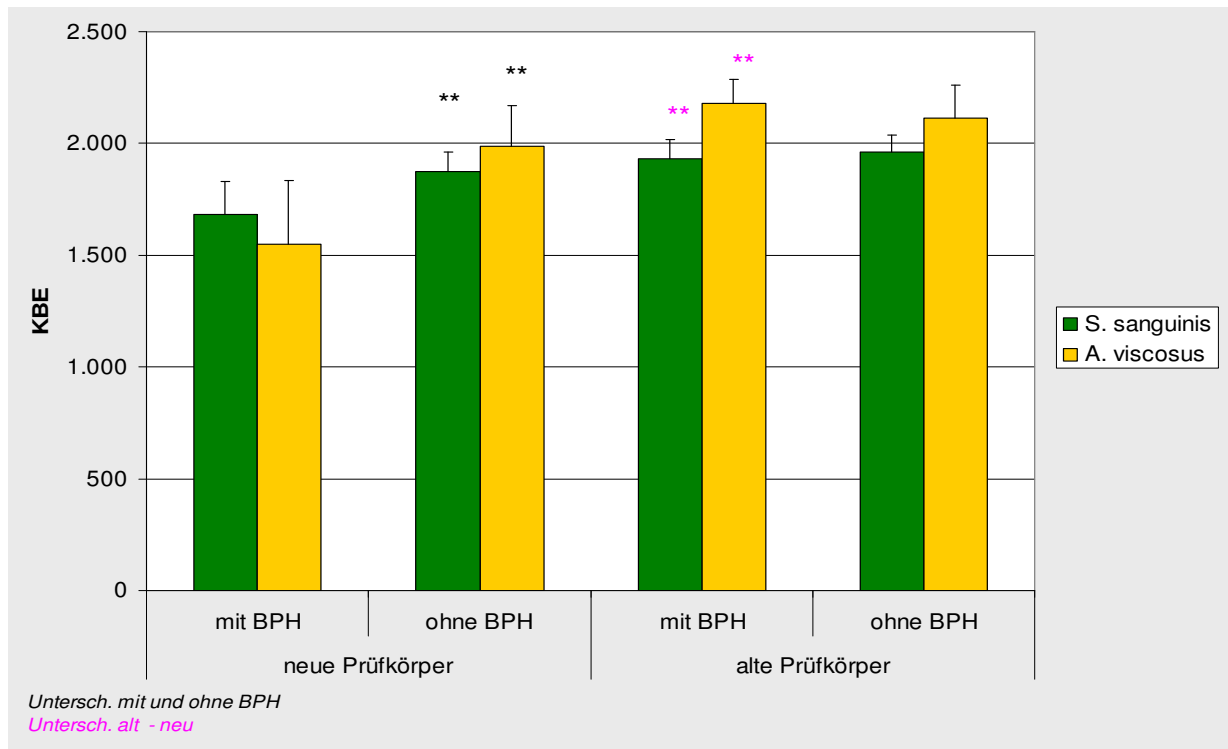
**Mischkultur**

Abb. 20: Anlagerung von Streptococcus sanguinis ATCC 10556 und Actinomyces viscosus ATCC 15987 an frische und gealterte Composite-Prüfkörper mit und ohne Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat (BPH)

Im Mischkultur-Anlagerungsversuch konnte an neuen Prüfkörpern ohne Zusatz ein vermehrtes Wachstum ( $p < 0,01$ ) von *S. sanguinis* und *A. viscosus* im Vergleich zu BPH-haltigen Prüfkörpern dokumentiert werden.

Die vergleichende Betrachtung neuer und alter phosphatversetzter Prüfkörper zeigte ein gesteigertes Adhäsionsverhalten ( $p < 0,01$ ) von *S. sanguinis* und *A. viscosus* an gealterten Prüfkörpern, wohingegen sich die Bakterienanlagerung innerhalb der alten Prüfkörpergruppen (mit und ohne Zusatz) nicht signifikant unterschied.

Abb. 21 und 22 veranschaulichen vergleichend die mikrobiellen Biofilme, die an einem frischen sowie einem gealterten Prüfkörper nach der Mischkultur-Anlagerung adhärten. Dabei zeigt Abb. 21 ein mehrere Lagen dickes, grobmaschiges Geflecht, bestehend aus kokkoiden und stäbchenförmigen Bakterien sowie Speichel- und Blutbestandteilen unregelmäßiger Anordnung. Die Mikroflora auf der Oberfläche eines gealterten Prüfkörpers nach der Mischkulturanlagerung stellt Abb. 22 dar. Die Aufnahme zeigt einen lückenlosen mehrschichtigen Bakterienrasen, der durch seine Kompaktheit keine Rückschlüsse auf die Beschaffenheit der Prüfkörperoberfläche zulässt. Dominiert wird dieser von kokkenförmigen Bakterien, die in langen ineinander verschlungenen Ketten zusammengelagert sind. Vereinzelt finden sich auch Blutbestandteile.



Abb. 21: REM-Aufnahme eines frischen Prüfkörpers nach der Mischkultur-Anlagerung



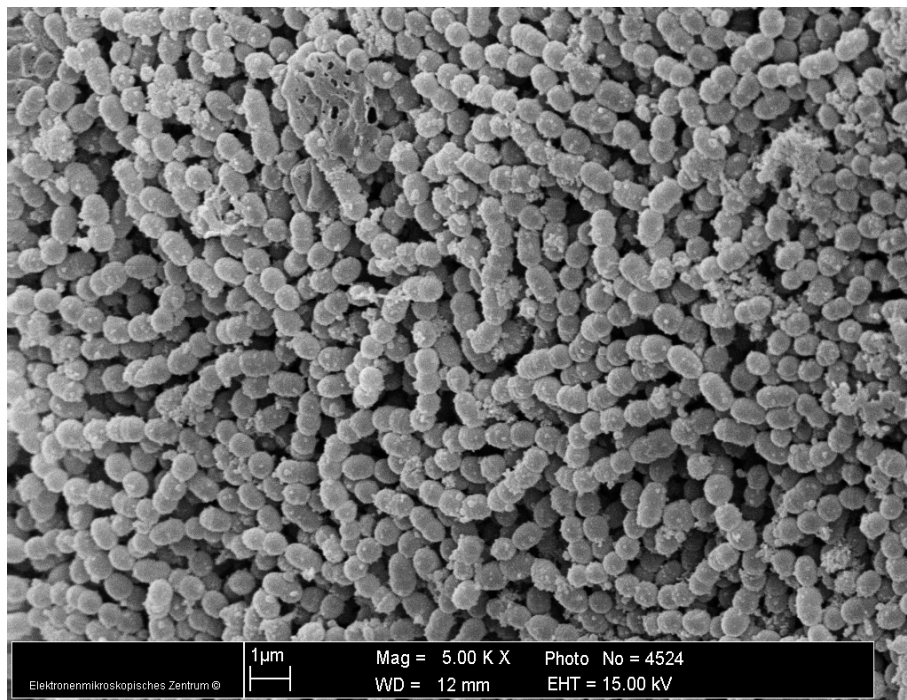


Abb. 22: REM-Aufnahme eines gealterten Prüfkörpers nach der Mischkultur-Anlagerung

## **5. Diskussion**

### **5.1. Diskussion der Methoden**

Eine zuverlässige Einschätzung der biologischen Wirkung von zahnärztlich-restaurativen Werkstoffen kann nur nach längerfristigem klinischem Einsatz unter physiologischen Mundverhältnissen erfolgen. Da aber jeder Werkstoff potentiell ein toxikologisches Risiko birgt und klinische Studien sowohl aufwendig als auch teuer sind, haben vorab durchgeführte Versuche eine herausragende Bedeutung [Klötzer 1975]. Ihre Aufgabe ist es, die Anwendung neuer Materialien vor der klinischen Erprobung unter möglichst realitätsnahen Bedingungen zu reproduzieren mit dem Ziel, ungeeignete Werkstoffe auszusondern und Leitlinien für geeignete Materialien festzulegen [Welker, Neupert, Oehring 1986].

Prinzipiell zeichnet sich eine sinnvolle mikrobiologische Diagnostik durch die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse sowie Präzision, Empfindlichkeit und Spezifität des Verfahrens im Vergleich zu einem Referenztest aus [Chen et al 1999]. Um diesem Rechnung zu tragen, wurde in der von uns durchgeführten Studie einem statischen In vitro-Modell zur präklinischen Materialtestung der Vorzug gegeben. Mit der Maßgabe, nicht regulierbare Faktoren zu minimieren, die den Versuchsausgang beeinflussen, wurden im Vorfeld Standards für die Versuchsdurchführung festgelegt. Dies beinhaltete das generelle Arbeiten unter möglichst sterilen Bedingungen, die Fertigung der Prüfkörper nach Herstellerangaben und die Art und Menge verwendeter Medien und Keimsuspensionen. Gleiches galt für Inkubationsdauer und -temperatur.

Die im ersten Teilabschnitt dieser Arbeit durchgeführten Eluationen, dienten dazu, physiologisch lösliche Bestandteile aus genormten Composite-Proben

herauszulösen und deren Einfluss auf das Wachstumsverhalten ausgewählter Spezies der Mundflora zu analysieren. Diese Methode der indirekten Materialtestung zeichnet sich im Allgemeinen durch bessere Quantifizierungsmöglichkeiten biologischer Ergebnisse [Schmalz 1978] und eine homogenere Einbringung des eluierten Werkstoffes in das Testsystem aus. Damit wird eine gleichmäßigere Benetzung der Mikroorganismen mit wirksamen Substanzen gewährleistet [Neupert und Welker 1975].

Eluate tragen durch Elimination der potentiell beeinflussenden Werkstoffoberflächeneigenschaften zur objektiveren Ergebnisinterpretation in Bezug auf die chemische Zusammensetzung bei [Schmalz 1977]. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass sich der Werkstoff in dem ihn umgebenden Milieu löst und die im Eluat freiwerdenden Bestandteile ihre spezifische Wirkung an den Reaktionsorten der Mikroorganismen entfalten [Neupert und Welker 1975]. Da ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Art und Menge der ausgelaugten Substanzen und der Werkstoffwirkung auf ein biologisches System besteht [Welker 1991, Schmalz 1978], kann sich die Eluation schwach löslicher Materialien problematisch gestalten.

Einen weiteren Aspekt dieser Arbeit stellten die Anlagerungsversuche dar, die der Prüfung direkter oberflächenvermittelter Werkstoffwirkungen dienen. Um Rückschlüsse auf sich durch Alterungsprozesse verändernde Materialeigenschaften ziehen zu können, wurden diese Teilversuche vergleichend anhand frischer und artifiziell gealterter Prüfkörper durchgeführt.

Trotz kontroverser Diskussionen in der Literatur wurden in dieser Arbeit mehrheitlich Monospezies-Kulturen von kario- und parodontopathogenen Keimen mit klinischer Relevanz angefertigt, da diese eine exaktere Quantifizierung erlauben. Dabei eignen sich Flüssigkeitskulturen besonders zur

biologischen Prüfung dentaler Werkstoffe, weil sie eine kontinuierliche Erfassung verschiedener Phasen bakteriellen Wachstums ermöglichen [Friedl, Schmalz und Hiller 1992]. Mit ihrer Hilfe ist eine Beurteilung wachstumshemmender oder -fördernder Effekte zahnärztlicher Materialien bei vergleichsweise höherer Empfindlichkeit als bei Plattendiffusionstests [Böhland und Prössel 1997] möglich.

Die quantitative Erfassung der Keime erfolgte durch Zählung der koloniebildenden Einheiten auf Kulturböden. Hierbei kann allerdings nur die zum Messzeitpunkt lebende Vegetation erfasst werden. Durch die Werkstoffwirkung potentiell abgestorbene Mikroorganismen bleiben dabei unberücksichtigt. Zusätzlich bedurfte es mehrfach aufwendiger Verdünnungsreihen, um optisch verifizierbare Bakterienkolonien zu erhalten.

Trotz aller Bemühungen einheitliche Standards für die Durchführung der Untersuchungsreihen zu etablieren, war es doch nicht möglich, alle Einfluss nehmenden Faktoren zu eliminieren. Im Folgenden soll nun zu einigen dieser Stellung genommen werden.

Mögliche Differenzen können sich aus der Modifizierung des Composites ergeben. So kann die Homogenität des Testmaterials nicht sicher angenommen werden und auch die fertigungsbedingten unterschiedlichen Applikationsarten (Kartuschensystem und Spatel) gewährleisten keine identischen Voraussetzungen für die Herstellung der Prüfkörper. Zu diesem Schluss kam auch eine Studie über die Abhängigkeit der Oberflächenqualität von Kronen- und Brückenwerkstoffen in Bezug auf ihre Zubereitungsmechanismen [Rzanny, Göbel, Welker 1996].

Die Anfertigung der Keimsuspension stellt einen weiteren Unsicherheitsfaktor im folgenden Versuchsablauf dar. Hier erfolgte der Abgleich lediglich mittels visueller Kontrolle mit dem MacFarland-Standard und unterlag somit subjektiver Einschätzung, was generell ein höheres Fehlerpotential birgt. Da für jedes Eluat ein eigener Ansatz angefertigt wurde, ist anzunehmen, dass die Eluationsversuche eine vergleichsweise geringere Aussagekraft als die Anlagerungen besitzen, in denen ein einziger Keimansatz für alle Prüfkörper verwandt wurde.

Auch die Kultivierung der Mikroorganismen kann Basis für Abweichungen sein. Bedingt durch die Abhängigkeit des Bakterienwachstums vom Nährstoffgehalt des Kulturmediums, verursacht dessen Abnahme durch bakterielle Stoffwechselfätigkeit mit zunehmender Inkubationsdauer einen negativen Wachstumseffekt. Dieser hängt wiederum vom Kompensationsvermögen der jeweiligen Bakterienspezies ab.

Mit Ausnahme der Mischkultur-Anlagerungsversuche kann aufgrund der Verwendung jeweils nur einer Keimart keine Aussage hinsichtlich konkurrierender Interaktionen zwischen den verschiedenen Bakterienspezies getroffen werden.

## 5.2. Diskussion der Ergebnisse

### ***Einfluss des BPH auf das Wachstum der Mikroorganismen***

Anhand unserer in den Vorversuchen gewonnenen Ergebnisse ließ sich für jede Spezies eine charakteristische Kurve über den konzentrationsabhängigen Einfluss des BPH erstellen.

Für *Streptococcus mutans* kann anhand dieser für nahezu alle Konzentrationen eine Wachstumshemmung nachgewiesen werden. Dabei reduziert sich die KBE-Zahl ab einem BPH-Anteil von 5% auf unter zwei Drittel ihres Ausgangswertes und ab 10% BPH ist sogar eine absolute Hemmung des Streptokokkenwachstums zu verzeichnen.

Eine ähnliche Charakteristik weist auch die Wachstumskurve von *Streptococcus sanguinis* im Bereich niedriger Konzentrationen auf. Nach zunächst verhaltener Hemmung kann in 1,25%iger BPH-Konzentration auch hier die Keimzahl um ein Drittel ihres ursprünglichen Wertes verringert werden. Augenscheinlich wird aber das Wachstum auch in der höchsten getesteten Konzentration nicht vollständig inhibiert, so dass in 10%iger BPH-Konzentration noch ein Restwachstum von circa 20% zu verzeichnen ist.

Im Falle von *Actinomyces viscosus* ist in den BPH-Konzentrationen von 0,01% bis 2,5% zunächst eine Alteration der Keimzahl zu erkennen, welche ab 5% BPH-Anteil in eine absolute Wachstumshemmung übergeht.

Eine 70%ige Reduktion der Zahl der koloniebildenden Einheiten von *Porphyromonas gingivalis* kann bereits mit der niedrigsten BPH-Konzentration

erzielt werden. Nach weiterer allmählicher Keimzahlminderung ist auch hier ab 5% BPH-Zusatz kein Wachstum mehr erkennbar.

Die Kurve von *Candida albicans* zeichnet sich im Vergleich mit allen anderen durch ein insgesamt geringes Gefälle aus. Die Keimzahl kann selbst in der höchsten BPH-Konzentration nur um circa 20% ihres Ausgangswertes gesenkt werden.

Insgesamt bescheinigen die Ergebnisse unserer Vorversuche BPH eine antimikrobielle Potenz, die Keimreduktionen der getesteten Stämme um 20% bis 70% bedingt. Möglicherweise beruht diese Variabilität auf differierenden Empfindlichkeiten der verschiedenen Spezies, wie in der Vergangenheit bereits durch andere Autoren beschrieben [Bleischwitz und Erbsmehl 1985]. Diese Sensitivität scheint bei *Porphyromonas gingivalis* am stärksten und bei *Candida albicans* am geringsten ausgeprägt zu sein, was früheren Untersuchungen über antimikrobielle Eigenschaften zahnärztlich-restaurativer Werkstoffe widerspricht, bei denen sich in Suspensionsversuchen geringere Empfindlichkeiten gramnegativer gegenüber grampositiver Keime abzeichneten. Beide Studien stimmen allerdings darin überein, dass *Candida albicans* eine weniger ausgeprägte Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen aufweist [Welker, Öhring, Erbsmehl, Bleischwitz 1984].

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass trotz individuellen Ansprechens auf den Zusatz von BPH, allen von uns getesteten Mikroorganismen eine signifikante Wachstumshemmung in 5%iger BPH-Konzentration gemein ist.

### ***Diskussion der Eluation***

Neben Fluoriden wurden weitere Substanzen wie silberhaltige Zusätze, Antibiotika oder auch Ammoniumverbindungen hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit getestet. Am Beispiel von Chlorhexidin konnte nachgewiesen werden, dass sich resultierend aus dessen Freisetzung aus Restaurationskunststoffen antibakterielle Aktivität erzeugen lässt [Jedrychowski et al. 1983, Takemura et al. 1983].

Hinsichtlich ihrer Kinetik lassen sich Systeme mit konstanter von Systemen mit abnehmender Freisetzungsrates unterscheiden [Rawls 1991]. Die Problematik beider Prinzipien besteht jedoch in der freisetzungsbedingten Beeinträchtigung der Materialeigenschaften und der zeitlichen Begrenzung der Wirkstofffreisetzung [Krämer, Netuschil, Simonis 1990, Welker, Neupert, Öhring 1986].

Eine von Neupert et al. [1975] durch Verdünnung von Eluaten ermittelte Konzentrations-Wirkungskurve besagt, dass sich Wachstumskurven unter Eluat-Einfluss durch den Konzentrationsabfall wirksamer Substanzen der Kontrolle annähern. Vergleicht man die Resultate der einzelnen Verdünnungsgrade unserer Versuchsreihen mit den Ergebnissen der jeweiligen Kontrolle, so lassen sich mit Ausnahme von *Candida albicans* trotz einiger Streuungen bei allen Spezies ebenfalls Tendenzen erkennen, die auf eine Abnahme der KBE mit steigendem Eluat-Anteil hinweisen. Während sich dieser Effekt anhand der für *Streptococcus sanguinis* erstellten Konzentrations-Wirkungskurve besonders gut nachvollziehen lässt, äußert er sich bei den anderen getesteten Kulturen vornehmlich in höheren Eluat-Konzentrationen.



Es liegt die Vermutung nahe, dass ebenfalls in Lösung gegangene Composite-Bestandteile und nicht BPH selbst diesen das Keimwachstum hemmenden Effekt verursachen, da Eluate mit und ohne Zusatz gleichermaßen betroffen sind. Beispielsweise können aus Composites gelöste Restmonomere Reaktionen dieser Art hervorrufen [Schmalz et al. 2003].

Obgleich die Wirksamkeit von BPH mithilfe der Vorversuche klar belegt werden konnte, spiegeln die Ergebnisse unserer Eluationsreihen diese nicht eindeutig wider. In der Gegenüberstellung BPH-haltiger und BPH-freier Eluate gleicher Konzentration sind signifikante Keimzahlenreduktionen lediglich sporadisch feststellbar. Für *Streptococcus mutans* ist dies in der Probe mit 5% und für *Actinomyces viscosus* mit 1,25% Eluat-Anteil der Fall. Einzig *Streptococcus sanguinis* weist in zwei unterschiedlichen Eluat-Konzentrationen (0,31% und 2,5%) signifikante Wachstumshemmungen auf. Andererseits kann in den Proben mit 0,63% Eluat-Anteil bei *Porphyromonas gingivalis*, sowie mit 0,16% und 0,31% Eluat-Anteil bei *Candida albicans* ein vermehrtes Wachstum verzeichnet werden.

Eine denkbare Ursache für das Zustandekommen dieser Ergebnisse ist die feste Einbindung des getesteten Agens in die Composite-Matrix und die dadurch erschwerte oder gar unmögliche Extraktion. Sollte dennoch eine Wirkstofffreisetzung erfolgt sein, konnte diese nicht die für eine wirksame Hemmung notwendige Dosis erreichen.

### ***Diskussion der Anlagerung***

Verschiedene Studien belegen eine Korrelation von Plaquemenge und Sekundärkariesrisiko, die besagt, dass sich mit Zunahme der Plaquequantität auch das Risiko einer Sekundärkaries erhöht [Imazato et al. 1994]. Nach ihrer Aushärtung besitzen herkömmliche Composites keinerlei antibakterielle Aktivität [Orstavik und Hensten-Pettersen 1978, Sato et al. 1982, Takemura et al. 1983], sondern stellen gemessen an anderen Füllwerkstoffen sogar einen besseren Nährboden für die mikrobielle Adhäsion dar [Skjörland 1976, Skjörland und Sönju 1982, Svanberg et al. 1990]. Selbst moderne Composites, die zur Verringerung von Quellung und Verfärbungstendenz einen hohen Anteil hydrophober Monomere beinhalten, begünstigen dieses Anlagerungsverhalten. In diesen Zusammenhängen liegt das Bestreben begründet, plaquepräventive Composites durch Zusatz antimikrobiell wirksamer Substanzen zu entwickeln, um die Prävalenz von Sekundärkaries zu senken.

Den Vertretern der Streptokokken-Familie kommt bei der Entstehung der Karies eine besondere Bedeutung zu. Diese besiedeln nach Ausbildung der Glykoproteinschicht als erste die Zahnoberfläche, wo sie ihre pathogenetische Bedeutung erlangen [Hellwig, Klimek, Attin 1995, Lehmann 1991]. Aufgrund seiner enormen Säurebildungspotenz und Säuretoleranz gilt *Streptococcus mutans* als Leitkeim der Zahnkaries [Berger 1981, Hellwig, Klimek, Attin 1995]. In Anbetracht seines Stellenwertes in der Kariogenese findet das Adhärenzverhalten dieses Keimes hier besondere Beachtung.

Die Ergebnisse unserer Versuche zur bakteriellen Adhäsion zeigen, dass sich direkt nach der Polymerisation vergleichsweise weniger Mutans-Streptokokken an phosphat-versetztes Composite anlagern als an das handelsübliche. Isoliert betrachtet, deutet dies auf eine oberflächenvermittelte Hemmung durch in die

Kunststoffmatrix eingebettetes Phosphat hin und geht mit dem Ziel konform, ein antibakterielles Composite zu entwickeln, dessen Effekt nicht über Wirkstofffreisetzung vermittelt wird. Die Entwicklung eines solchen Non-agent-releasing-Composites wäre schon deshalb wünschenswert, da jene, die Agenzien freisetzen, aufgrund möglicher Diffusion dieser in benachbarte Gewebe die Gefahr einer verminderten Biokompatibilität bergen [Lang 2004]. Zahlreiche Untersuchungen verfolgten bereits diese Zielsetzung. Exemplarisch sei hier die Inkorporation des antibakteriellen Monomers MDPB in Composite durch Imazato et al. (1994) genannt. Bei MDPB handelt es sich um eine quarternäre Ammonium-Verbindung, die über Methacrylat-Gruppen in Composites eingebunden wird und mittels Hydroxydodecylpyridinium ihre Wirkung entfaltet, welche stärker als die von Cetylpyridinium-Chlorid und Chlorhexidin-Diacetat aber der von Triclosan ebenbürtig ist [Richie und Jones 1988, Marsh 1992]. Die Langzeitwirkung von MDPB wird durch dessen polymerisationsbedingte, dauerhafte Immobilisierung in der Composite-Matrix gewährleistet, bedarf aber des direkten bakteriellen Kontaktes mit der modifizierten Werkstoffoberfläche [Imazato et al. 1994].

Die Ergebnisse unserer anhand gealterter Composite-Proben durchgeführten Anlagerungsversuche sprechen allerdings gegen eine solche Immobilisierung von BPH, da signifikante Reduktionen von *Streptococcus mutans* an phosphathaltigen Prüfkörpern nicht mehr nachweisbar sind. Die im Vorfeld erwartete quantitative Zunahme der Mikroorganismen-Population an gealterten Prüfkörpern bestätigte sich hingegen. Sowohl am handelsüblichen als auch am experimentellen Werkstoff sind nach der Materialalterung durchschnittlich doppelt so viele *Mutans*-Streptokokken nachweisbar als kurz nach der Polymerisation. Ursächlich könnten für dieses erhöhte bakterielle Aufkommen Wechselwirkungen des Werkstoffes mit dem umgebenden Milieu in Betracht kommen. Die mikrobielle Besiedlung der Kunststoffe kann langfristig im

Allgemeinen beispielsweise durch materialbedingte Unzulänglichkeiten wie Porositäten gefördert werden. Aus Quellungsvorgängen des Materials resultieren weiterhin eine Vergrößerung der Werkstoffoberfläche und damit verbunden auch bessere Retentionsmöglichkeiten für Bakterien. Verarbeitungsbedingte Verunreinigungen des Kunststoffes wirken sich ebenfalls begünstigend auf die Adhäsion von Mikroorganismen aus [Braden und Davy 1986]. Durch aktive Metabolisierung löslicher Kunststoffbestandteile kann die Werkstoffdesintegration von einigen Vertretern der Mundhöhlenflora vorangetrieben werden. Während Engelhardt (1973) in diesem Zusammenhang die Fähigkeit von Pseudomonaden und Candidapilzen zur Verwertung von Methylmethacrylat-Bestandteilen als Kohlenstoffquelle beschrieb, wurde ergänzend dazu von Freund und Munksgaard (1990) der Nachweis einer enzymatischen Spaltung von Monomerbestandteilen durch Bakterien erbracht.

Obwohl Composites bereits wenige Minuten nach ihrer Polymerisation klinisch als abgebunden gelten, durchlaufen sie auch danach noch langfristige Reifungsprozesse. Diese gehen sowohl mit chemischen als auch physikalischen Veränderungen des Werkstoffes einher, die wiederum Einfluss auf dessen biologische Wirkung nehmen können [Welker, Oehring, Erbsmehl, Bleischwitz 1984]. So kann beispielsweise der Anteil nicht umgesetzter Monomere zum einen bakterientoxische Wirkung entfalten, zum anderen aber auch den Mikroorganismen als besagte Kohlenstoffquelle dienen [Glänzer und Kaufhold 1990].

Die Resultate des Mischkultur-Versuches zur mikrobiellen Adhäsion decken sich mit den in der Monokultur erworbenen Erkenntnissen. Während sich vor der Alterung eine signifikant höhere Anlagerung an BPH-freien im Vergleich zu BPH-haltigen Prüfkörpern zeigt, kann auch hier dieser Effekt an gealterten Proben nicht mehr nachgewiesen werden.

Von den vier im Mischkultur-Ansatz verwendeten Keimen ließen sich ausschließlich *Streptococcus sanguinis* sowie *Actinomyces viscosus* kultivieren. Dies könnte durch unterschiedliche Empfindlichkeiten der verwendeten Spezies gegenüber dem vorherrschenden Milieu bedingt sein. So wäre eine im Laufe der Inkubationszeit zunehmende Anhäufung bakterieller Stoffwechselprodukte und dadurch verursachte Hemmung dieser Keime eine Erklärung. Eine weitere Möglichkeit bietet die wechselseitige Wachstumsbeeinflussung der Keime untereinander, die im Allgemeinen sowohl agonistischen als auch antagonistischen Charakter aufweisen können. Auch ein solcher mikrobieller Antagonismus würde das Ausbleiben von *Fusobacterium nucleatum* und *Porphyromonas gingivalis* erklären.

Mit hoher Wahrscheinlichkeit kann diese Inhibition nicht auf die Wirkung von BPH zurückgeführt werden, da dieses Phänomen an Prüfkörpern beider Werkstoffgruppen auftrat.

### ***Eignung von BPH als Zusatz zu Composites***

BPH verfügt über einige Eigenschaften, die es gegenüber anderen antimikrobiell wirksamen Substanzen wie Silberpartikeln, Chlorhexidin und Fluoriden auszeichnet. Diese drei Agenzien haben nachweislich antimikrobielle Wirkung und werden aufgrund dieser Eigenschaft auf verschiedenste Weise in Dentalprodukten, wie Zahncremes, Zahnseide oder Mundspüllösungen aber auch in Füllwerkstoffen wie Amalgamen, Glasionomernzementen oder Composites eingesetzt.

Silberpartikel haben eine starke antimikrobielle Wirkung, als Zusatz zu Composites scheinen sie aber wegen der zu erwartenden ästhetischen

Einbußen aufgrund ihrer dunklen Farbe weniger geeignet zu sein. BPH hingegen verändert die Optik und Transluzenz der damit versetzten Composites nicht. Optisch waren BPH-freie und BPH-versetzte Prüfkörper nicht voneinander zu unterscheiden.

Der Zusatz von Fluoriden zu Composites zieht zwar keine ästhetische Beeinträchtigung nach sich, beeinflusst aber die mechanischen Eigenschaften nachteilig. Ob und in welchem Maße der Zusatz von BPH Auswirkung auf die mechanischen Eigenschaften von Composites hat, müsste in weiteren werkstoffkundlichen Untersuchungsreihen geklärt werden. Auch die vermeintliche Geruch- und Geschmacklosigkeit von BPH könnten Vorteile gegenüber anderen Agenzien sein.

## 6. Schlussfolgerungen

Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat in gelöster Form besitzt eine überwiegend inhibierende Wirkung auf das Wachstum oraler Spezies. Speziell BPH-Wirkspiegel ab 5% scheinen zur Hemmung der getesteten kariogenen und parodontopathogenen Erreger geeignet.

Herausgelöste Bestandteile von Composites wirken hemmend auf das Wachstum von oralen Mikroorganismen. Eluate nach Zugabe von BPH zu Composites verhalten sich jedoch nicht grundlegend anders als Eluate von Composites ohne Zusatz. Das heißt, BPH wirkt hier offensichtlich nicht inhibierend.

BPH übt eine temporäre oberflächenvermittelte Reduktion der bakteriellen Adhärenz aus. Diese zeitliche Begrenzung lässt vermuten, dass der Wirkstoff nicht fest in die Composite-Matrix eingebunden und deshalb aus dem Werkstoff herausgelöst werden konnte.

BPH besitzt bakteriotoxisches Potential. Die getestete Konzentration von 5% BPH-Zusatz reicht aber nicht aus, um nach Extraktion aus dem Composite den für eine effektive Hemmung notwendigen BPH-Spiegel erreichen zu können. Diese Konzentration kann allerdings temporär direkt nach Polymerisation oberflächenassoziiert das Wachstum von oralen Spezies hemmen.

Es bedarf jedoch weiterführender Untersuchungen, um eruieren zu können, ob höhere BPH-Konzentrationen in den Composites höhere Freisetzungsraten und damit verbundene Wachstumshemmungen bedingen.

Vor einer möglichen Verwendung von BPH in zahnärztlichen Materialien besteht die Notwendigkeit einer umfangreichen werkstoffkundlichen Testung

hinsichtlich Biokompatibilität und Einflussnahme auf chemische und physikalische Eigenschaften.



## Literaturverzeichnis

1. Autian J: General toxicity and screening tests for dental materials. International dental journal 24(2):235-50 (1974)
2. Berger U: Mundhygiene - Die mikrobiologischen Grundlagen. Harro Boerner Verlag Frankfurt (1981)
3. Bleischwitz B, Erbsmehl J: Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirkung und Hämolyseaktivität von neuartigen zahnärztlichen Restaurationswerkstoffen sowie ihrer Ausnutzung als Energiequelle für Mikroorganismen. Med Diss Jena (1985)
4. Blunck U, Haller B: Klassifikation von Bondingsystemen. Quintessenz 50: 1021-1033 (1999)
5. Böhland A, Prössel A: Untersuchungen zur Wirkung von Glasionomerwerkstoffen gegenüber Streptococcus mutans und Porphyromonas gingivalis. Zahnmed Diss Jena (1997)
6. Bowden GH, Hamilton IR: Survival of oral bacteria. Crit Rev Oral Biol M 9: 54-85 (1998)
7. Bowen RI: Bonding of restorative materials to dentine - the present status in the United States. Int Dent J 35: 155-159 (1985)
8. Braden M, Davy KWM: Water absorption characteristics of some unfilled resins. Biomaterials 7: 474-475 (1986)

9. Bradshaw DJ, Marsh P, Schilling KM, Cummins D: Modified chemostat system to study the ecology of oral biofilms. *J Appl Bacteriol* 80: 124-130 (1996)
10. Bradshaw DJ, Marsh P: Use of continuous flow techniques in modelling dental plaque biofilms. *Method Enzymol* 310: 279-296 (1999)
11. Buddecke E: *Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin*. De Gruyter Berlin (1981)
12. Buonocore MG: A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res* 34: 849-853 (1955)
13. Chen, C.; Slots, J.: Microbiological tests for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas+B129 gingivalis*. *Periodontology* 2000 20: 53-64 (1999)
14. Chung KH: Relationship between composition and properties of posterior resin composites. *J Dent Res* 69: 852-856 (1990)
15. Collins LM, Dawes C: The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. *J Dent Res* 66: 1300-1302 (1987)
16. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM: Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49: 711-745 (1995)
17. Dawes C, Jenkins GN and Tonge CH: The nomenclature of the integuments of the enamel surface of teeth. *Br Dent J* 115:65-68 (1963)

18. Douglas CW: Bacterial protein interactions in the oral cavity. *Adv Dent Res* 8: 254-262 (1994)
19. Dummer PM, Harrison KA: In vitro plaque formation on commonly used dental materials. *J Oral Rehabil* 9: 413-417 (1982)
20. Ebi N, Imazato S, Noiri Y, Ebisu S: Inhibitory effects of resin composite containing bactericide-immobilized filler on plaque accumulation. *Dent mater* 17(6):485-91 (2001)
21. Eichner, Kappert: Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung. 5. Auflage Band 2, Hüttig Heidelberg 135-149 (1985)
22. Engelhardt JP: Die Beständigkeit zahnärztlicher Kunststoffe gegenüber Mikroorganismen. *Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* 83: 656-669 (1973)
23. Fine DH: Chemical agents to prevent and regulate plaque development. *Periodontol* 2000 8: 87-107 (1995)
24. Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland): Produktinformation Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat
25. Firma VOCO (Cuxhaven, Deutschland)+B13: Produktinformation Grandio Flow®
26. Freund M, Munksgaard EC: Enzymatic degradation of BISGMA/TEGDMA-polymers causing decreased microhardness and greater wear in vitro. *Scand J Dent Res* 98: 351-355 (1990)

27. Friedl KH, Hiller KA, Schmalz G: Placement and Replacement of composite restorations in Germany. *Oper Dent* 20: 34 (1995)
28. Friedl KH, Schmalz G, Hiller KA: Flüssigkeitskulturen zur Prüfung der Wirkung zahnärztlicher Werkstoffe auf das Bakterienwachstum. *Dtsche Zahnärztl Z* 47: 826-831 (1992)
29. Fine DH: Chemical agents to prevent and regulate plaque development. *Periodontol* 2000 8: 87-107 (1995)
30. Gängler P, Hoffmann T, Willershausen B, Schwenzer N, Ehrenfeld M: Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie. Thieme Stuttgart, 2. Auflage (2005)
31. Gängler P, Hoyer I, Montag R, Gäbler P: Micromorphological evaluation of posterior composite restorations - a 10-year report. *J Oral Rehabil* 31: 991-1000 (2004)
32. Glänzer J, Kaufhold K-U: Untersuchungen über den Einfluß von fünf dentalen Spezialmonomeren auf das in vitro Wachstum experimenteller und natürlicher mikrobieller Mischkulturen in verschiedenen Medien. *Med Diss Jena* (1990)
33. Grimaudo NJ, Nesbitt WE, Clark WB: Coaggregation of *Candida albicans* with oral *Actinomyces* species. *Oral microbiology and immunology* 11(1):59-61 (1996)

34. Gustafsson B, Quensel C, Lanke L: The Vipeholm dental caries study. The effect of different level of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta Odontol Scand* 11: 232 (1953)
35. Hannig M: Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24h period. *Clin Oral Investig* 3: 88-95 (1999)
36. Hasty DL, Ofek I, Courtney HS, Doyle RJ: Multiple adhesins of streptococci. *Infect Immun* 60: 2147-2152 (1992)
37. Hay DI: Salivary factors in caries models. *Adv Dent Res* 9: 239-243 (1995)
38. Hay DI: Some observations on human saliva proteins and their role in the formation of the acquired enamel pellicle. *J Dent Res* 48:806-810 (1969)
39. Hellwig E, Klimek J, Attin T: Einführung in die Zahnerhaltung. Urban & Schwarzenberg (1995)
40. Hellwig E, Klimek J, Attin T: Einführung in die Zahnerhaltung. Urban & Schwarzenberg, 2. Auflage (1999)
41. Holmes AR, Cannon RD, Jenkinson HF: Interactions of *Candida albicans* with bacteria and salivary molecules in oral biofilms. *J Ind Microbiol* 15(3):208-13 (1995)

42. Holmes AR, Gopal PK, Jenkinson HF: Adherence of *Candida albicans* to a cell surface polysaccharide receptor on *Streptococcus gordonii*. *Infect Immun* 63(5):1827-34 (1995)
43. Holmes AR, McNab R, Jenkinson HF: *Candida albicans* binding to the oral bacterium *Streptococcus gordonii* involves multiple adhesin-receptor interactions. *Infect Immun* 64(11):4680-5 (1996)
44. Hoyer I, Gängler P, Krehan F, Niemela S, Weinert W: Biological testing and clinical assessment of composite restorations. *Dtsche zahnärztl Z* 44(2):100-5 (1989)
45. Imazato S, Ebi N, Tarumi H, Russell R R, Kaneko T, Ebisu S: Bactericidal activity and cytotoxicity of antibacterial monomer MDPB. *Biomaterials* 20(9):899-903 (1999)
46. Imazato S, Ehara A, Torii M, Ebisu S: Antibacterial activity of dentine primer containing MDPB after curing. *J Dent* 26(3):267-71 (1998)
47. Imazato S, Imai T, Russell R R, Torii M, Ebisu S: Antibacterial activity of cured dental resin incorporating the antibacterial monomer MDPB and an adhesion-promoting monomer. *Journal of biomedical materials research* 39(4):511-5 (1998)
48. Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Ebisu S, Tay FR: Antibacterial activity and bonding characteristics of an adhesive resin containing antibacterial monomer MDPB. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 19(4):313-9 (2003)

49. Imazato S, Tarumi H, Ebi N, Ebisu S: Cytotoxic effects of composite restorations employing self-etching primers or experimental antibacterial primers. *J Dent* 28(1):61-7 (2000)
50. Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y, McCabe JF, Russell RRB: Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite. *J Dent Res* 73: 1437-1443 (1994)
51. Imazato S, Torii Y, Takatsuka T, Inoue K, Ebi N, Ebisu S: Bactericidal effect of dentin primer containing antibacterial monomer methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) against bacteria in human carious dentin. *J Oral Rehabil* 28(4):314-9 (2001)
52. Janda R: Der Stand der Entwicklung auf dem Gebiet der Zahnfüllungskunststoffe (I-III). *Quintessenz* 39: 1067-1073,1243-1253,1393-1398 (1988)
53. Jedrychowski JR, Caputo AA, Kerper S: Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *J Oral Rehabil* 10:373-381 (1983)
54. Jones CL, Saxton CA, Ritchie JA: Microbiological and clinical effects of a dentifrice containing zinc citrate and triclosan in the human experimental gingivitis model. *J Clin Pharm and Therapeutics* 17: 570 - 574
55. Kantorowicz A: Karies und Kriegsernährung. *Dtsche Zahnärztl Z* 8: 41 (1953)

56. Kinniment SL, Wimpenny JW, Adams D, Marsh PD: Development of a steady state oral microbial biofilm community using the constant-depth film fermenter. *Microbiology* 142: 631-638 (1996)
57. Klötzer WT: Prüfung der biologischen Reaktionen der lebenden Gewebe auf zahnärztliche Kunststoffe. *Dtsche Zahnärztl Z* 30:126-131 (1975)
58. Köhler W, Mochmann H: Grundriss der medizinischen Mikrobiologie. 4.Auflage, Gustav Fischer Jena (1975)
59. König KG: Karies und Kariesprophylaxe. Goldmann München, 2. Auflage (1974)
60. Kowitz GM, Wong R, Montgomery RE, Nathoo SA: Colour stability of an antimicrobial composite. *J Dent Res* 78:234 (1999)
61. Krämer A, Netuschil L, Simonis A: Plaqueanlagerung an verschiedenen Verblendkunststoffen. *Dtsche Zahnärztl Z* 45: 482-484 (1990)
62. Krasse B: Die Quintessenz des Kariesrisikos. Quintessenz-Verlag Berlin (1986)
63. Krejci I, Lutz F: Seitenzahn - Composite, warum (noch) nicht ?. *Phillip Journal* 1: 5-12 (1986)
64. Kullmann W: Atlas der Zahnerhaltung mit Glasionomerkementen und Komposit-Kunststoffen. Hanser Verlag, München, D (1990)



65. Kunzelmann K-H, Mehl A: Karieshemmende Füllungswerkstoffe. In: Boer, W – M: Metallfreie Restaurationen, Spitta, Balingen (1999)
66. Lang, N. P., Sander, L., Barlow, A., Brennan, K., White, D. J., Bacca, L., Bartizek, R. D., McClanahan, S. F., “Experimental Gingivitis Studies: Effects of triclosan and triclosan-containing dentifrices on dental plaque and gingivitis in three-week randomized controlled clinical trials”, *J Clin Dent* 13(4): 158-166 (2002)
67. Langeland K, Cotton WR: Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int Dent J* 30: 140-88 (1980)
68. Lehmann RR: Ökologie der Mundhöhle-Grundlagen der Vorsorge. *Dent-Praxis*, Georg Thieme Stuttgart, New York (1991)
69. Liljemark WF, Bloomquist CG, Reilly BE, Bernards CJ, Townsend DW, Pennock AT: Growth dynamics in natural biofilm and its impact on oral disease management. *Adv Dent Res* 11: 14-23 (1997)
70. Liljemark WF, Fenner LJ, Bloomquist CG: In vivo colonisation of salivary pellicle by haemophilus, actinomyces and streptococcus species. *Caries Res* 20: 481-497 (1986)
71. Lutz F, Phillips RW, Roulet JF, Imfeld T: Komposits - Klassifikation und Wertung. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 93: 914-929 (1983)
72. Madapallimattam G, Bennick A: Phosphopeptides derived from human salivary acidic proline-rich proteins. Biological activities and concentration in saliva. *Biochem J* 270: 297-304 (1990)

73. Marsh PD, Bradshaw DH: Dental Plaque as a biofilm. *J Int Microbiol Biot* 15: 169-175 (1995)
74. Marsh PD, Bradshaw DH: Microbiological effects of new agents in dentifrices for plaque control. *Int Dent J* 49: 399-406 (1993)
75. Marsh PD, Martin MV: *Oral Microbiology*, 4. Auflage Wright Bristol (1999)
76. Marsh PD, Martin MV: *Oral microbiology*. Second Ed, American Society for Microbiology: 26-47 (1984)
77. Marsh PD, Martin MV: *Orale Mikrobiologie*. Thieme Stuttgart (2003)
78. Marsh PD: Microbiological aspects of dental plaque and dental caries. *Dent Clin North Am* 43: 599-614 (1999)
79. Marsh PD: Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J Dent Res* 71: 1431-1438 (1992)
80. Müller HE: *Die Infektionserreger des Menschen*. Springer, 103-125 (1989)
81. Müller HP: *Parodontologie*. Thieme Stuttgart (2001)
82. Neupert G, Welker D: Bestimmung der Gewebsverträglichkeit stomatologischer Werkstoffe an Zellkulturen. *Zahn Mund Kieferheilkd* 63: 134-141 (1975)

83. Nikiforuk G: Understanding dental caries. Vol.1. Etiology and mechanism. Basic and clinical aspect. Karger Basel, 1. Auflage (1985)
84. Nolden R: Zahnerhaltungskunde. Thieme Stuttgart (1994)
85. Norde W: Adsorption of biopolymers and its relevance for particle adhesion: a physico-chemical approach. Oxford, IRL Press Ltd. (1984)
86. O'Connell JJ, Kwan SC: Fluorine-containing dental materials. US Patent 4.772.325
87. Orstavik D, Hensten-Pettersen A: Antibacterial activity of tooth-colored dental restorative materials. J Dent Res 57:171-174 (1978)
88. Paracelsus, Preu HA, Leupoldt JM: Das System der Medizin des Theophrastus Paracelsus. Verlag von G. Reimer Berlin: S.232 Abs.186 (1838)
89. Peutzfeldt A, Asmussen E: In vitro wear, hardness, and conversion of diacetyl-containing and propanal-containing resin materials. Dent Mater 12(2):103-108 (1996)
90. Peutzfeldt A, Asmussen E: Influence of aldehydes on selected mechanical properties of resin composites. J Dent Res 71(8):1522-1524 (1992)
91. Peutzfeldt A, Asmussen E: Influence of ketones on selected mechanical properties of resin composites. J Dent Res 71(11):1847-1850 (1992)

92. Peutzfeldt A: Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur J Oral Sci* 105(2):97-116 (1997)
93. Peutzfeldt A: Retention of propanal and diacetyl in experimental resins. *Acta Odontol Scand* 55(2):94-100 (1997)
94. Pratten J, Wilson M: Antimicrobial susceptibility and composition of microcosm dental plaque supplemented with sucrose. *Antimicrob Agents Ch* 43: 1595-1599 (1999)
95. Pruitt KM, Caldwell RC, Jamieson AD, Taylor RE: The interaction of salivary proteins with the tooth surface. *J Dent Res* 48: 818-823 (1969)
96. Pruitt KM: Macromolecular components of oral fluids at tooth surfaces. *Swed Dent J* 1: 225-240 (1977)
97. Quirynen M, Bollen CM: The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol* 22: 1-14 (1995)
98. Quirynen M: The clinical meaning of the surface roughness and the surface-free energy of intraoral hard substrata on the microbiology of the supra- and subgingival plaque: results of in vitro and in vivo experiments. *J Dent* 22: 13-26 (1994)
99. Rawls HR, Wellinghoff VT, Norling BK, Leamon SH, Swynnerton NF, Wellinghoff ST: Low shrinkage resins from liquid crystal diacrylate monomers. *Polymer Preprints* 38:167-168 (1997)

100. Rawls HR: Fluoride-releasing acrylics. *J Biomater Appl* 1: 382-405 (1987)
101. Rawls HR: Preventive Dental Materials: Sustained Delivery of Fluoride and Other Therapeutic Agents. *Adv Dent Res* 5:50-55 (1991)
102. Reinhardt KJ: Der Einfluss der Lichtquelle auf die Randständigkeit von Kompositfüllungen. *Dtsche Zahnärztl Z* 46: 123-134 (1991)
103. Ritchie, J. A., Jones, C. L., "The inhibition of facultative and obligate anaerobic bacteria by triclosan" In *Anaerobes Today* (eds. Hardie, J. M., Borriello, S. P.), Wiley pp. 240-241 (1988)
104. Rönström A, Edwardsson S, Attsröm R: Streptococcus sanguis and streptococcus salivarius in early plaque formation on plastic films. *J Periodontol Res* 12: 331-339 (1977)
105. Rosan B, Lamont RJ: Dental plaque formation. *Microbes Infect* 2: 1599-1607 (2000)
106. Roulet JF, Roulet-Mehrens TK: The surface roughness of restorative materials and dental tissues after polishing with prophylaxis and polishing pastes. *J Periodont* 53: 257-266 (1982)
107. Roulet JF: Degradation of dental polymers. Karger Verlag, Basel (1987)
108. Rzanny A, Göbel R, Welker D: Werkstoffkundlicher Vergleich temporärer K&B-Kunststoffe. *Phillip J* 13:357-366 (1996)

109. Sauerwein E: Kariologie und kurzgefasste Histologie und Histopathologie des Zahnes. Thieme Stuttgart (1974)
110. Scannapieco FA: Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. Crit Ref Oral Biol Med 5: 203-248 (1994)
111. Scheinin A, Mäkinen K: Turku sugar studies V-XIV and XVIII-XX. Acta Odontol Scand 33: 1 (1975)
112. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D: Biokompatibilität zahnärztlicher Werkstoffe. Urban & Fischer (2005)
113. Schmalz G: Ein Vergleich zweier Eluationsverfahren zur biologischen Materialprüfung. Dtsche Zahnärztl Z 33:850-855 (1978)
114. Schmalz G: Über die Empfindlichkeit verschiedener In-Vitro-Testsysteme bei der biologischen Materialprüfung. Dtsche Zahnärztl Z 32: 878-879 (1977)
115. Seymour RA, Heasman PA: Pharmacological control of periodontal disease.II.Antimicrobial agents. J Dent 23: 5-14 (1995)
116. Skjörland K, Hensten-Pettersen A, Orstavik D, Söderholm KJ: Tooth colored dental materials: porosities and surface topography in relation to bacterial adhesion. Acta Odontol Scand 40: 113-120 (1982)
117. Skjörland KK, Sönju T: Effect of sucrose rinses on bacterial colonization on amalgam and composite. Acta Odontol Scand 40:193- 196 (1982)

118. Skjörland KK: Bacterial accumulation on silicate and composite materials. *J Biol Buccale* 4: 315-322 (1976)
119. Skjörland KK: Plaque accumulation on different dental filling materials. *Scand J Dent Res* 81:538-542 (1973)
120. Socranscy SS, Manganiello AD, Propas D, Oram V, Van Houte J: Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *J Peridontol Res* 12: 90-106 (1977)
121. Svanberg M, Mjör IA, Orstavik D: Mutans streptococci in plaque from margins of amalgam, composite and glas ionomer restaurations. *J Dent Res* 69: 861-864 (1990)
122. Takahashi Y, Imazato S, Kaneshiro AV, Ebisu S, Frencken JE, Tay FR: Antibacterial effects and physical properties of glass-ionomer cements containing chlorhexidine for the ART approach. *Dent Mater: official publication of the Academy of Dental Materials* 22(7):647-52 (2006)
123. Takahashi Y, Imazato S, Russell RRB, Noiri Y, Ebisu S: Influence of resin monomers on growth of oral streptococci. *J Dent Res* 83(4):302-6 (2004)
124. Takemura K, Sakamoto Y, Staninec M, Kobayashi M, Suehiro K, Tsuchitani Y: Antibacterial activity of a Bis-GMA based composite resin and antibacterial effect of chlorhexidine incorporation. *Jpn J Conserv Dent* 26:540-547 (1983)

125. Ten Cate JM, Leach SA, Arends J: Bacterial adhesion and preventive dentistry. IRL Press LTD Oxford, 1. Auflage 1-17 (1984)
126. Theilade E, Theilade J, Mikkelsen L: Microbiological studies on early dento-gingival plaque on teeth and mylar strips in humans. J Peridontol Res 17: 12-25 (1982)
127. Vaidyanathan TK, Vaidyanathan J, Mehra R, Montgomery RE, Nathoo SA: Effect of antimicrobial ingredient on the colour stability of composite. J Dent Res 78: 313 (1999)
128. Vaidyanathan TK, Vaidyanathan J, Murty VLN, Montgomery RE, Nathoo SA: Antimicrobial activity and its retention in an antibacterial composite. J Dent Res 78:314 (1999)
129. Van Pelt AWJ, De Jong HP, Busscher HJ, Arends J: Dispersion and polar surface free energies of human enamel. J Biomed Mat Res 17: 637-641 (1983)
130. Viohl J: Kunststoff-Füllungswerkstoffe. In: Eichner K (Hrsg.): Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung Band I , Hüthing, Heidelberg : 125-158 (1985)
131. Wagenknecht G: Weichbleibende Unterfütterungsmaterialien Standortbestimmung. Dent Labor 37: 1655-1656 (1989)
132. Weiger R, Netuschil L, van Ohle G, Brex M: Vital microorganism in early supra-gingival dental plaque and in stimulated human saliva. J Periodontal Res 32: 233-240 (1997)



133. Welker D, Neupert G, Öhring H: Aspekte der Toxizitätsprüfung stomatologischer Werkstoffe. Zahn Mund Kieferheilkd 74: 699-705 (1986)
134. Welker D, Neupert G: Bestimmung der Gewebsverträglichkeit stomatologischer Werkstoffe an Zellkulturen. Zahn Mund Kieferheilkd 63: 134-141 (1975)
135. Welker D, Öhring H, Erbsmehl J, Bleischwitz B: Antimikrobielle Eigenschaften zahnärztlich-restaurativer Werkstoffe. Zahn Mund Kieferheilkd 72: 291-304 (1984)
136. Welker D: Biologische Prüfung von zahnärztlichen Werkstoffen - Ziele, Möglichkeiten und Aussagewert. Quintess Zahntech 17: 463-472 (1991)
137. Welker D: Das biologische Risiko Zahnärztlicher Werkstoffe. Sonderdruck (2002)
138. Zuhrt R: Nomenklatur und Schmelzoberhäutchen. Dtsch Stomatol 14: 775-779 (1964)

Tab. 7: Ergebnisse der Versuche mit Euaten

S.m.								
Probe/Elution	Kon	1:640	1:320	1:160	1:80	1:40	1:20	1:10
mit BPH	503438	472969	506094	502969	440469	370938	375000	468906
ohne BPH	491667	445833	470833	504167	487500	395833	470833	420833
Standardabweich	69677	59597	57670	66145	52323	60943	54329	83576
	63621	79557	93329	106066	83452	99901	72237	77536
t-Test (Vgl. Kon)		0,194	0,907	0,985	<b>0,007</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,214
t-Test (Vgl. Kon)		0,224	0,610	0,779	0,912	<b>0,038</b>	0,550	0,066
t-Test (Vgl +/-)	0,692	0,357	0,264	0,973	0,103	0,455	<b>0,001</b>	0,188
S. san								
Probe/Elution	Kon	1:640	1:320	1:160	1:80	1:40	1:20	1:10
mit BPH	1475000	1072500	868750	950000	1200000	762500	1037500	1087500
ohne BPH	1450000	1437500	1275000	1187500	1025000	1125000	1037500	1175000
Standardabweich	309377	704207	190746	508499	337004	162019	410357	277424
	213809	130247	116496	124642	103510	218763	250357	225198
t-Test (Vgl. Kon)		0,161	<b>0,000</b>	<b>0,026</b>	0,111	<b>0,000</b>	<b>0,030</b>	<b>0,019</b>
t-Test (Vgl. Kon)		0,890	0,061	<b>0,010</b>	<b>0,000</b>	<b>0,009</b>	<b>0,003</b>	<b>0,025</b>
t-Test (Vgl +/-)	0,854	0,171	<b>0,000</b>	0,220	0,182	<b>0,002</b>	1,000	0,500
C. albic								
Probe/Elution	Kon	1:640	1:320	1:160	1:80	1:40	1:20	1:10
mit BPH	146000	192500	188125	156250	165000	151875	149375	141300
ohne BPH	143063	101500	128188	137813	122938	146563	152688	146125
Standardabweich	22854	24928	21034	42991	46599	62160	69201	37944
	13930	41581	25510	11215	42060	2921	11058	9307
t-Test (Vgl. Kon)		<b>0,002</b>	<b>0,002</b>	0,561	0,318	0,806	0,898	0,768
t-Test (Vgl. Kon)		<b>0,018</b>	0,170	0,420	0,220	0,498	0,148	0,613
t-Test (Vgl +/-)	0,761	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,260	0,079	0,813	0,896	0,732
A. viscosus								
Probe/Elution	Kon	1:640	1:320	1:160	1:80	1:40	1:20	1:10
mit BPH	110833	154375	149286	124688	66500	124688	83125	53438
ohne BPH	112500	101875	97500	101875	109375	83750	79375	76313
Standardabweich	72557	290322	231536	94788	26017	150074	21988	77999
	7071	12229	11339	37123	27050	15755	8634	34365
t-Test (Vgl. Kon)		0,809	0,529	0,826	0,244	0,884	0,325	0,298
t-Test (Vgl. Kon)		0,052		0,440	0,757	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,011</b>
t-Test (Vgl +/-)	0,945	0,247	0,246	0,536	<b>0,017</b>	0,456	0,660	0,460
P. gingivalis								
Probe/Elution	Kon	1:640	1:320	1:160	1:80	1:40	1:20	1:10
mit BPH	15250	14310	13560	12810	11812	11375	8750	8687
ohne BPH	13750	15750	8284	3600	8000	16750	5600	6000
Standardabweich	16201	19001	10800	961	1438	1575	886	2618
	10389	37362	5120	2252	5757	39496	7118	6234
t-Test (Vgl. Kon)		0,308	<b>0,028</b>	<b>0,003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
t-Test (Vgl. Kon)		0,504	0,220	0,056	0,212	0,470	0,164	0,092
t-Test (Vgl +/-)	0,583	0,964	0,112	<b>0,000</b>	0,060	0,795	0,200	0,217

Tab. 8: Ergebnisse der Versuche mit Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl]phosphat

S. m.												
Konzentration (%)	0	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16	0,32	0,64	1,25	2,5	5	10
	1887500	1800000	1293750	1331250	1462500	1125000	1243750	1387500	1537500	1712500	1156250	7375
	241646,14	405321,742	388621,649	530456,34	282526,863	440778,532	316721,486	419821,391	351273,194	186605,007	530119,596	5235,52426
<b>BPH</b>	0	<b>0,01</b>	<b>0,02</b>	<b>0,04</b>	<b>0,08</b>	<b>0,16</b>	<b>0,32</b>	<b>0,64</b>	<b>1,25</b>	<b>2,5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
	629167	600000	431250	443750	487500	375000	414583	462500	512500	570833	385417	2458
	80549	135107	129541	176819	94176	146926	105574	139940	117091	62202	176707	1745
t-Test		0,608	<b>0,003</b>	<b>0,017</b>	<b>0,006</b>	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>	<b>0,011</b>	<b>0,036</b>	<b>0,127</b>	<b>0,003</b>	<b>0,000</b>
S. san												
	0	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16	0,32	0,64	1,25	2,5	5	10
	605000	506250	530000	390000	425000	568750	597500	476250	403750	362500	232500	66375
	23904,5722	68647,6511	56309,5189	9258,201	122240,98	18650,9189	135198,267	72098,6427	140604,562	207002,415	68660,6562	37446,8671
<b>BPH</b>	0	<b>0,01</b>	<b>0,02</b>	<b>0,04</b>	<b>0,08</b>	<b>0,16</b>	<b>0,32</b>	<b>0,64</b>	<b>1,25</b>	<b>2,5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
	1210000	1012500	1060000	780000	850000	1117500	1195000	952500	807500	725000	465000	132750
	47809	137295	116619	18516	244482	37702	270397	144197	281209	414005	137321	74894
t-Test		<b>0,002</b>	<b>0,005</b>	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,879</b>	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>	<b>0,005</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
C. albic												
	0	<b>0,01</b>	<b>0,02</b>	<b>0,04</b>	<b>0,08</b>	<b>0,16</b>	<b>0,32</b>	<b>0,64</b>	<b>1,25</b>	<b>2,5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
<b>BPH</b>	162000	160250	159600	166250	162375	155125	152500	163250	175000	156625	123375	122500
	12972	10512	10447	5946	5706	7568	10433	23608	30128	13835	28715	21817
t-Test		0,771	0,678	0,414	0,941	0,216	0,129	0,897	0,281	0,436	<b>0,004</b>	<b>0,001</b>
A. viscosus												
	0	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16	0,32	0,64	1,25	2,5	5	10
	353750	447500	436250	423750	463750	447500	410000	470000	451625	390000	375	0
	64128,7767	21213,2034	66962,1428	90701,6302	163701,601	53917,927	34641,0162	60944,94	129541,982	58309,5189	1060,66017	0
<b>BPH</b>	0	<b>0,01</b>	<b>0,02</b>	<b>0,04</b>	<b>0,08</b>	<b>0,16</b>	<b>0,32</b>	<b>0,64</b>	<b>1,25</b>	<b>2,5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
	176875	223750	218125	211875	231875	223750	205000	235000	225813	195000	188	0
	32064	10607	33481	45351	81851	26969	17321	30472	64771	29155	530	0
t-Test		<b>0,002</b>	<b>0,025</b>	0,096	0,099	<b>0,007</b>	<b>0,047</b>	<b>0,002</b>	<b>0,076</b>	0,257	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
P. gingivalis												
	0	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16	0,32	0,64	1,25	2,5	5	10
	6857,14286	1625	1375	2870	1250	2625	375	125	375	500	0	0
	641,426981	277,424378	315,945294	2290	175,254916	413,823634	106,066017	35,3553391	74,4023809	75,5928946	0	0
<b>BPH</b>	0	<b>0,01</b>	<b>0,02</b>	<b>0,04</b>	<b>0,08</b>	<b>0,16</b>	<b>0,32</b>	<b>0,64</b>	<b>1,25</b>	<b>2,5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
	13714	3250	2750	5740	2500	5250	750	250	750	1000	0	0
	1283	555	632	4580	351	828	212	71	149	151	0	0
t-Test		0,056	0,051	0,581	<b>0,033</b>	0,148	<b>0,014</b>	<b>0,011</b>	<b>0,014</b>	<b>0,015</b>	<b>0,009</b>	<b>0,009</b>

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erklären wir, dass uns die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, wir die Dissertation selbst angefertigt haben und alle von uns benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in unserer Arbeit angegeben sind und uns folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. med. habil. W. Pfister, Frau PD Dr. med. S. Eick, Herr Dr. Göbel, die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von uns für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass wir die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht haben und dass wir die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht haben.

Rohr, den 23.01.2010

Katja Müller

Susann Krehan

## **Selbstständigkeitserklärung**

Wir erklären, dass wir die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt haben.

Rohr, 23. Januar 2010

Rohr, 23. Januar 2010

Katja Müller führte die Untersuchungen mit den Eluaten der frisch hergestellten Prüfkörper durch und bearbeitete die Kapitel 3.4.2. und 4.2..

Rohr, 23. Januar 2010

Susann Krehan führte die Untersuchungen mit den BPH-Verdünnungsreihen durch und bearbeitete die Kapitel 3.4.1. und 4.1..

Rohr, 23. Januar 2010

Die Untersuchungen zur Bakterienadhärenz wurden von uns gemeinsam durchgeführt und die restlichen Kapitel gemeinsam verfasst.

Rohr, 23. Januar 2010

Rohr, 23. Januar 2010