

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde,

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. M. Hannig

Einfluss von experimentellen Mundspüllösungen auf die 48 h- Biofilmbildung am Dentin in situ

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2022

vorgelegt von:

Eisenmenger, Tobias Andreas

geb. am: 19.08.1992 in Gelnhausen

Tag der Promotion: 20.05.2022

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Hannig

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

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1 Deutsche Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	2
2 EINLEITUNG	3
2.1 Literaturübersicht	4
2.1.1 Dentin	4
2.1.2 Die Pellikel	5
2.1.3 Der mikrobielle Biofilm	6
2.1.4 Vitalität des Biofilms	8
2.1.5 Biofilm-Management.....	9
2.1.6 Mundspülungen	10
2.2 Ziel der Arbeit / Fragestellung	14
3 MATERIAL UND METHODE	15
3.1 Schematische Darstellung des Versuchsaufbau	15
3.2 Herstellung der Prüfkörper.....	16
3.2.1 Gewinnung und Verarbeitung.....	16
3.2.2 Reinigung und Aufbewahrung.....	16
3.2.3 Herstellung der Schienen und Montage der Prüfkörper	17
3.2.4 Herstellung der Spüllösungen.....	18
3.3 Gewinnung der in-situ- Prüfkörper	20
3.3.1 Probanden	20
3.3.2 Versuchsbedingungen und Durchführung	20

3.4 Fluoreszenzmikroskopie	21
3.4.1 Grundlagen der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von Biofilmen	21
3.4.2 Herstellung des Farbstoffs	21
3.4.3 Färbung und Fixierung der Prüfkörper	21
3.4.4 Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie	22
3.4.5 Semiquantitative Auswertung.....	22
3.5 Rasterelektronenmikroskopie.....	24
3.5.1 Fixierung der Prüfkörper	24
3.5.2 Sputtern der Prüfkörper	24
3.5.3 Durchführung der Rasterelektronenmikroskopie	24
3.6 Statistik.....	25
4 ERGEBNISSE	26
4.1 Fluoreszenzmikroskopie	26
4.1.1 Bedeckung der Dentinkörper.....	28
4.1.2 Vitalität	31
4.1.3 Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen	34
4.2 Rasterelektronenmikroskopie.....	39
5 DISKUSSION	43
5.1 Diskussion von Material und Methode	43
5.1.1 Bovines Zahnmaterial (Dentin)	43
5.1.2 Modell der Studie	44
5.1.3 Studienbedingungen	45
5.1.4 Fluoreszenzmikroskopie	46
5.1.5 Rasterelektronenmikroskopie	47

5.1.6 Quantifizierung durch Scoring	47
5.1.7 Biofilmbildung.....	48
5.2 Diskussion der Ergebnisse	49
5.2.1 Diskussion der Zielsetzung.....	49
5.2.2 Kontrollspülung mit Wasser	50
5.2.3 Hydroxylapatit als Spüllösung.....	50
5.2.4 Chitosan als Spüllösung.....	51
5.2.5 Tanninsäure als Spüllösung	52
5.2.6 Chlorhexidin als Spüllösung.....	54
5.3 Schlussfolgerung	55
6 LITERATURVERZEICHNIS	56
7 PUBLIKATION/ DANKSAGUNG	71
7.1 Publikation	71
7.2 Danksagung	71
8 ANHANG	72
8.1 Datenblätter	72
8.1.1 Kalident.....	72
8.1.2 Tanninsäure.....	73
8.1.3 Chitosan	74
8.2 Datensätze der Ergebnisse.....	75
8.2.1 Bedeckung	75
8.2.2 Vitalität	76
9 LEBENS LAUF	77

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Ziel: Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, antibakterielle und antiadhärente Eigenschaften der Stoffe Tanninsäure, Hydroxylapatit und Chitosan in Form von Spüllösungen auf den Biofilm an Dentin zu untersuchen.

Material & Methode: Zur Untersuchung dienten Prüfkörper aus bovinem Dentin, welche von den Probanden für jeweils 48 h in situ mit einer Haltevorrichtung im Seitenzahnbereich getragen wurden. Die Probanden spülten mit den jeweiligen Agenzien in zwei verschiedenen Spülprotokollen. Im ersten Spülprotokoll wurde fünfmalig und im zweiten Spülprotokoll viermalig gespült. So konnte die Kurz- und Langzeitwirkung der Agenzien auf den Biofilm untersucht werden. Nach 48 h wurden die Prüfkörper der Mundhöhle entnommen und für die fluoreszenzmikroskopische Analyse mit dem LIVE/DEAD BacLight konditioniert. Es wurde die Vitalität der Bakterien und die bakterielle Bedeckung der Prüfkörper bewertet. Zur Bewertung dienten zwei verschiedene Scoring- Systeme. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie wurden zudem rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

Ergebnisse: Die Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie zeigte für die Agenzien Hydroxylapatit und Chitosan im Vergleich zur Kontrollspülung Wasser keine signifikanten Unterschiede sowohl in ihren Effekten auf die Vitalität des Biofilms als auch auf antiadhärente Eigenschaften. Dies zeigte sich für das erste und das zweite Spülprotokoll. Nach der Spülung mit Tanninsäure zeigte sich im ersten Spülprotokoll ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mit Wasser hinsichtlich der bakteriellen Vitalität und der bakteriellen Bedeckung des Biofilms. Im zweiten Spülprotokoll wurde nach der Spülung mit Tanninsäure keine signifikante antibakterielle und antiadhärente Wirkung festgestellt. Die Prüfkörper nach der Spülung mit Chlorhexidin zeigten sowohl lang- als auch kurzwirksam eine verminderte Vitalität der Bakterien verglichen mit denen nach der Kontrollspülung Wasser. Zudem zeigten die Prüfkörper nach der Spülung mit Chlorhexidin in beiden Spülprotokollen eine geringere bakterielle Bedeckung verglichen nach der Spülung mit Wasser.

Fazit: Tanninsäure ist mit antibakteriellen und antiadhärenten Eigenschaften ein potentielles Agens hinsichtlich eines erfolgreichen Biofilm-Managements. Die Agenzien Chitosan und Hydroxylapatit zeigten unter den Versuchsbedingungen weniger Einfluss auf die Biofilmbildung.

1.2 Abstract

Aim: The aim of the present work was to investigate the antibacterial and antiadherent properties of the substances tannic acid, hydroxyapatite and chitosan in form of rinsing solutions on the biofilm on dentin.

Material & method: Test specimens made of bovine dentine were used for the investigation, which were carried by the test persons in situ for 48 hours with a holding device on the posterior teeth. The subjects rinsed with the agents in two different rinsing protocols. In the first rinsing protocol, it was rinsed for five times and in the second rinsing protocol for four times. In this way, the short-term and long-term effects of the agents on the biofilm could be investigated. After 48 h, the test specimens were removed from the oral cavity and conditioned with the LIVE / DEAD BacLight for fluorescence microscopic analysis. The vitality of the bacteria and the bacterial coverage of the test specimens were evaluated. Two different scoring systems were used for the evaluation. The results of the fluorescence microscopy were also examined using a scanning electron microscope.

Results: The fluorescence microscopic evaluation showed no significant differences for the agents hydroxyapatite and chitosan in comparison to the control rinse water, either in their effects on the vitality of the biofilm or on anti-adherent properties. This was shown for the first and the second rinsing protocol. For rinsing with tannic acid, the first rinsing protocol showed a significant difference to the control group with water in terms of bacterial vitality and bacterial coverage of the biofilm. In the second rinsing protocol, no significant difference in antibacterial and anti-adherent effects after rinsing with tannic acid compared to rinsing with water was found. The test specimens after rinsing with chlorhexidine showed both long-term and short-term reduced vitality of the bacteria compared with those after the control rinse with water. In addition, after rinsing with chlorhexidine, the test specimens showed lower bacterial coverage in both rinsing protocols compared to rinsing with water.

Conclusion: With its antibacterial and antiadherent properties, tannic acid is a potential agent in terms of a successful biofilm management. The agents chitosan and hydroxyapatite showed less influence on biofilm formation under the test conditions.

2 Einleitung

Zur Erlangung oraler Gesundheit suchen Wissenschaftler und zahnärztliche Gesellschaften nach effektiven Maßnahmen gegen Karies, Gingivitis und parodontale Erkrankungen. Nach Longbottom et al. (2009) können kariöse Läsionen durch geeignete Prophylaxemaßnahmen in ihrer Entstehung und ihrem Prozess aufgehalten werden [88]. Als eine wichtige vorbeugende Maßnahme wird hierbei die Kontrolle der oralen mikrobiellen Flora gesehen. Um das Entstehen einer pathologischen Mundflora zu vereiteln, werden vor allem die mechanische und chemische Plaquekontrolle untersucht und empfohlen [83]. Mit Mundspüllösungen wird versucht über chemische Modifizierung des Biofilms oder antimikrobielle Effekte, z.B. durch die Abtötung von pathologischen Keimen, orale Erkrankungen zu verhindern. In der 2018 erschienenen Leitlinie der DGZMK und DGParo wird die Notwendigkeit von Mundspülungen als unterstützende Maßnahme zur Prävention von oralen Pathologien bestärkt [17]. Um einer Gingivitis vorzubeugen, werden Mundspülungen, wie Chlorhexidin und ätherische Öle, empfohlen. Zudem sollen Mundspülungen dort Anwendung finden, wo eine effektive mechanische Reinigung nicht gewährleistet werden kann. Dies betrifft Pflegebedürftige, Patienten mit geistigen bzw. körperlichen Einschränkungen, Menschen mit speichelbeeinflussender Therapie und Medikation und Menschen mit für mechanische Reinigung schwer zugänglichen oralen Bereichen [15,129]. Chlorhexidin wird in den Leitlinien empfohlen und gilt bei der chemischen Plaquereduzierung als Goldstandard [75]. Zahlreiche Studien belegen eine antibakterielle, plaquereduzierende Wirkung von Chlorhexidin [50,94,95]. Gleichzeitig gibt es wissenschaftliche Bedenken bei der Anwendung von Chlorhexidin. Nebenwirkungen, wie Zahnverfärbungen und Geschmacksirritationen, werden beschrieben. (Aufgrund anaphylaktischer Reaktionen besteht beispielsweise in Japan ein Zulassungsverbot für Chlorhexidin) [18,95,141]. Aufgrund dieser Tatsache wird nach nebenwirkungsfreien, biokompatiblen und bioaktiven Wirkstoffen gesucht [32,68,94]. Hierbei wurde an verschiedenen organischen Wirkstoffen bereits geforscht und über antibakterielle Effekte berichtet. Die in der vorliegenden Studie untersuchten organischen Agenzien, Tanninsäure, Chitosan sowie das anorganische Hydroxylapatit sind bereits im Forschungsfeld zur Prävention von oralen Pathologien erprobt [36,78,79]. Die folgende Studie stellt einen Vergleich von experimentellen Mundspüllösungen mit 0,2 % Chlorhexidin an.

Dentin stellt als Zahnhartsubstanz einen wichtigen Faktor in der Pathogenese von Karies dar. Besonders bei fortgeschrittenen Kariesläsionen, freiliegenden Zahnhälsen und Wurzeln kann

es zum Substrat werden, auf dem sich der mikrobielle pathologische Prozess vollzieht [47,134]. Die anatomische Struktur des Dentins spielt hierbei eine entscheidende Rolle [77].

Infolge dessen wurde ein Studienmodell entwickelt, das fünf Mundspüllösungen miteinander vergleicht und deren Effekte auf den oralen Biofilm auf dem Substrat Dentin untersucht.

2.1 Literaturübersicht

2.1.1 Dentin

Trotz der hohen Exposition von Schmelzoberflächen gegenüber oralen Flüssigkeiten spielt Dentin bei oralen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Dentin umgibt das pulpale Gewebe und wird koronal von Schmelz und an den Wurzeln von Zement bedeckt [67]. Mit 70 % anorganischem Anteil, 20 % organischem Anteil und 10 % Wasser unterscheidet es sich von dem härteren Zahnschmelz. Zudem ist es elastisch, verformbar und weist eine höhere Permeabilität für Flüssigkeiten als Schmelz vor. Ähnlich wie beim Schmelz besteht der mineralische Teil vor allem aus Kalzium und Phosphat [67]. Das organische Gewebe besteht zu ca. 90 % aus einem Netzwerk von Fibrillen aus Kollagen Typ I [30,67]. In diesem Netzwerk sind Hydroxylapatitkristalle innerhalb und um die Fasern abgelagert. Zudem befindet sich eine Vielzahl von sauren nicht kollagenen Proteinen und Proteoglykanen mit einem Anteil von ca. 9 % in dieser mineralisierten Matrix [30,76]. Die Morphologie ist durch die Dentinkanälchen gekennzeichnet, welche sich mit einer Anzahl von 45.000/mm² und einem durchschnittlichen Durchmesser von 2,5 µm im pulpanahen Dentin befinden. Am schmelznahen Dentin ist die Dichte mit einer Anzahl von 20.000/mm² geringer und der Durchmesser mit 0,9 µm kleiner [46]. Dies zeigt sich auch im Vergleich der Anteile der pulpanahen (28 %) und schmelznahen (4 %) Tubulivolumina am gesamten koronalen Volumen der Dentintubuli [46].

Dentin kann z. B. durch freiliegende Zahnhälse und Wurzeln exponiert sein. Außerdem kann Dentin durch kariogene und abrasive Prozesse, z.B. Zähneputzen oder Attrition, mit der Mundflora in Kontakt kommen [77,87,134]. Für die Pathogenese von Karies, Gingivitis und Parodontitis stellt die Bakterienakkumulation eine Schlüsselrolle dar [63,82,93,133]. Die durch Tubuli geprägte Morphologie des Dentins bietet einen geeigneten Ort zur Bakterienbesiedlung, da es die Bakterien vor Scherkräften schützen kann. In einer In-vivo-Studie konnte bereits gezeigt werden, dass sich nach einer zeitlichen oralen Exposition von 2 h bis 6 h signifikant mehr Bakterien am Dentin adhäreren als an der Schmelzoberfläche [77]. Zudem wurde gezeigt, dass sich

Bakterien in den Dentintubuli und an den Tubuluswänden vermehrt ablagern [77]. Im Vergleich von Oberflächenstrukturen aus verschiedenen Dentalmaterialien und deren Bakterienadhärenz konnte gezeigt werden, dass Dentin nach 4 h intraoraler Exposition die höchste Anzahl von Mikroorganismen vorweist [126].

2.1.2 Die Pellikel

In der Mundhöhle tritt der Speichel mit der Zahnhartsubstanz in Kontakt. Es bildet sich eine initiale bakterienfreie azelluläre Bedeckung auf der Oberfläche, genannt Pellikel. Die Pellikel stellt sich als Schicht von adsorbierten Makromolekülen und Speichelproteinen auf der Zahnhartsubstanz dar. Hierbei ist die Bildung der Pellikel von hoher Selektivität, denn nur gewisse Proteine aus dem Speichel treten in Verbindung mit der Zahnhartsubstanz [142]. Die Pellikelbildung lässt sich in eine kurze initiale Phase und eine längere spätere Phase unterteilen. Außerdem ist sie ein dynamischer Prozess, der von gewissen Faktoren, wie physiochemische Eigenschaft der Substratoberflächen, Zeit, Lokalisation und die bei der Adsorption beteiligten Moleküle abhängig ist [60,64,155].

In der initialen Phase werden gewisse Speichelproteinen, wie Statherin und Histatin, bereits durch elektrostatische Wechselwirkungen adsorbiert. Die Zahnoberfläche bildet mit den in den Speichel in Lösung gegangenen Kalzium-Ionen eine positive Ionenschicht, welche von den negativ geladenen funktionellen Gruppen der Speichelproteine, genannt Präkusor-Proteine, gebunden werden. Zudem werden van- der- Waals- Kräfte und hydrophobe Wechselwirkung bei der Proteinadsorption vermutet. Die initiale Phase spielt sich in einem Zeitraum von wenigen Sekunden bis 3 min ab und es entsteht eine Schichtdicke von 10- 20 nm Dicke. In der initialen Pellikel wurden Amylase, Cystatine, Lysozyme, Carboanhydrasen und Lactoferrin nachgewiesen [53,54,148].

Die zweite Phase der Pellikelbildung ist geprägt von der Interaktion zwischen den bereits initial adsorbierten Proteinen und Proteinen sowie Proteinagglomeraten aus dem Speichel. Es kommt zur kontinuierlichen Adsorption von Speichelproteinen und zu einem raschen Anstieg der Pellikelschichtdicke auf 100- 700 nm innerhalb von 30- 90 min [56]. Im Speichel befinden sich mizellenartige Protein- Agglomerate, welche hydrophobe und hydrophile Anteile aufweisen, sowie heterotypische Komplexe, welche aus Proteinen und Enzymen gebildet werden. Diese sogenannten supramolekulären Pellikel-Präkusoren stellen eine Schlüsselrolle in der Biofilmentwicklung dar [60]. Sie dienen als Speicher für Pellikel-Präkusoren und als Prävention gegen einen proteolytischen Abbau von Speichelproteinen [149].

Im Mikrometer- Bereich zeigt sich die Pellikel durch Elektronenmikroskopie mit einer basalen elektronendichten und einer äußeren, weniger elektronendichten Schicht. Die basale Schicht ist bereits nach einer Minute in- situ entstanden und stellt sich homogen elektronendicht und feinkörnig strukturiert dar [56]. Die äußere globuläre Schicht der Pellikel ist locker angeordnet, variiert in ihrer Schichtdicke und die Struktur ist abhängig von ihrer Lokalisation in der Mundhöhle und der Zeit der Pellikelbildung [60].

Die Pellikel besitzt sowohl physiologische als auch pathophysiologische Eigenschaften. Sie schützt die Zähne als Lubrikant vor Attrition durch die Reduktion der Reibung antagonistischer Zähne als auch zwischen Mukosa und Zähnen. Dieser Effekt ist für die Mastikation und den Sprechprozess von Bedeutung [6]. Die Pellikel dient als semipermeable Diffusionsbarriere, welche den Kalzium- und Phosphat- Ionen- Austausch regelt. Außerdem weist sie protektive Eigenschaften für die Zahnhartsubstanzen vor. Einerseits schützt sie vor der Demineralisation durch Säureerosion, andererseits bildet sie eine Art Speicher für Remineralisations- Ionen [57,157]. Trotz der protektiven Eigenschaften ist die Pellikel nicht imstande, die Zahnhartsubstanz vollständig vor Demineralisationsprozessen durch äußere Einflüsse zu schützen [59]. Durch die Möglichkeit zur Adhärenz von Mikroorganismen vermittelt die Pellikel die Wechselwirkung zwischen Zahnhartsubstanz und Bakterien.

Die Zusammensetzung der Pellikel ist abhängig von verfügbaren Speichelproteinen, welche wiederum von der Ernährung beeinflusst sind. So variiert die Pellikel abhängig von den Ernährungsgewohnheiten [118,145]. Ein weiterer Faktor ist die Beeinflussung der Pellikel durch die Mundhygiene, wie beispielsweise durch Mundspüllösungen [55].

2.1.3 Der mikrobielle Biofilm

Beim Übergang von der Pellikel zum mikrobiellen Biofilm sind die genauen Stadien schwierig voneinander zu differenzieren. Hierbei ist es wichtig, den Begriff des mikrobiellen Biofilms von dem der Pellikel zu unterscheiden. Der mikrobielle Biofilm entsteht auf Basis der Pellikel. Bereits die initiale Pellikel besitzt locker gebundene Mikroorganismen [61]. Jedoch sind diese wenigen Mikroorganismen noch kein ausschlaggebender Faktor für die pathologischen Prozesse der Karies. Erst der reife Biofilm vermittelt die Entstehung einer Karies [93,96]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass viele orale Erkrankungen durch einen reifen Multi-Spezies-Biofilm ausgelöst werden [69,85]. Der mikrobielle Biofilm ist charakterisiert durch die Kolonisation von Mikroorganismen, die irreversibel entweder an der Zahnoberfläche, untereinander

oder in einer extrazellulären Matrix eingebunden sind. Es handelt sich hierbei um eine dreidimensionale Gemeinschaft an Mikroorganismen, bei der über 700 Bakterienarten beteiligt sein können [1,84,93]. Für die dentale Plaque ist das Vorhandensein einer extrazellulären Matrix charakteristisch [37,39]. Die Biofilmbildung wird durch Faktoren, wie Oberflächenenergie und Rauheit der Zahnoberfläche, sowie Scherkräfte durch Speichel und Nahrung, maßgeblich beeinflusst [31,54,107].

In mehreren Stadien reift die Pellikel zum mehrschichtigen Biofilm bis hin zur ausgereiften Plaque. Die frühe Anlagerung an die Pellikel durch Mikroorganismen ist vor allem durch physiochemische-, van-der-Waals- Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen geprägt, die mit großer Reichweite reversibel binden. Die spätere Adhärenz der Mikroorganismen erfolgt spezifischer, ist irreversibel und durch Kräfte geringerer Reichweite determiniert. Die Mikroorganismen binden in der reifen Plaque durch elektrostatische Wechselwirkungen und stereochemische Interaktionen [54,74,92,107].

Initial kommen die Bakterien aus dem Speichel und lagern sich bevorzugt an rauher Oberfläche an [107]. Zu diesen nach ungefähr zwei Stunden auftretenden Pionierkeimen gehören unter anderem Streptokokken (-mitis, -sanugis, -oralis)[51,69,91,111]. Neben der Kolonisation durch die primären Keime kommt es im Biofilm zudem zu sogenannten Co-Aggregationen [69]. Hierbei adhären Bakterien an die bereits gebundenen Bakterien und es kommt zur sekundären Kolonisation. Untereinander binden die Bakterien über Rezeptor- und Adhäsionsproteine. So ist zum Beispiel der hauptsächliche Keim für Parodontalerkrankungen, *Porphyromonas gingivalis*, in der Lage an gewisse Streptokokken zu binden [90]. Es konnte gezeigt werden, dass es in der Entstehung des Biofilm nicht nur zu einer schlichten Anhäufung von Mikroorganismen kommt, sondern, dass sich der Biofilm funktionell und strukturiert organisiert [49,93]. Die Zellen kommunizieren und tauschen Stoffwechselprodukte untereinander aus und schaffen günstige Bedingungen zur weiteren Anlagerung von Mikroorganismen. Durch diese Organisation bildet der Biofilm Resistenzen vor äußeren Einflüssen [128]. Entscheidend für die Reifung und das Wachstum der dentalen Plaque ist das Angebot und die Proliferation von Bakterien. Mit der Ausbildung einer extrazellulären Matrix wird zum einen der Biofilm strukturiert und bietet zum anderen die Möglichkeit zur Einlagerung von Zuckermolekülen. Diese werden durch Enzyme, wie Glykosyltransferase, von gebundenen Bakterien verstoffwechselt und durch deren Säureproduktion fällt der pH- Wert ab [24]. Das entstandene saure Milieu sorgt für fortschreitende Demineralisationsprozesse und die Entstehung einer Karies [134].

Innerhalb des Biofilms kann es zu Verschiebungen der adhärenen Bakterien kommen [82]. Während sich an glatten und approximalen Flächen fakultative anaerobe, grampositive Bakterien anlagern, ist der Biofilm zur parodontalen Tasche hin durch obligat anaerobe, gramnegative Bakterien gekennzeichnet. Auch zeitlich betrachtet besteht der Biofilm nach 2- 4 Stunden vor allem aus grampositiven Streptokokken, zu dem nach 1- 2 Tagen grampositive Stäbchen, wie Actinomyceten, hinzukommen. Je nach Schicht im Biofilm lassen sich anaerobe und aerobe Keime nachweisen [91,104].

2.1.4 Vitalität des Biofilms

Im Hinblick auf die Vitalität des Biofilms zeigt sich eine Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf und von der räumlichen Verteilung [14,151]. In einer Studie wurde gezeigt, dass eine Stunde nach Reinigung der Zähne der Biofilm vor allem von einer geringen Vitalität von 18 % geprägt und durch vereinzelte tote Bakterien charakterisiert ist [151]. Danach scheint die Vitalität mit der Zeit zu steigen und zeigte nach 24 Stunden einen Biofilm mit einer Vitalität von 62 % [101,151]. In einer anderen Untersuchung stellte sich bei einem Biofilm von 48 Stunden eine durchschnittliche Vitalität von 64- 76 % ein[14].

Nach Arweiler et al. (2004) ist die räumliche Betrachtung und Lokalisation des Biofilms in der Beurteilung der Vitalität wichtig. In einer Untersuchung konnten drei Schichten des Biofilms ausgemacht werden, die sich in ihrer Vitalität unterscheiden. Danach befinden sich in der innersten Schicht mit niedriger Vitalität, nahe der Zahnhartsubstanz, vor allem tote Bakterien. Darauf folgt im Zentrum eine Schicht mit hohem vitalem Anteil an Mikroorganismen. Nach außen hin zur Mundhöhle ist die Vitalität in der dritten Schicht geringer [14]. Arweiler et al. (2004) bestätigten die Beobachtung von Neuschil et al. (1998), bei der lebende Bakterien vor allem auf toten Bakterien angelagert sind [101]. Die äußere Schicht ist den Molekülen des Speichels ausgesetzt. Hierbei könnten die antibakteriellen Eigenschaften von gewissen Speichel-molekülen, wie z.B. Immunglobulin A und Lysozym, für die niedrige Vitalität verantwortlich sein. Bei der Untersuchung von Biofilmen ist es wichtig zu berücksichtigen, dass es inter-individuelle Unterschiede in der Vitalität gibt, die von Parametern, wie Speichelzusammensetzung und Substrat abhängig sind [122].

Außerdem besitzen Bakterien eine unterschiedliche Lebensfähigkeit im dentalen Biofilm. Sie können sich in verschiedenen Stadien befinden, z.B. des schnellen oder langsamen Wachstum oder auch im schlafenden Zustand der Zellvermehrung, was sich wiederum auf die Vitalität auswirkt [14,113].

Über die Untersuchung der Vitalität des Biofilms kann geprüft werden, ob eine Mundspüllösung antibakterielle Eigenschaften besitzt.

2.1.5 Biofilm-Management

Die Mundflora kolonisiert als dynamisches Mikrobiom die oralen Oberflächen und besitzt sowohl pathogene als auch physiologische Mikroorganismen [85]. Die physiologischen Keime bieten dem Biofilm und den bedeckten Substanzen Schutz vor äußeren Einflüssen. Speichelfluss, Ernährung und pH-Wert sind wichtige Faktoren für die Mundflorazusammensetzung [80]. Kommt es zu einer Störung dieser Faktoren, z. B. durch Strahlentherapie oder Medikamenteneinnahme, kann daraus ein Übergewicht von pathogenen Keimen in der Mundflora resultieren. Wirt und ‚Plaquedynamik‘ beeinflussen dabei den Übergang vom physiologischen in den pathologischen Biofilm [86,121]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Erkrankungen wie Parodontitis, Gingivitis und Karies durch pathogene Keime entstehen [25,106,133]. Ausgereifte Plaque fördert durch günstige Bedingungen zur Plaqueanlagerung eine pathologische Mundflora [106,133]. Die Plaqueansiedlung zu senken und ein physiologisches Gleichgewicht in der Mundflora herzustellen, ist die Aufgabe des Biofilm- Managements bzw. der Mundhygiene [17,20]. Das mechanische Abtragen des Biofilms hat sich als essentiell herausgestellt. So sollen Patienten zweimal pro Tag ihre Zähne putzen und Interdentalbürsten oder Zahnseide nutzen [16,28,48]. Hierbei wird der Biofilm beseitigt und aufgelockerte Biofilmreste werden auf der Zahnoberfläche zurückgelassen. Diese Reste lassen sich durch chemische Agenzien entfernen bzw. deaktivieren [26]. Hierfür können Mundspüllösungen als unterstützende Maßnahme zur Mundhygiene dienen. Die Relevanz von Mundspülungen zeigt sich zudem bei Menschen mit motorischen Einschränkungen, bimaxillären Fixationen oder oraler Candidiasis. Autoren berichten sogar von einem Ersatz der mechanischen Reinigung durch Mundspüllösungen [4,94,132].

Um das mikrobielle Gleichgewicht wieder herzustellen werden antibiotische Mittel verwendet, die unterschiedliche Prinzipien verfolgen und vereinen. Einerseits kann versucht werden, das mikrobielle Wachstum zu hemmen, andererseits können gezielt pathogene Mikroorganismen abgetötet werden [20].

2.1.6 Mundspülungen

a) Tanninsäure

Tannine gehören zur Gruppe der wasserlöslichen Polyphenole, die sich in hydrolysierte und kondensierte Form unterscheiden lassen. Tanninsäure ist ein wichtiges Gallotannin und gehört zu der Gruppe der hydrolysierbaren Tannine. Durch Hydrolyse wird sie zu Gallussäure und Glukose gespalten und besitzt schwach saure Eigenschaften [68]. Sie kommt in verschiedenen pflanzlichen Produkten, wie Obst, Gemüse und z.B. Grünem Tee vor [35,127]. Zudem wird Tanninsäure als Aromazusatz bei Fruchtsäften und Erfrischungsgetränken und als Haltbarkeitsförderer genutzt. Durch antioxidative Eigenschaften kann sie als natürlicher Abwehrmechanismus funktionieren. Durch Inhibition von Superoxidradikalen bietet sie der Zelle Schutz vor Schäden [34,78,98]. So konnte Horikawa et al.(2014) in einer In-vitro- Studie antikanzerogene Eigenschaften bei der Anwendung von Tanninen beobachten [70]. Akiyama (2001) konnte in einer in-vitro-Untersuchung zeigen, dass Tannine die antibakterielle Wirkung von β -Lactam-Antibiotika gegen *Staphylococcus aureus* unterstützen und schlussfolgerte, dass Tannine zur lokalen „antibiotischen“ Therapie von Hautinfektionen dienen könnten [7].

Für die Zahnmedizin bedeutend ist der Einfluss von Tanninen auf Mikroorganismen und die Pellikel. Eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von Mikroorganismen, wie Pilzen, Bakterien und Viren wurde bereits dokumentiert [34]. Zudem konnte Rasheed et al. (1998) in einer In-vitro- Studie antibakterielle Eigenschaften von grünen Teepflanzen beim Karieserreger *Streptococcus mutans* feststellen und vermutete Tanninsäure als mögliche Effekursache [108]. Ähnliche Effekte von Tanninen auf orale Streptokokken wurden in einer weiteren In-vitro- Studie beobachtet [153]. Stralfors entdeckte bereits 1967 einen Rückgang von Karies bei Hamstern, die mit hydrolysierbaren und kondensierten Tannine behandelt wurden [130]. Andere Untersuchungen zeigten ebenfalls antikariogene Effekte durch die Behandlung mit Tanninen [112,119]. In einer in situ/ex vivo- Studie konnte gezeigt werden, dass Tanninsäure protektive Eigenschaften auf die Pellikel ausübt [68]. Des Weiteren konnten Hertel et al. (2017) zeigen, dass die bakterielle Adhärenz und die Anlagerung von Glukan an die Pellikel durch die Anwendung von Tanninsäure signifikant reduziert wurde. Die Vermutung, dass Tannine fähig sein könnten, mit prolinreichen Speichelproteinen und Lipoteichonsäure an Zelloberflächen zu interagieren, führt zu der Annahme, dass über ähnliche Mechanismen eine Adhärenz von oralen Streptokokken verhindert werden kann [35,68]. Tanninsäure stellt aufgrund dieser Beobachtungen einen nachhaltigen Ansatz zur Kariesprävention dar [68].

b) Chitosan

Chitosan ist ein biologisches Polymer, welches aus Chitin durch Deacetylierung gewonnen werden kann [19,33]. Es entsteht z.B. als Produkt in der Verarbeitung von Schalentieren, Austern und Tintenfischen [110]. Trotz Biokompatibilität und biologischer Abbaubarkeit weist es viele reaktive Aminogruppen auf, welche die Möglichkeit chemischer Modifikation und Bildung von nützlichen Derivaten bieten [13,140]. Zudem besteht die Struktur aus einer primären und sekundären reaktiven Hydroxylgruppe. Aufgrund der strukturellen Eigenschaften ist Chitosan ein vielseitiger chemischer Reaktionspartner. Biokompatibilität und Atoxizität macht Chitosan zu einem interessanten Polymer in vielen Bereichen, wie z.B. in der Agrarkultur, der Kosmetik und der Textilindustrie. Biomedizinische Anwendung findet Chitosan zur Wundheilung, Behandlung von Verbrennungen und in der Ophthalmologie [110]. In der Zahnmedizin wurde Chitosan zur Prävention von Karies untersucht [9,13,19,33]. Im sauren Milieu fangen die Aminogruppen des Chitosan Wasserstoffionen ab, was zu einer insgesamt positiven Ladung führt und somit eine Möglichkeit der Adhäsion an der negativ geladenen Schmelzoberfläche bietet [13]. In verschiedenen Studien wies Chitosan antibakterielle Eigenschaften auf [52,120]. Chitosan assoziierte Moleküle hemmten in einer In-vitro- Untersuchung bei grampositiven und gramnegativen Bakterien die Zellteilung. Dabei waren antibakterielle Wirkung von der Konzentration und dem pH-Wert der Chitosanlösung abhängig [131]. Bei In-vitro Studien konnten antibakterielle Eigenschaften auf *Streptococcus mutans*, *Aggregibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* nachgewiesen werden [33,45,72]. Außerdem wurde in einer viertägigen In-vivo- Studie eine plaquereduzierende Wirkung von Chitosan festgestellt [19]. Durch die Exposition der Zähne mit Chitosan konnte zudem eine Adhärenz reduzierende Wirkung bei der Adsorption von *Streptococcus mutans* an Hydroxylapatit festgestellt werden [135]. In einer In- vitro- Untersuchung von Arnaud et al. (2010) wurde dokumentiert, dass Chitosan die Demineralisation von Zahnschmelz stört und die Freisetzung von Phosphor hemmt, wobei die Expositionszeit der Schmelzoberfläche mit der Chitosanlösung bedeutend ist [13]. Zusammen mit Chlorhexidin konnten für Chitosan-Lösungen synergistische antibakterielle Eigenschaften untersucht werden [19,38]. Die vorläufigen Studien und Erkenntnisse bestätigen das Konzept, Chitosan als nachhaltige Kariespräventionsmaßnahme zukünftig einzusetzen [65].

c) Hydroxylapatit

Das Mineral Hydroxylapatit hat die chemische Formel $\text{Ca}_{10}[(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ und gehört zur Apatitgruppe. Hydroxylapatit kann sowohl aus der Natur als auch synthetisch gewonnen werden und besitzt biokompatible, bioaktive und osteokonduktive Eigenschaften [40]. In Zähnen und Knochen bildet er den Teil des anorganischen Gewebes. In der Zahnmedizin findet der artifiziell hergestellte Hydroxylapatit Anwendung in der Kariesprophylaxe. Er dient zur Remineralisation bei frühen Kariesläsionen [2] und wird in Zahnpasten zur Behandlung von Dentinhypersensibilitäten eingesetzt [156]. Außerdem weist er aufhellende Eigenschaften für den Zahnschmelz auf [103]. Studien zum Hydroxylapatit widmen sich oft der Wiederherstellung von demineralisiertem Zahnschmelz und Dentinläsionen [114,143]. Zum antibakteriellen Potential von Hydroxylapatit finden sich in der Literatur wenige Studien. In der Theorie könnten Hydroxylapatitpartikel aufgrund ihrer pH-abhängigen Oberflächenladung die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Bakterien und Zahnhartsubstanz beeinflussen und somit eine Bakterienadhäsion beeinträchtigen [62,79]. Japanische Forschungsgruppen zeigten in verschiedenen In-vitro- Experimenten mit unterschiedlichen Temperaturmodifikationen von Hydroxylapatit, dass dieser eine adsorptive Wirkung auf Streptokokken hat. Sie stellten die Hypothese auf, dass durch den Adsorptionseffekt an Hydroxylapatitpartikeln die Mikroorganismen in ihrer Adhäsion an der Zahnoberfläche gehindert werden und eine Reduktion der kariesinduzierenden Bakterien erleichtert wird [10,11,44]. Kensche et al. (2017) beobachteten in einer In-situ- Studie einen antiadhäsiven Effekt von Hydroxylapatit im Rahmen der initialen Biofilmbildung und sehen Hydroxylapatit- Mundspüllösungen als aussichtsreiche Maßnahme zum Biofilm-Management [79].

d) Chlorhexidin

Chlorhexidin ist ein wichtiges medizinisches, zahnmedizinisches und pharmazeutisches Antiseptikum, Desinfektions- und Konservierungsmittel [117]. 1950 wurde es erstmalig als Antiseptikum vorgestellt. In der Zahnmedizin wird es zur Therapie von Gingivitis, Parodontitis, zur professionellen Prophylaxe, nach intermaxillärer Fixation oder bei oraler Candidiasis eingesetzt [3,147]. Chlorhexidin hat ein breites Wirkspektrum gegen Mikroorganismen, wie grampositive, gramnegative Bakterien und Pilze wie *Candida albicans* [95]. Erhältlich ist es als Hydrochlorid, Acetat und in der Medizin meist als Gluconat [117]. Es handelt sich um ein symmetrisches Molekül, welches vier Chlorphenylringe und zwei biguanide Gruppen besitzt, die über eine

Hexamethylbrücke verbunden sind. Die antibakterielle Wirkung beruht auf Chlorhexidinmolekülen, welche die Zellwandpermeabilität steigern und zu einer Lyse der Bakterienzelle führen [116,124]. In Verbindung mit Agenzien, welche auf anionischen Oberflächen wirken, zeigt es reduzierende antibakterielle Eigenschaften. Je nach Konzentration wirkt Chlorhexidin bakteriostatisch oder bakterizid. Geläufig in der Zahnmedizin sind Produkte mit 0,2 % oder 0,1 % Chlorhexidin-Gehalt [21]. Die Empfindlichkeit von *Streptococcus mutans* gegenüber Chlorhexidin konnte in mehreren In vitro- Studien und In-vivo- Studien beobachtet werden. Jarvinen et al. (1993) zeigte die große Empfindlichkeit bei lokaler Applikation von Chlorhexidin im Vergleich zu geläufigen Antibiotika, wie Cefuroxim, Amoxicillin und Tetrazyklinen [73]. Argawal et al. (2011) zeigte eine signifikante Reduzierung von *Streptococcus mutans* durch Chlorhexidin [5]. Trotz der reduzierenden Effekte können Mutans-Streptokokken durch Chlorhexidin nicht vollständig beseitigt werden [41]. In der S3 Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie vom November 2018 wird Chlorhexidin als unterstützende Maßnahme zu einer Reduktion von Gingivitis empfohlen [17]. Van Strydonck postulierte 2008 Chlorhexidin ergänzend zur mechanischen Zahnreinigung in der chemischen Plaquekontrolle als Goldstandard [146]. Bekannte Nebenwirkung von Chlorhexidin sind bräunliche Verfärbung der Zähne und des Zungenrückens sowie Einschränkungen in der Geschmackswahrnehmung [18,26].

2.2 Ziel der Arbeit / Fragestellung

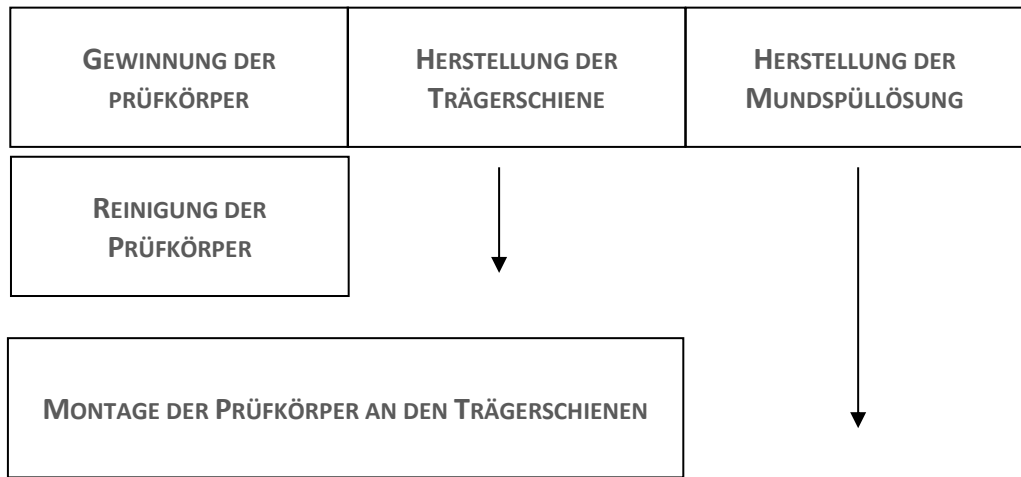
Chlorhexidin gilt in der Zahnmedizin trotz seiner Nebenwirkungen als Goldstandard für ein chemisch kontrolliertes Biofilm-Management [18,75]. Aufgrund von Nebenwirkungen bei Langzeitanwendung von Chlorhexidin sind chemische Alternativen zur Unterstützung im Biofilm-Management gefragt. Bei den biokompatiblen Stoffen Tanninsäure, Hydroxylapatit und Chitosan wurden bereits eine antimikrobielle oder antiadhärente Wirkung im Hinblick auf den oralen Biofilm beobachtet [19,68,79].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss dieser verschiedenen Stoffe in Form von Spüllösungen auf die Biofilmbildung an Dentin zu untersuchen. Hierbei soll die Arbeit Aufschluss über die Frage geben, inwiefern die Agenzien Chitosan, Tanninsäure und Hydroxylapatit sich zu der Negativkontrollgruppe Wasser und zu den bekannten antibakteriellen und antiadhärenten Effekten von Chlorhexidin (Positivkontrolle) unterscheiden. Unter der Verwendung von zwei Spülprotokollen wurde sowohl die Kurz- als auch Langzeitwirkung der Spüllösungen auf den oralen Biofilm untersucht. Zur Beurteilung der Mundspüllösungen auf antiadhäsive und antibakterielle Effekte wurde die Fluoreszenzmikroskopie genutzt. Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie wurde der über 48 Stunden In-situ entstandene Biofilm auf seine Morphologie untersucht.

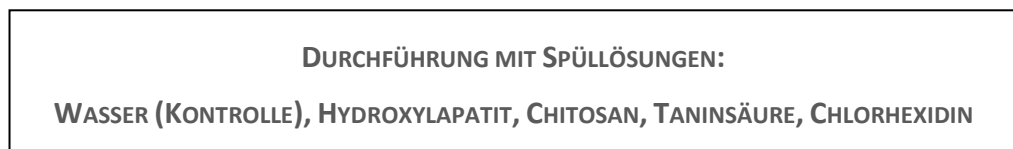
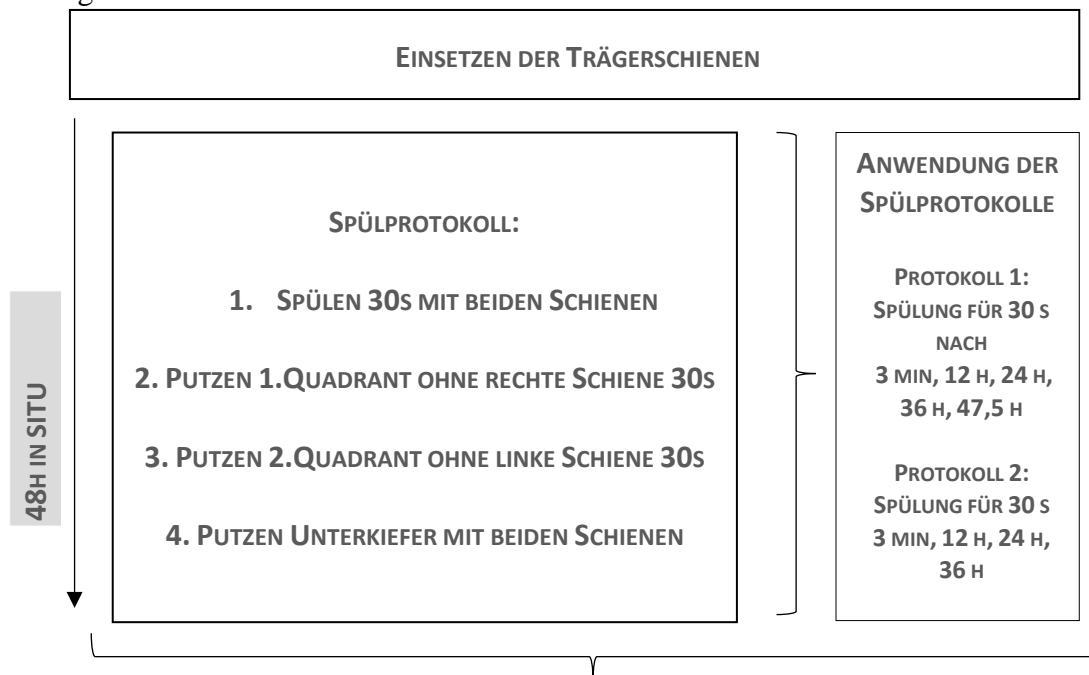
3 Material und Methode

3.1 Schematische Darstellung des Versuchsaufbau

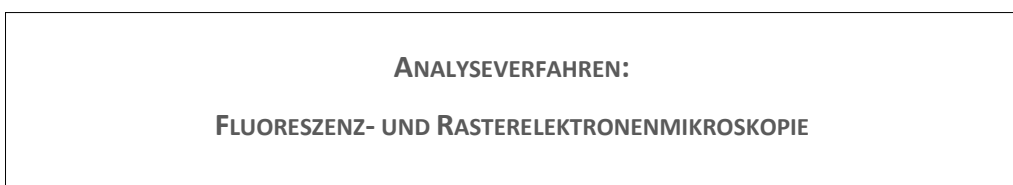
1. Vorbereitung



2. Durchführung:



3. Auswertung:



3.2 Herstellung der Prüfkörper

3.2.1 Gewinnung und Verarbeitung

Die Dentinprüfkörper stammten von bovinen Zähnen, deren Spender negativ auf BSE getestet waren und zur Lebensmittelverarbeitung am Schlachthof Zweibrücken verarbeitet wurden. Nach der Extraktion wurden die Zähne in 0,1 % Thymollösung bei 4 °C gelagert, bevor Schneidekanten, Wurzeln und Approximalflächen mit einer Diamanttrennscheibe (Schleiftrennmaschine WOCO 50p, Conrad GmbH, Clausthal, Deutschland) abgesägt wurden. Aus dem Restdentinkörper konnten 2- 6 Prüfkörper gewonnen werden, deren Oberflächen anschließend mit Silikonkarbonrundpapier (Waterproof Silicon Carbide Paper, Struers GmbH, Willich, Deutschland) geschliffen wurden. Die wassergekühlte Politur hierzu erfolgte bei 300 bis maximal 600 U/min durch verschieden feinkörnige Silikonkarbonoberflächen, deren Korngrößen 240, 600, 800, 1200 und 2500 Grit betragen. Unter einem Auflichtmikroskop (Zoom-Stereomikroskope SMZ 168 Series, Motic GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurde die Unversehrtheit und Politur der Prüfkörper überprüft. Bei Maßen von 3x3 mm² und einer minimalen Dicke von 1 mm wurden die Prüfkörper bei 4 °C in 0,1 % Thymollösung aufbewahrt.

3.2.2 Reinigung und Aufbewahrung

Vor der Aufarbeitung durch das Reinigungsprotokoll wurden sie erneut auf 2500 Grit poliert und anschließend gereinigt. Hierfür wurden Wellplatten (Well Cell-Culture Plate, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) genutzt und die Prüfkörper in jeweils 3 %ige NaOCl-Lösung (Natriumhypochlorit- Lösung 3 % DAC 500ml, Hedinger, Stuttgart, Deutschland) für 30 s gegeben und anschließend mit demineralisiertem Wasser gespült, bis kein Chlorgeruch mehr feststellbar war. Anschließend wurden die Prüfkörper für 2 min in demineralisiertem Wasser im Ultraschallbad (Sonorex, Typ RK31, SN 329.00104706.019, Bandelin, Berlin, Deutschland) gereinigt. In 70 %iger Isopropylalkohollösungen (Hedinger, Stuttgart, Deutschland) wurden die Prüfkörper für 15 min eingelegt und anschließend mit sterilem Wasser zweimalig abgespült. Zur Aufbewahrung wurden die Prüfkörper mindestens 6 h und maximal 3 d bei 4 °C in sterilem Wasser bis zur Anwendung gelagert.

3.2.3 Herstellung der Schienen und Montage der Prüfkörper

a) Herstellung der Schienen

Für jeden Probanden wurden zwei individuelle Trageschienen aus Kunststoff (Duran®-Folien, 1,0 x 125 mm (Scheu-Dental, Iserlohn, Deutschland) zur Befestigung der Prüfkörper im Oberkiefer hergestellt. Zuerst wurde dafür eine Abformung der Oberkieferzahnreihen aus irreversiblen elastischem Material (Alginate Blueprint, Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Deutschland) vorgenommen. Die dazugehörigen Modelle wurden aus Superhartgips IV (Die-Stone, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) hergestellt. Mit dem Erkopress ES 2004 Verfahren (Erkodent GmbH, Pfalzgrafenweiler, Deutschland) wurden Tiefziehschienen hergestellt, welche im Bereich für den Prämolaren und Molaren beschnitten wurden, um Einschränkungen in Ästhetik und Phonetik der Probanden zu verringern.

b) Fixierung der Prüfkörper an den Trageschienen

Die Fixierung der Prüfkörper an der Trägerschiene erfolgte mit einem A-Silikon (President light body, Coltène/Whaledent GmbH und Co.KG, Langenau, Deutschland). Jeweils zwei Prüfkörper wurden pro Seite in Reihe montiert. Zwischen den Prüfkörpern wurde der Abstand so gewählt, dass sich keine Nischen bildeten und ausreichend Silikon dazwischen lag (Abb. 2). Jeweils abwechselnd wurden die Prüfkörper anschließend zur unterschiedlichen Auswertungsmethode (Rasterelektronenmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie) genutzt (Abb. 1).



Abbildung 1: Muster zur Positionierung der Prüfkörper an der Oberkieferzahnreihe; (REM $\hat{=}$ Rasterelektronenmikroskopie, FM $\hat{=}$ Fluoreszenzmikroskopie)

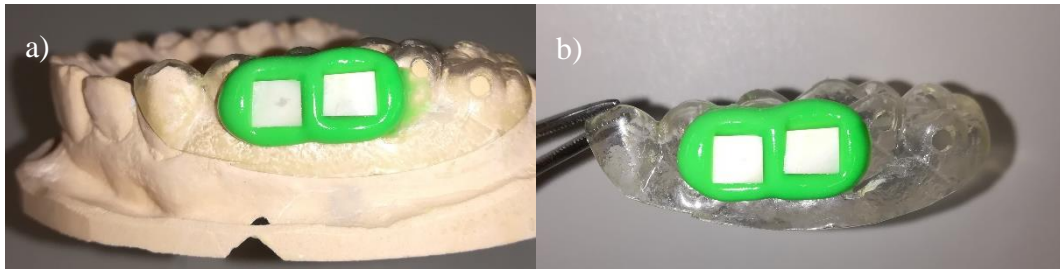


Abbildung 2: Fotografien einer Schiene mit Prüfkörpern und Silikonfixierung (grün) a) am Modell b) ohne Modell

3.2.4 Herstellung der Spüllösungen

a) Kalident-Lösung

Zur Herstellung der in den Versuchen genutzten 5% Kalidentlösung wurde 2,5 g Kalident-Hydroxylapatit- Pulver (Kalident Kalichem s.r.l., Sede legale, Via San Bartolomeo 9- 25128 BRESCIA, Italia) abgewogen und mit 47,5 ml Wasser (Aqua B.Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) mit einer sterilen Pipette aufgefüllt und mit dem Vortex-Rüttler (Model G-560E, Serial #269686, Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y.,USA) zu einer Lösung gebracht.

b) Chitosan-Lösung

Die Herstellung von 50 ml Chitosan-Lösung erfolgte mit 5 g Chitosan-Pulver (Chitosan 95/3000, Heppe Medical Chitosan GmbH, Halle, Deutschland). Um die Lösung anzusetzen, wurde 5 g Chitosan abgewogen und in einen 500 ml Standzylinder überführt, dann wurde dazu 50 ml steriles Wasser gegeben und 1 h auf dem Magnetrührer (MR 3002, Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, 91126 Schwabach) vermischt, bis eine vollständige Benetzung des Pulvers erfolgte. Anschließend wurden 400 ml steriles Wasser und 100 % Essigsäure (EMPROVE®, Merck KgaA, 64271 Darmstadt, Deutschland) dazugegeben und bis zur vollständigen Lösung weitere 3,5 gerührt. In einer Schott-Flasche wurde die Lösung bei einem pH-Wert von 4,5 bei 4°C gelagert. Zur Anwendung als Spüllösung wurden 50 mg der angesetzten Chitosan-Lösung mit 50 ml sterilem Wasser verdünnt.

c) Tanninsäure-Lösung

Es wurde 50 ml einer 5 %igen Tanninsäurelösung hergestellt. Hierzu wurde 2,5 g Tanninpulver (Tannic Acid, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) abgewogen und anschließend 47,5 ml steriles Wasser dazu pipettiert. Durch die Bearbeitung mit dem Vortex-Rüttler (Model G-560E, Serial #269686, Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y.,USA) wurde das Tanninpulver mit dem sterilen Wasser (Aqua B.Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gelöst.

d) Chlorhexidin-Lösung

Die Untersuchung zu Chlorhexidin wurde mit einer 0,2 %igen Chlorhexidin- Lösung (Apotheke des Universitätsklinikum des Saarlandes, 66424 Homburg, Deutschland) durchgeführt.

e) Wasser

Zur Kontrolle der Bedeckung und der Vitalität des Biofilms auf den Prüfkörpern wurde steriles Wasser (Aqua B.Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) genutzt.

3.3 Gewinnung der in-situ- Prüfkörper

3.3.1 Probanden

Die Studie wurde mit sechs Probanden im Alter von 22- 28 Jahren durchgeführt. Die Voraussetzung zur Studienteilnahme war ein vollbezahntes, kariesfreies Gebiss mit gesundem Parodont und physiologischem Speichelfluss. Die Probanden wiesen eine ausgewogene Ernährung mit normalem polyphenolhaltigen Getränke- und Lebensmittelkonsum vor. Von der Studie ausgeschlossen waren Probanden mit Allgemeinerkrankungen und regelmäßiger Medikamenteneinnahme, sowie der Benutzung von anderweitigen Mundspüllösungen. Die Probanden wurden unterrichtet, nicht zu rauchen und keinen Alkohol zu trinken. Jeder Proband wurde vor Studienbeginn ausführlich über den Versuchsablauf aufgeklärt und hat die Teilnahme schriftlich bestätigt.

Es handelt sich bei der vorliegenden Untersuchung um eine klinisch-experimentelle Studie, welche von der Ethikkommission der saarländischen Ärztekammer mit der Nummer 238/03, 2016 genehmigt wurde.

3.3.2 Versuchsbedingungen und Durchführung

Die Probanden wurden für die Versuchsdurchgänge mit den verschiedenen Spüllösungen und jeweils einer neuen Zahnbürste (Einmal-Zahnbürste, Referenznummer 605 403, Hager Werken, 47269 Duisburg, Deutschland) ausgestattet. Vier Spüllösungen wurden getestet und Wasser als Kontrolllösung herbeigezogen. Jede Spüllösung wurde in-situ über 48 h getestet. Das gesamte Studienmodell wurde gemäß zweier Studienprotokolle durchlaufen. Nach Einsetzen der Schienen wurde im ersten Studienprotokoll fünfmalig, jeweils nach 3 min, 12 h, 24 h, 36 h und 47,5 h, mit den Mundspüllösungen gespült. Im zweiten Protokoll wurde viermalig, 3 min, 12 h, 24 h und 36 h gespült. Dazu wurden 10 ml der jeweiligen Lösung in die Mundhöhle aufgenommen und durch Bewegung und Kontraktion der Backenmuskulatur für 30 s gespült. Danach wurde die rechte Schiene herausgenommen und der 1. Quadrant mit der Zahnbürste für 30 s und dem entstandenen Spüllösung- Speichel- Gemisch geputzt. Nach Wiedereinsetzen der rechten Schiene wurde die linke Schiene herausgenommen und der 2. Quadrant geputzt. Die unteren 3. und 4. Quadranten wurden anschließend insgesamt für 1 min geputzt. Während des Essens und Trinkens wurden die Schienen herausgenommen und in einer Feuchtkammer gelagert. Die Probanden wurden angewiesen, wenige Zwischenmahlzeiten zu konsumieren und als Flüssigkeit stilles Wasser zu sich zu nehmen. Nach 48 wurden die Schienen entnommen und die Prüfkörper vorsichtig abgelöst. Danach wurden sie mit sterilem Wasser abgespült. Anschließend wurden sie von nicht adhärenen Bakterien und Speichel durch Einbringen für 5 s in 0,9 %

Natrium-Chlorid-Lösung (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) befreit und zur Analyse für die Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie vorbereitet (siehe unten).

3.4 Fluoreszenzmikroskopie

3.4.1 Grundlagen der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von Biofilmen

Hinsichtlich seiner Bedeckung und Vitalität wurde der Biofilm über die Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Hierzu wurde das Mikroskop Axio-Imager-M2 (Carl Zeiss AG, Oberhausen, Deutschland) verwendet. Die Färbelösung wurde mit Hilfe des LIVE/DEAD® Bacterial Viability Kit (BacLight™, Artikelnummer L7012, Molecular Probes, Eugene, USA) hergestellt. Es handelt sich hierbei um eine Lösung, die zwei verschiedene Nukleinsäuren enthält. Der Unterschied der Nukleinsäuren liegt in deren Lichtspektrum und Membrangängigkeit. Die Säure SYTO 9 durchdringt die physiologischen Membranen intakter Zellen und fluoresziert grün. SYTO 9 ist ein grün fluoreszierendes Nukleinsäure-Färbemittel und färbt nachweislich lebende und tote grampositive und gramnegative Bakterien [22].

Die Farbstofflösung Propidium-Iodid bindet sich an die DNA durch Interkalation zwischen den Basen mit wenig oder keiner Sequenzpräferenz. Da es nicht durch die intakte Zellmembran dringt, bindet es an zerstörte, nicht-lebendige Zellen und fluoresziert rot. Nach Herstellerangaben weist die Propidium-Iodid Färbung eine höhere Affinität zur Nukleinsäure auf als der SYTO 9-Farbstoff, wodurch bei einem gewissen Verhältnis der Färbestoffe lebende Zellen unter dem Mikroskop grün und tote Zellen rot fluoreszieren [22].

3.4.2 Herstellung des Farbstoffs

Zur Herstellung der Färbelösung wurden das LIVE/DEAD® Bacterial Viability Kit (BacLight™) und Natrium-Chlorid- Lösung (0,9% B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) benutzt. Nach Lagerung der Farbstoffe bei -20°C in lichtundurchlässigen Aliquots wurden insgesamt 1 µl SYTO9 und 1 µl mit 1000 µl NaCl- Lösung in einem neuen lichtundurchlässigen Aliquot verdünnt.

3.4.3 Färbung und Fixierung der Prüfkörper

Nach oben beschriebenem Auswaschen der Prüfkörper mit NaCl- Lösung (0,9%, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurden die Prüfkörper jeweils mit 7-15 µl des Farbstoffs bedeckt und lichtverschlossen für 15 min inkubiert. Die überschüssige Farbstofflösung wurde nach der Inkubationszeit vom Prüfkörper in mit 0,9 % NaCl-Lösung (0,9 % B.Braun

Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gefüllten Wellplatten abgespült. Zur verbesserten Kontrolle der Prüfkörper unter dem Mikroskop wurden die Prüfkörper mit Silikonmasse (Optosil®, Comfort Putty®, Heraeus Kulzer GmbH, 63450 Hanau) fixiert. Anschließend wurden 3 µl Mounting-Öl aus dem LIVE/DEAD® Bacterial Viability Kit (BacLight™) auf das Objekt pipettiert. Auf den fixierten Prüfkörper wurde daraufhin ein Deckgläschen (Coverglasses, No. 6310149, VWR International bvba, B-3001 Leuven) aufgebracht.

3.4.4 Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie

Um die zwei verschiedenen Stadien der Bakterien unterscheiden zu können, wurden zwei Lichtfilter des Mikroskop Axio-Imager-M2 (Carl Zeiss AG, Oberhausen, Deutschland) genutzt und bei 1000-facher Vergrößerung pro Prüfkörper 6 repräsentative Bilder der Dentinoberfläche erstellt. Zur Bildaufnahme wurde die Software Axiovision 4.8 (AxioCam, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) genutzt.

3.4.5 Semiquantitative Auswertung

Bei der Auswertung der Prüfkörper wurden sechs repräsentative Bilder der Prüfkörper ausgewählt und jeweils mit einem Scoring-Schema bewertet. Zwei Personen bewerteten die Bilder unabhängig voneinander. Für Bedeckung (Tabelle A) und Vitalität (Tabelle B) des Biofilms wurde die jeweiligen im Folgenden gezeigten Schemata genutzt.

Tabelle A : Scoring- Bewertungssystem zur Biofilm-Bedeckung der Proben

Score	Definition
1	Pellikelschicht, keine oder verstreute Mikroorganismen
2	Wenige kleine mikrobielle Aggregationen, Dutzende Mikroorganismen
3	Mehrere mikrobielle Aggregationen, Hunderte von Mikroorganismen
4	Monoschicht-Biofilm oder Biofilm, der <50% der Oberfläche bedeckt
5	Mehrschichtiger Biofilm, der >50% abdeckt

Tabelle B: Scoring- Bewertungssystem für die Biofilm- Vitalität

Score	Definition
1	Hauptsächlich rote Fluoreszenz, Verhältnis rote zu grüne Fluoreszenz: 90:10 und mehr
2	Überwiegend rote Fluoreszenz, Verhältnis roter zu grüner Fluoreszenz: 75:25
3	Verhältnis zwischen roter und grüner Fluoreszenz: 50:50
4	Überwiegend grüne Fluoreszenz; Verhältnis zwischen roter und grüner Fluoreszenz: 25:75 und niedriger
5	Hauptsächlich grüne Fluoreszenz; Verhältnis zwischen roter und grüner Fluoreszenz: 10:90 und niedriger

3.5 Rasterelektronenmikroskopie

3.5.1 Fixierung der Prüfkörper

Um die Prüfkörper elektronenmikroskopisch zu untersuchen, mussten diese im Vorfeld für die Elektronenmikroskopie fixiert werden. Hierzu wurden sie in 2 % Glutaraldehyd-Lösung (Glutaraldehyd Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) für 1 h bei 4 °C eingelegt. Anschließend wurden sie jeweils in einer 0,01 M- Cacodylatpufferlösung bei Raumtemperatur fünfmal hintereinander für je 10 min gewaschen. Nach diesem Schritt war es möglich, die Prüfkörper in 4 °C kalten Bedingungen bis zur anschließenden Trocknung zu lagern. Die Entwässerung und Trocknung der Prüfkörper erfolgte mithilfe unterschiedlicher Ethanolösungen: 50 % für 2 x 10 min, 70% für 1 x 5 min, 80% für 1 x 5 min, 90 % für 1 x 5 min, 100 % für 2 x 10 min (Ethanol, Carl Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe). Unter dem Abzug wurden die Prüfkörper anschließend in Hexamethyldisilazanlösung (Hexamethyldisilazane; 98,5 %, abcr GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) für 30 min getrocknet.

3.5.2 Sputtern der Prüfkörper

Zur Analyse mit dem Rasterelektronenmikroskop wurden die Prüfkörper mit Hilfe eines Klebestreifens (Leit-Tabs, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) auf Probeteller (0,5'' Aluminium Specimen Stubs, Agar Scientific Ltd, Essex, England) geklebt. Anschließend wurden die Prüfkörper mit dem Sputtercoater (Model SCD 030, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland ehem. Bal-Tec) bearbeitet. Hierbei wurde die Prüfkörperoberfläche mit einer Kohleschicht (Kohlegarn, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) durch Kathodenzerstäubung elektrisch leitfähig gemacht.

3.5.3 Durchführung der Rasterelektronenmikroskopie

Zur Analyse der Oberfläche und Morphologie der Prüfkörper wurde die Rasterelektronenmikroskopie herangezogen. Alle Aufnahmen wurden bei einer Spannung von 5 kV, standardisierten Scan-, Spoteinstellungen und gleichem Neigungswinkel mit dem Rasterelektronenmikroskop (FEI/Philips XL30 FEG ESEM with Electron Backscatter Diffraction analysis and Energy-Dispersive X-ray capability, FEI Europe B.V., Eindhoven, Niederlande) durchgeführt. In 25- facher Vergrößerung wurde eine Übersichtsaufnahme der Prüfkörper erstellt und anschließend der adhärenente Biofilm an repräsentativen Stellen in folgenden Vergrößerungen fotografiert: 500-, 1000-, 5000-, 10000- und 20000 -fach.

3.6 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit der GraphPad Prism 8-Software (GraphPad Software, 2365 Northside Dr. Suite 560, San Diego, CA 92108) durchgeführt. Die Analyse wurde mit dem nicht-parametrischen Friedman-Test durchgeführt. Für mehrfache Vergleiche zwischen den einzelnen Gruppen wurde der Dunn-Test genutzt. Die Normalverteilung wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft. Die statistische Signifikanz wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Der Vergleich der Mundspülbedingungen zwischen dem ersten und zweiten Spülprotokoll wurde mit dem nicht-parametrischen Wilcoxon-Test durchgeführt.

4 Ergebnisse

Zur Bestimmung der Vitalität des Biofilms und dessen Bedeckung auf den Prüfkörpern wurde die Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Zur ultrastrukturellen morphologischen Untersuchung des Biofilms unter dem Einfluss der verschiedenen Mundspüllösungen wurde die Rasterelektronenmikroskopie genutzt.

4.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie erlaubt nicht nur eine Darstellung der Biofilme, sondern bietet auch die Möglichkeit zur Analyse von deren Vitalität. Vitale Bakterien erscheinen grün und avitale fluoreszieren rot (Abb. 3 a, b). Auf den Prüfkörpern waren vor allem kokkenförmige Bakterien und vereinzelt stäbchenförmige Bakterien zu erkennen (Abb. 3 e, f). Zusätzlich wurden einzelne Epithelzellen der oralen Schleimhaut beobachtet, welche sich durch einen roten Kern hervorheben (Abb. 3 g, h). Durch Abrieb der Wangenschleimhaut können sich diese auf den Prüfkörpern ablagern. Die Dentintubuliwände fluoreszieren grün (Abb. 3 c und d). Die Eigenfluoreszenz der Prüfkörper sowie der Epithelzelle wurden in der Auswertung nicht beachtet (Abb. 3 c und h). Durch die Fluoreszenzmikroskopie lässt sich außerdem das Muster der bakteriellen Besiedlung darstellen. Es zeigten sich Ansammlungen von Bakterien in Kolonien, in Ketten und vereinzelt (Abb. 3 e und f, d).

Nach der Färbung mit dem LIVE/DEAD® Bacterial Viability Kit (BacLight™) wurden die Prüfkörper mithilfe des Scoring-Systems bewertet. Die Daten zeigen sich graphisch zusammengefasst für das Spülprotokoll 1 und für das Spülprotokoll 2 in den Abb. 4 und 6 und im Vergleich in den Graphen der Abb. 5 und 7. In den Abbildungen zeigen sich die Mittelwerte, Maxima und Minima sowie signifikante Unterschiede. Zudem zeigen die Abb. 8, 9, 10, 11 und 12 repräsentative Bilder für die Bedeckung der Prüfkörper und die Vitalität des Biofilms unter dem Einfluss von Spülungen mit Wasser (Abb. 8), Hydroxylapatit (Abb. 10), Chitosan (Abb. 9), Tanninsäure (Abb. 11) und Chlorhexidin (Abb. 12).

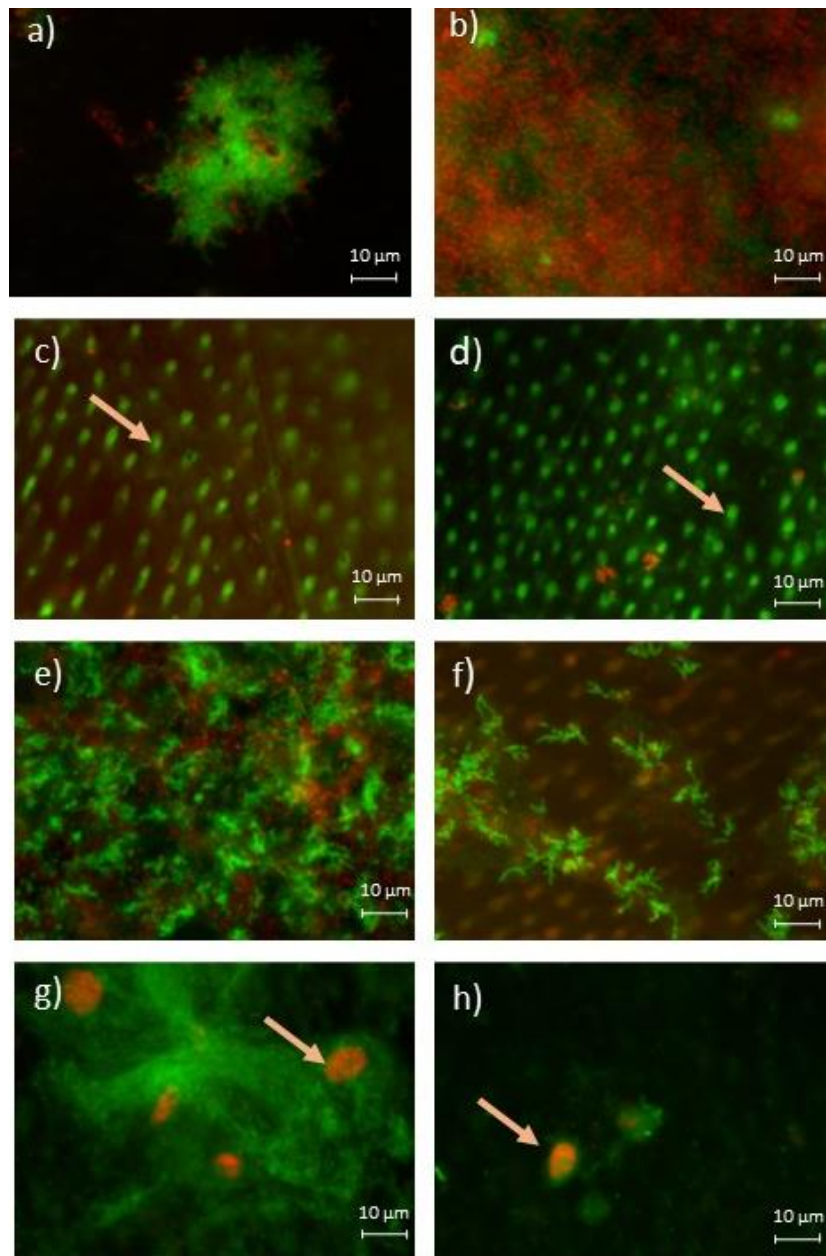


Abbildung 3: Fluoreszenzmikroskopische Beispielaufnahmen eines 48h in-situ-Biofilms zur Erläuterung (LIVE/DEAD® Bacterial Viability Kit (BacLight™)):

- a) + b) deutlich erkennbarer Unterschied zwischen roten und grünen Bakterien;
- a) Bakterien Aggregation von hunderten Mikroorganismen;
- b) nahezu vollständige bakterielle Bedeckung;
- c) + d) erkennbare grüne Fluoreszenz der Dentinkanäle und einzelne rote, avitale Bakterien;
- e) vorwiegend kokkenförmige Bakterien sichtbar;
- f) teilweise Aggregationen von stäbchenförmigen Bakterien sichtbar;
- g) + h) rot fluoreszierende Epithelzellen sichtbar;

4.1.1 Bedeckung der Dentinkörper

Es zeigte sich, dass sich die bakterielle Bedeckungen auf den Prüfkörpern nach 48 Stunden und 5-maligem Spülen unter dem Einfluss der verschiedenen Spüllösungen unterscheiden. Die bakterielle Bedeckung der Prüfkörper nach der Spülung mit Wasser (Score-Mittelwert $4,77 \pm 0,28$; 1.Spülprotokoll; Abb. 8) unterschied sich geringfügig zur bakteriellen Bedeckung nach der Spülung mit Chitosan (Score-Mittelwert $4,31 \pm 0,36$; 1.Spülprotokoll; Abb. 9). Die Prüfkörper nach der Spülung mit Chitosan waren vorwiegend durch zahlreiche, dicht gelagerte große Bakterienaggregationen und etablierte mehrschichtige, mikrobielle Biofilme gekennzeichnet (Abb. 9). Die Prüfkörper nach der Spülung mit Hydroxylapatit (Score-Mittelwert $3,75 \pm 0,95$; 1.Spülprotokoll) zeigten vorwiegend große Bakterienaggregationen mit mehr als 50 % bakterieller Bedeckung (Abb. 10). Außerdem zeigten sich bei diesen Prüfkörpern Unterschiede in der bakteriellen Bedeckung sowohl inter- als auch intraindividuell (Abb. 10).

Die bakterielle Bedeckung nach der Spülung mit Tanninsäure zeigte mit ähnlicher Streuung der Score-Mittelwerte einen niedrigeren Score-Mittelwert ($2,79 \pm 1,09$; 1.Spülprotokoll). Die Biofilmbedeckung der Prüfkörper war teilweise geprägt von vereinzelt Bakterienkolonien und auch vereinzelt Bakterien (Abb. 11). Im Unterschied zur bakteriellen Bedeckung nach der Spülung mit Wasser (Abb. 8) war die Bakterienbesiedlung der Prüfkörper nach der Spülung mit Tanninsäure vermindert (Abb. 11). Auch hier kam es zu intra- und interindividuellen Unterschieden in der bakteriellen Bedeckung.

Die Prüfkörper nach der Spülung mit Chlorhexidin (Scorewert $1,88 \pm 0,99$; 1.Spülprotokoll; Abb. 12) zeigten in ihrer bakteriellen Bedeckung die größte Abweichung zu den Prüfkörpern nach der Spülung mit Wasser (Abb. 8). Diese Prüfkörper waren durch kleine Kolonien und wenige vereinzelt Bakterien geprägt (Abb. 12). Im Gegensatz zu den Prüfkörpern nach den Spülungen mit Wasser (Abb. 8), Hydroxylapatit (Abb. 10) und Chitosan (Abb. 9) bildete sich auf den Prüfkörpern nach der Spülung mit Chlorhexidin (Abb. 12) kein mehrschichtiger, etablierter Biofilm. Auf den Fotos waren durch die geringe mikrobielle Biofilmbildung Dentintubuli erkennbar (Abb. 12).

Im Spülprotokoll 2 wurden die Prüfkörper bei 48 h Tragedauer viermalig mit den jeweiligen Agenzien gespült. Es zeigt sich eine geringe Abweichung in den Scoremittelwerten der bakteriellen Biofilmbedeckung der Prüfkörper nach der Spülung mit Chitosan (Scorewert $4,41 \pm 0,38$; 2.Spülprotokoll; Abb. 9) und mit Hydroxylapatit (Scorewert $4,32 \pm 0,32$; 2.Spülprotokoll; Abb. 10) zur Bedeckung nach der Spülung mit Wasser (Scorewert $4,49 \pm 1,01$; Abb. 8). Die

Prüfkörper nach diesen Mundspülungen waren geprägt von großer, mehrschichtiger Bakterienkolonisation, mit vorrangiger Kokkenbeteiligung und teilweise auch Stäbchenbeteiligung (Abb. 8, 9, 10). Es zeigten sich inter- und intraindividuelle Unterschiede bei der bakteriellen Biofilmbedeckung der Prüfkörper unter den Probanden.

Nach der Spülung mit Tanninsäure zeigten sich die Prüfkörper mit einem etwas geringeren Score-Mittelwert (Scorewert $3,79 \pm 0,85$; 2.Spülprotokoll; Abb. 11) in der bakteriellen Biofilmbedeckung im Vergleich zur Bedeckung der Prüfkörper nach der Spülung mit Wasser (Abb. 8), Chitosan (Abb. 9) und Hydroxylapatit (Abb. 10). Die Biofilmbedeckung der Prüfkörper nach der Spülung mit Tanninsäure schwankte zwischen einer bakteriellen Besiedlung mit einzelnen Bakterien bis hin zu großen Bakterienaggregationen (Abb. 11).

Einen niedrigeren Score-Mittelwert (Scorewert $1,36 \pm 0,26$; 2.Spülprotokoll) zeigte die bakterielle Biofilmbedeckung der Prüfkörper nach der Spülung mit Chlorhexidin (Abb. 12). Diese Prüfkörper waren vorwiegend von vereinzelt Bakterien und kleinen Kolonien geprägt. Die Prüfkörper zeigten sich nach der Spülung mit Chlorhexidin häufig ohne etablierten Biofilm (Abb. 12).

Eine Tendenz von höheren Score-Mittelwerten zeigte sich beim Spülprotokoll 2 im Vergleich zu Spülprotokoll 1 für die mikrobielle Bedeckung der Prüfkörper nach der Spülung mit Chitosan, Hydroxylapatit und Tanninsäure (Abb. 5). Nach dem Wilcoxon-Test bestand kein signifikanter Unterschied in den Scorewerten der zwei Protokolle zueinander (Abb. 5).

Tanninsäure zeigte im ersten Spülprotokoll eine hemmende Wirkung bei der bakteriellen Biofilmbildung auf den Dentinprüfkörpern. In beiden Spülprotokollen war der Effekt am ausgeprägtesten bei den Prüfkörpern nach der Spülung mit Chlorhexidin, was die Score-Mittelwerte $1,88 \pm 0,99$ (1. Spülprotokoll) und Scoremittelwert $1,36 \pm 0,26$ (2. Spülprotokoll) zeigen (Abb. 11, 12).

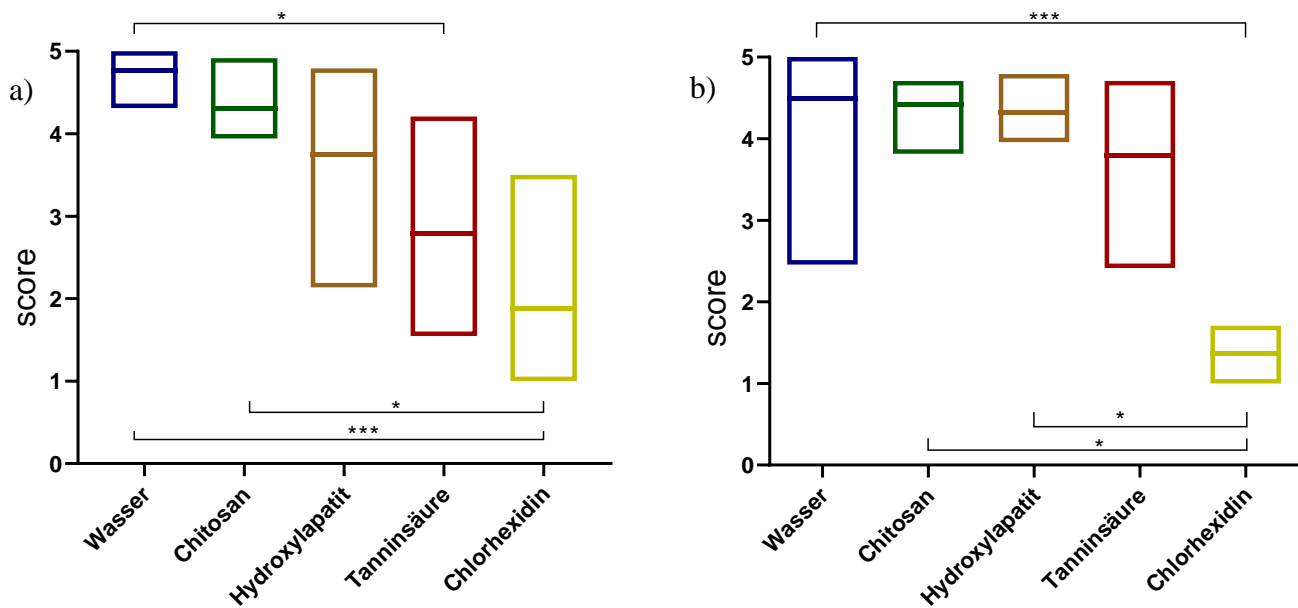


Abbildung 4 Auswertung der Biofilmbedeckung **a)** und **b)** (y- Achse: Score-Werte, x-Achse: Spülbedingungen; **a)** Scoring- Werte für die Biofilmbedeckung 1. Spülprotokoll (Spülen nach 3min, 12h, 24h, 36h, 47,5h) zeigt signifikante Unterschiede in der Bedeckung zwischen Wasser und Tanninsäure, sowie von Chlorhexidin zu Wasser und Chitosan ; **b)** Scoring-Werte für die Biofilmbedeckung 2. Spülprotokoll (Spülen nach 3min, 12h, 24h, 36h) zeigt signifikante Unterschiede in der Bedeckung von Chlorhexidin zu Wasser, Chitosan und Hydroxylapatit ; Signifikanz: $p < 0,05$; * $< 0,05$; ** $< 0,01$, *** $< 0,001$ / (Dunn-multi-comparson-test)

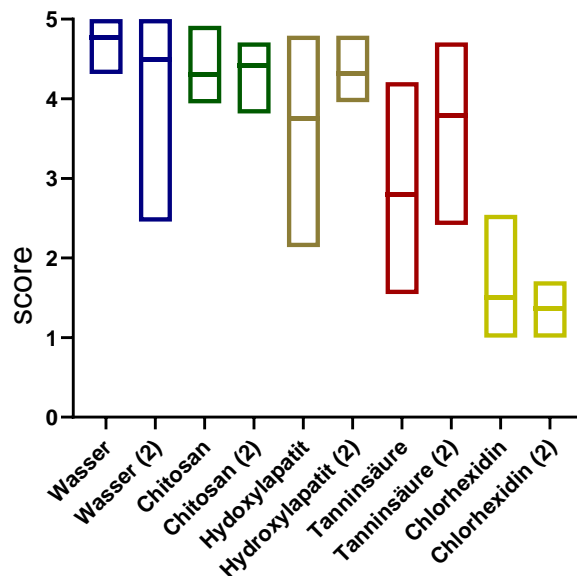


Abbildung 5 Auswertung der Biofilmbedeckung des **1.** und **2.** Spülprotokolls im Vergleich (y- Achse: Score-Werte, x-Achse: Spülbedingungen; ~ **(2)** entspricht 2. Spülprotokoll; Signifikanz: $p < 0,05$; (Wilcoxon-Test)) keine signifikanten Unterschiede in der Biofilmbedeckung der Spülungen im Vergleich der zwei Spülprotokolle

4.1.2 Vitalität

Im ersten Spülprotokoll nach der Spülung mit Wasser (Scoremittelwert $4,21 \pm 0,49$; 1.Spülprotokoll) zeigten sich die Prüfkörper mit einem Biofilm, der vorwiegend durch grüne, vitale Bakterien geprägt war (Abb. 8). Wie im Graphen der Abb. 6 zu erkennen ist, schwankten die Scorewerte der Biofilmvitalität nach der Spülung mit Wasser sowohl für das erste als auch für das zweite Spülprotokoll (Scoremittelwert $4,37 \pm 0,57$; 2.Spülprotokoll; Abb. 6). Nach der Spülung mit Hydroxylapatit (Scoremittelwert $3,97 \pm 0,44$; 1.Spülprotokoll) ließ sich im ersten Spülprotokoll ebenfalls ein vorwiegend aus vitalen Bakterien bestehender Biofilm beobachten (Abb. 10). Ein ähnliches Bild zeigte sich für die Prüfkörper nach der Spülung mit Hydroxylapatit im zweiten Spülprotokoll (Scoremittelwert $4,15 \pm 0,61$; Abb. 10). Im ersten Spülprotokoll zeigten die Prüfkörper nach der Spülung mit Chitosan (Scoremittelwert $3,4 \pm 0,61$) einen geringfügig höheren Anteil an roten, avitalen Bakterien (Abb. 9) verglichen nach den Spülungen mit Wasser (Scoremittelwert $4,21 \pm 0,49$; 1.Spülprotokoll) und Hydroxylapatit (Scoremittelwert $3,97 \pm 0,44$; 1.Spülprotokoll; Abb. 9). Im zweiten Spülprotokoll war dieser Vergleich nach den Spülungen mit Chitosan (Scoremittelwert $4,00 \pm 0,29$), Wasser (Scoremittelwert $4,37 \pm 0,57$; 2.Spülprotokoll) und Hydroxylapatit ($4,15 \pm 0,61$; 2.Spülprotokoll) ähnlich. Die Scorewerte der Biofilmvitalität unterlagen sowohl im ersten als auch im zweiten Spülprotokoll nach den Spülungen mit Chitosan und denen mit Hydroxylapatit und Wasser keinem signifikanten Unterschied (Abb. 7).

Im ersten Spülprotokoll zeigte sich nach der Spülung mit Tanninsäure auf den Prüfkörpern ein ausgeglichenes Verhältnis von roten und grünen Färbungen der Bakterien (Abb. 11). Die Prüfkörper waren teilweise geprägt durch ein gleichmäßiges Verhältnis von roten, avitalen und grünen, vitalen Bakterien und teilweise einem größerer Anteil von grünen, vitalen Bakterien (Abb. 11). Im ersten Spülprotokoll gab es einen deutlichen Unterschied in der bakteriellen Vitalität nach der Spülung mit Tanninsäure (Scoremittelwert $2,92 \pm 0,46$; 1.Spülprotokoll) im Vergleich nach der Spülung mit Wasser (Scoremittelwert $4,21 \pm 0,49$; 1.Spülprotokoll). Im zweiten Spülprotokoll zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Vitalität des biofilmbedeckten Prüfkörper nach der Spülung mit Tanninsäure (Scoremittelwert $3,43 \pm 0,18$; 2.Spülprotokoll) zu Wasser (Scoremittelwert $4,37 \pm 0,57$; 2. Spülprotokoll) und den restlichen Spülungen (Abb. 6). Vorwiegend rote fluoreszierende, tote Bakterien wurden auf den Prüfkörper nach der Spülung mit Chlorhexidin im ersten (Scoremittelwert $1,81 \pm 0,47$) und im zweiten Spülprotokoll (Scoremittelwert $2,2 \pm 0,69$) beobachtet (Abb. 7). Statistisch zeigten sich für beide Spülprotokolle

deutliche Unterschiede in der Biofilmvitalität nach der Spülung mit Wasser und nach der Spülung mit Chlorhexidin 0,2 % (Abb. 6). Untersuchungen zur Vitalität zeigten inter- und intraindividuelle Unterschiede.

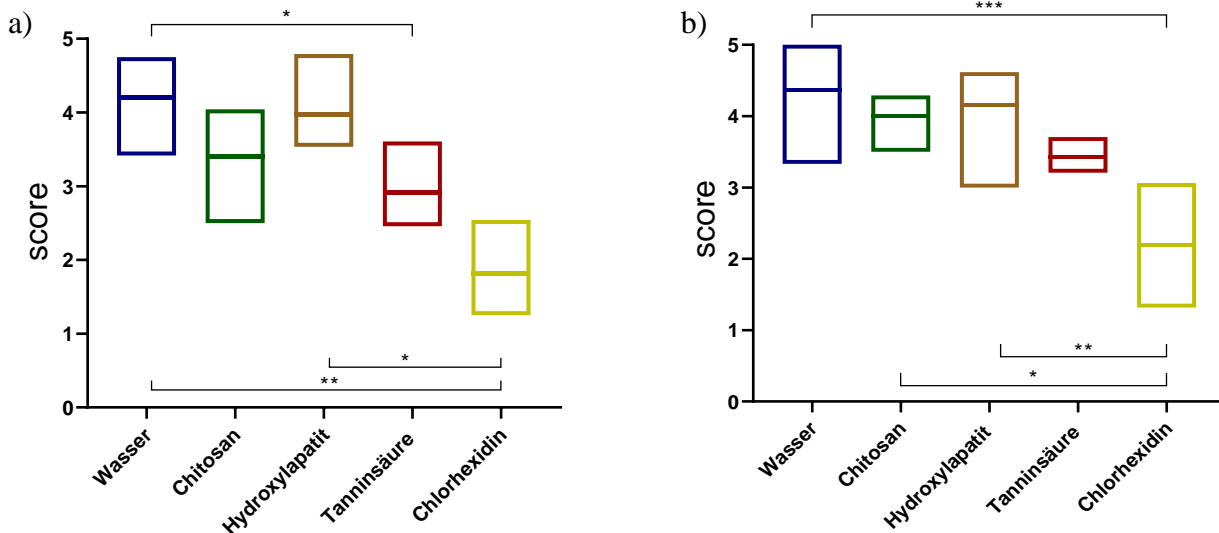


Abbildung 6 Auswertung der Biofilmvitalität **a)** und **b)** (y- Achse: Score-Werte, x-Achse: Spülbedingungen; **a)** Scoring- Werte der Biofilmvitalität 1. Spülprotokoll (Spülen nach 3min, 12h, 24h, 36h, 47,5h) zeigt signifikante Unterschiede in der Vitalität zwischen den Spülungen mit Wasser und Tanninsäure, sowie Spülung mit Chlorhexidin zu Wasser und Hydroxylapatit; **b)** Scoring-Werte für die Biofilmvitalität 2. Spülprotokoll (Spülen nach 3min, 12h, 24h, 36h) zeigt signifikante Unterschiede in der Biofilmvitalität nach der Spülung mit Chlorhexidin zu Wasser, Chitosan und Hydroxylapatit; Signifikanz: $p < 0,05$; * $< 0,05$; ** $< 0,01$, *** $< 0,001$) / (Dunn-multi-comparison-test)

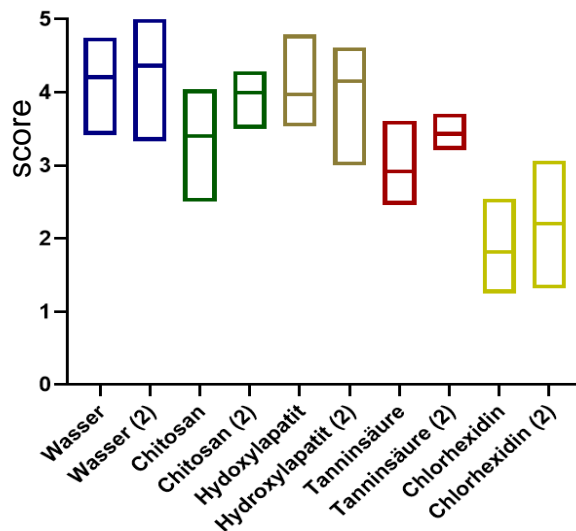


Abbildung 7 Auswertung der Biofilmvitalität **1.** und **2.** Spülprotokolle im Vergleich, keine signifikanten Unterschiede zwischen gleichen Spülungen im Vergleich der zwei Spülprotokolle (y- Achse: Score-Werte, x-Achse: Spülbedingungen; ~ (2) entspricht 2. Spülprotokoll; Signifikanz: $p < 0,05$; (Wilcoxon-Test))

4.1.3 Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen

a) Spülung mit Wasser

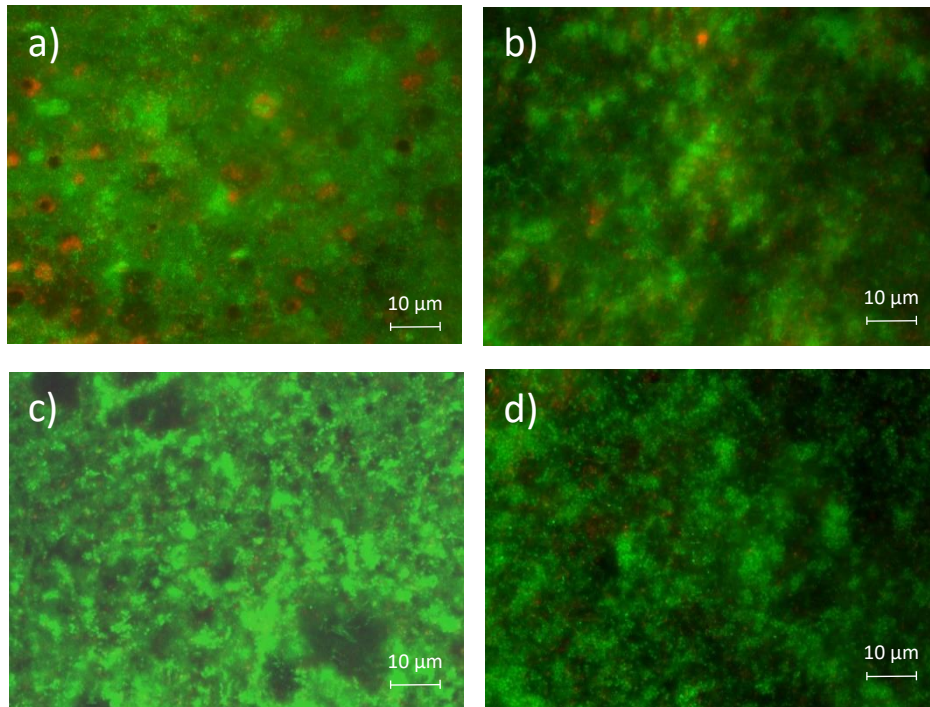


Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopische Beispielaufnahmen eines 48h In-situ-Biofilms unter der Spülung mit Wasser (LIVE/DEAD® Bacterial Viability Kit (BacLight™)):

a) + b): Spülprotokoll 1; c)+d): Spülprotokoll 2;

a) -d) zeigen Bedeckungen von > 50% und einen mehrschichtig etablierten Biofilm mit vorwiegend grünen, vitalen Bakterienkolonien;

a) + d): Erkennbare vereinzelte Bakterienkolonien mit roter Fluoreszenz, avitale Bakterien, je <100;

b) Spülung mit Chitosan

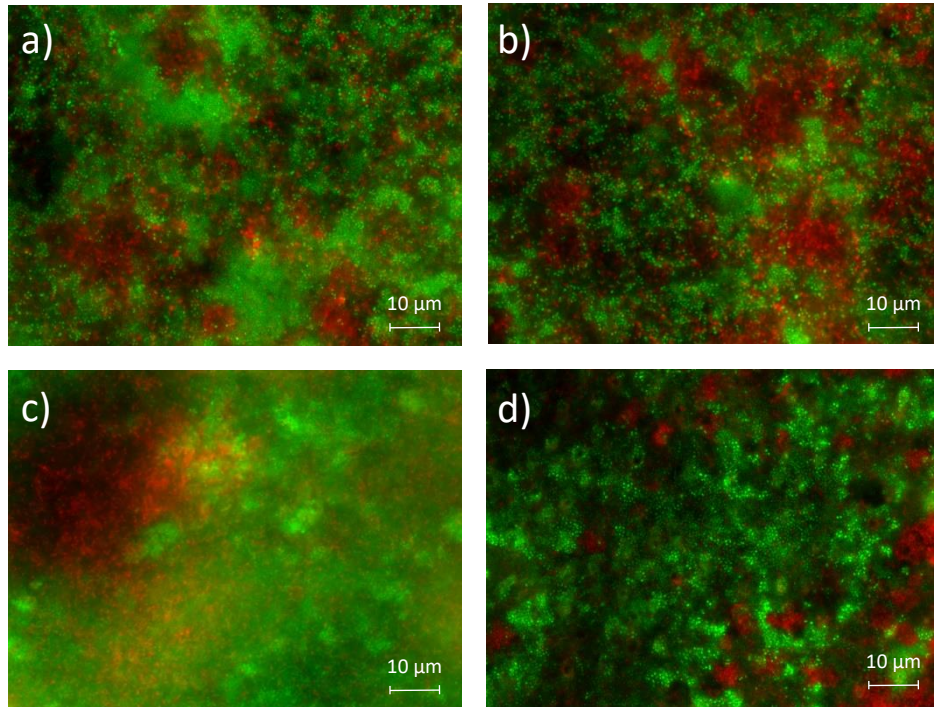


Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopische Beispielaufnahmen eines 48h In-situ-Biofilms unter der Spülung Chitosan (LIVE/DEAD® Bacterial Viability Kit (BacLight™)):

a) + b): Spülprotokoll 1; c) + d): Spülprotokoll 2;

a) - d) Bedeckungen von > 50% und etablierte mehrschichtige Biofilme mit grünen, vitalen und roten, avitalen Bakterienaggregationen;

a) + b): nahezu ausgeglichene Gewichtung von grünen, vitalen, und roten, avitalen Bakterienkolonien

c) + d): etablierter Biofilm mit größerem Anteil an grünen, vitalen Bakterien

c) Spülung mit Hydroxylapatit

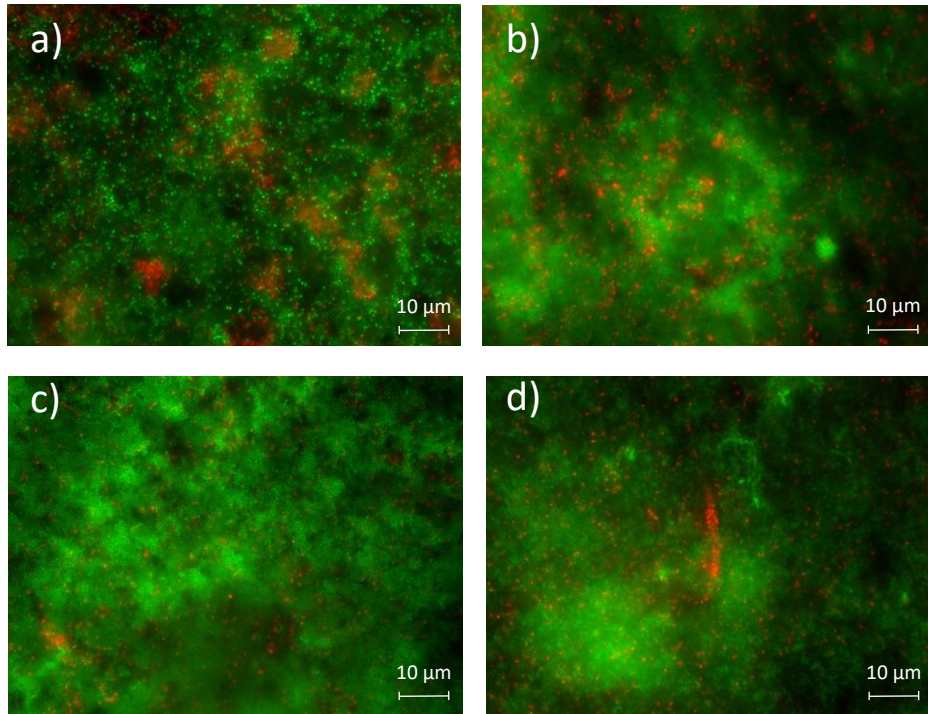


Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskopische Beispielaufnahmen von 48h In-situ-Biofilmen unter der Spülung mit Hydroxylapatit (LIVE/DEAD® Bacterial Viability Kit (BacLight™)):

a) + b): Spülprotokoll 1; c) + d): Spülprotokoll 2

a) - d) zeigen Bedeckungen von > 50% und einen etablierten Biofilm mit vorwiegend grünen, vitalen, und teilweise roten, avitalen Bakterienkolonien;

a) vereinzelte rote, avitale, Bakterienaggregationen, je <100;

b) großer Anteil grüner, vitaler Bakterien, vereinzelte rote, avitale Bakterien;

c) großer Anteil grüner, vitaler Bakterien, vereinzelte rote, avitale Bakterien, je <100;

d) vorwiegend grüne, vitale Bakterien sichtbar; rote Bakterienanhäufung kettenförmig sichtbar;

d) Spülung mit Tanninsäure

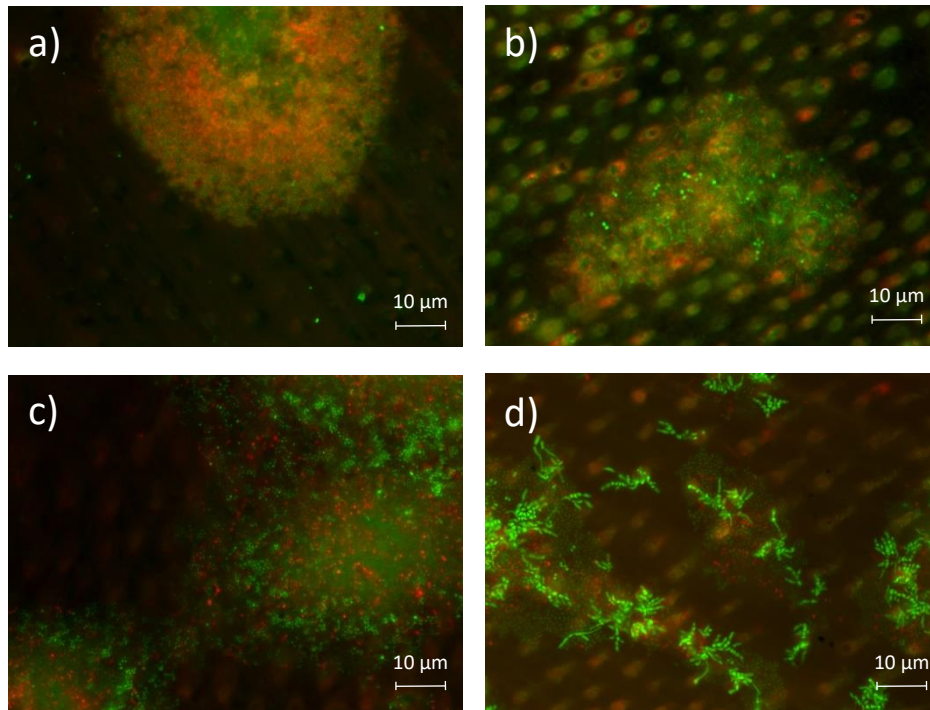


Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Beispielaufnahmen von 48h In-situ-Biofilmen unter der Spülung mit Tanninsäure (LIVE/DEAD® Bacterial Viability Kit (BacLight™)):

a) + b): Spülprotokoll 1; c) + d): Spülprotokoll 2

a) - d) zeigen Bedeckungen < 50% und vorwiegend vereinzelte Bakterienaggregationen mit grünen, vitalen und roten, avitalen Bakterienzellen;

a) einzelne große Bakterienaggregation mit größerem Anteil an roten, avitalen Mikroorganismen, >100;

b) mehrere mikrobielle Aggregationen sichtbar mit grünen, vitalen und roten, avitalen Mikroorganismen, dutzende Dentinkanälchen sichtbar;

c) Bakterien in einfacher Schicht bis 50% Bedeckung, grüne, vitale und rote, avitale Bakterien erkennbar;

d) Bakterienaggregationen von dutzenden Mikroorganismen mit vorwiegend grünen, vitalen Bakterien und vereinzelt rote Bakterien erkennbar; Dentintubuli zudem rot/orange angefärbt; sowohl kokken- als auch stäbchenförmige Bakterien erkennbar;

e) Spülung mit Chlorhexidin

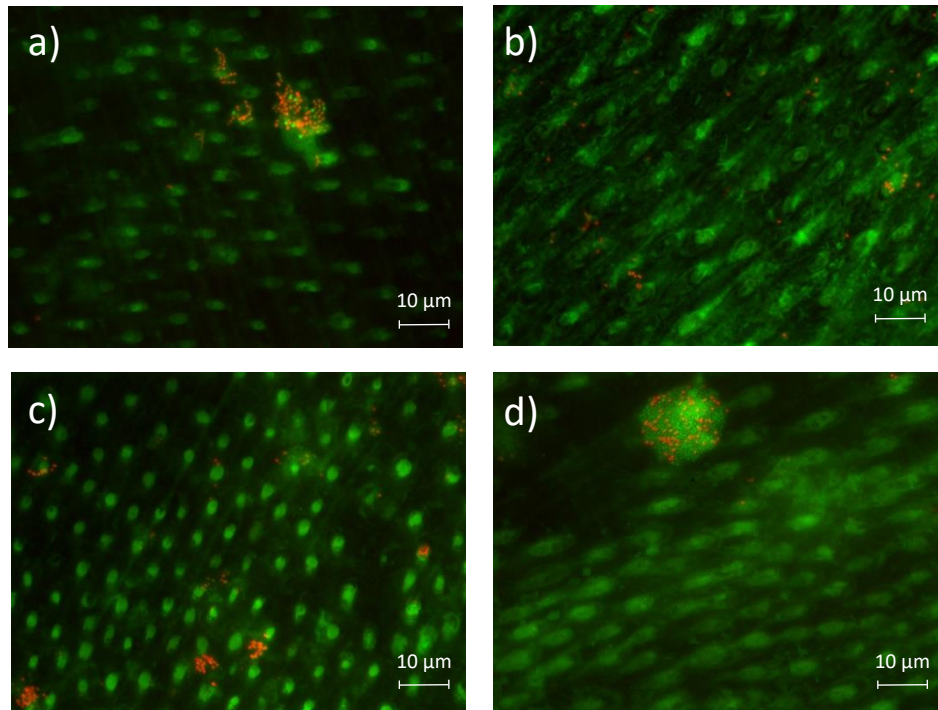


Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Beispielaufnahmen von 48h in-situ-Biofilmen unter der Spülung mit Chlorhexidin 0,2% (LIVE/DEAD® Bacterial Viability Kit (BacLight™)):

a) + b): Spülprotokoll 1; c) + d): Spülprotokoll 2;

a) - d) zeigen vereinzelte Mikroorganismen;

a) Dentintubuli grün angefärbt, vereinzelte grüne, vitale Mikroorganismen, <100; vereinzelte rote, avitale Mikroorganismen <100

b) Dentintubuli grün angefärbt, vereinzelte rote, avitale Mikroorganismen;

c) Dentintubuli grün angefärbt, vereinzelte rote, avitale Mikroorganismen, <100;

d) Dentintubuli grün angefärbt, vereinzelte rote, avitale Mikroorganismen, <100; einzelne Bakterienaggregation mit roten und grünen Mikroorganismen <1000;

4.2 Rasterelektronenmikroskopie

Zur Untersuchung der ultrastrukturellen Morphologie des Biofilms wurde die Rasterelektronenmikroskopie genutzt. Sie bietet die Möglichkeit in hohen Vergrößerungen die Organisation des Biofilms zu beobachten und bestätigte das Bild des 48 h- Biofilms der Fluoreszenzmikroskopie. Folgende Beobachtungen wurden getätigt und sind durch anschließende repräsentative Aufnahmen veranschaulicht (Abb. 13- 17).

Die Prüfkörper nach der Spülung mit Wasser zeigten vorwiegend einen mehrschichtigen Biofilm mit verschiedenen Bakterienspezies, die teilweise den kompletten Prüfkörper bedeckten (Abb. 13). Auf diesen Prüfkörpern war zudem eine strukturierte Matrix erkennbar (Abb. 13). Auf dem mikrobiellen Biofilm konnte sich zudem Pellikel erkennen lassen (Abb. 13).

Auf allen Prüfkörpern waren weitestgehend kokkenförmige Bakterien zu erkennen (Abb. 13- 17). Auch stäbchenförmige Bakterien wurden intra- und interindividuell unterschiedlich beobachtet.

Die Prüfkörper nach der Spülung mit den Agenzien Hydroxylapatit und Chitosan präsentierten sich mit einem vorwiegend mehrschichtigen, durchgängigen Biofilm (Abb. 14 u. 15). Ebenfalls konnte sich teilweise eine strukturierte Matrix erkennen lassen und es zeigten sich vorwiegend kokkenförmige und stäbchenförmige Bakterien (Abb. 14 u. 15).

Die Prüfkörper nach der Spülung mit Tanninsäure zeigten sich partiell bedeckt von Mikroorganismen (Abb. 16). Diese stellten sich entweder in dicht gepackten großen Kolonien dar oder waren vereinzelt und in kleinen Kolonien über den Prüfkörper zu erkennen (Abb. 16). Sowohl Flächen auf den Prüfkörpern mit als auch ohne Bakterienaggregation waren von Pellikel bedeckt (Abb. 16).

Die Prüfkörper nach der Spülung mit Chlorhexidin wiesen eine deutlich erkennbare verminderte Biofilmschichtdicke auf (Abb. 17). Die Prüfkörper zeigten vorwiegend von Bakterien freie Abschnitte, die von Pellikel überzogen waren (Abb. 17).

Nach der Spülung mit Chlorhexidin zeigten die Prüfkörper teilweise degenerierte Mikroorganismen mit zerstörten Zellwänden. Außerdem waren diese Prüfkörper vereinzelt mit wenigen Bakterien besiedelt (Abb. 17). In den Dentintubuli der Prüfkörper zeigten sich teilweise adhärenre Bakterien (Abb. 17).

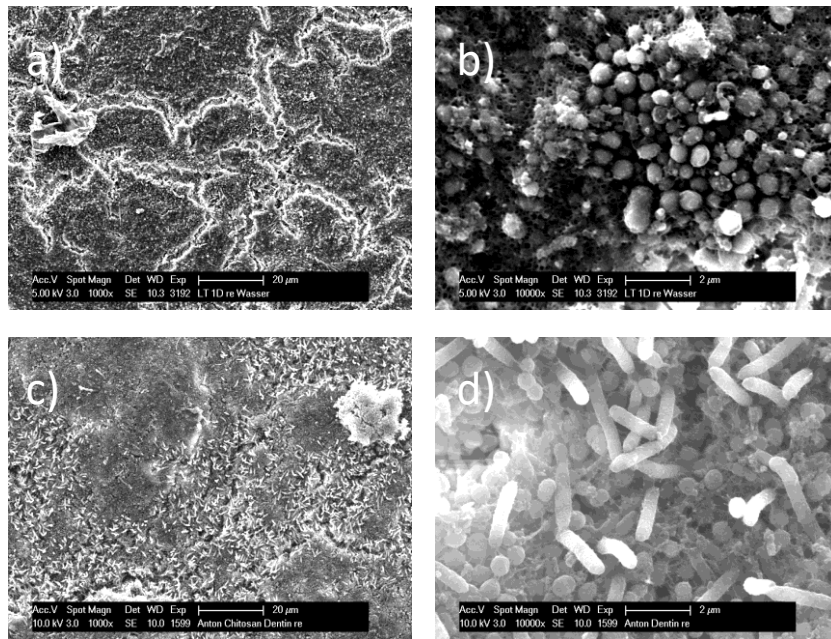


Abbildung 13: repräsentative REM- Aufnahmen eines 48h- Biofilm der Kontrollgruppe, Spülung mit **Wasser**. **a) + b):** 1. Spülprotokoll; **c) + d):** 2. Spülprotokoll; Die Prüfkörper waren vorwiegend gekennzeichnet durch einen mehrschichtigen Biofilm. Zwischen den Bakterien lässt sich die Biofilm-Matrix erkennen. Die Bakterien waren meist kokkenförmig und teilweise stäbchenförmig. Aufnahmen a) + c) in 1000-fache und b) + d) in 10000-fache Vergrößerung

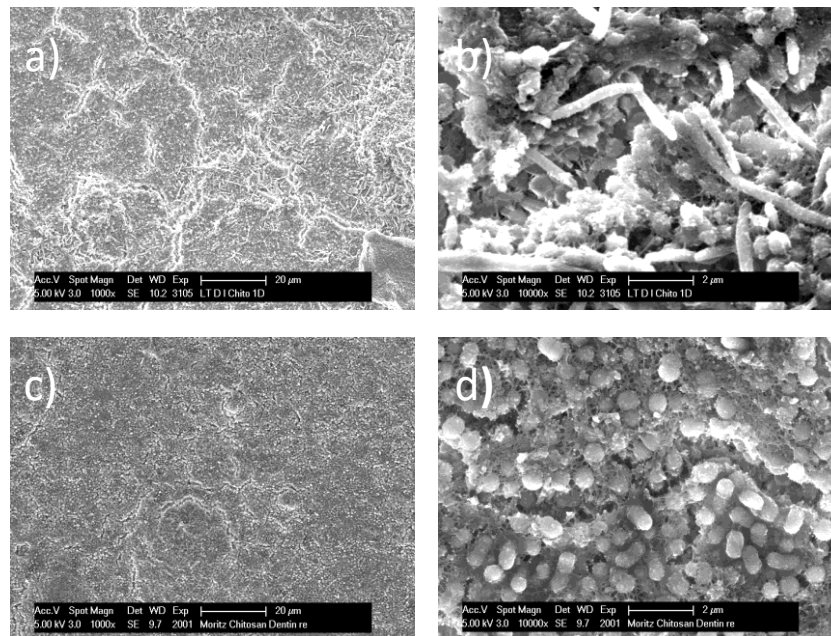


Abbildung 14: repräsentative REM- Aufnahmen eines 48h- Biofilm nach Spülung mit **Chitosan**. **a) + b):** 1. Spülprotokoll; **c) + d):** 2. Spülprotokoll; Die Prüfkörper waren vorwiegend gekennzeichnet durch einen mehrschichtigen Biofilm. Zwischen den Bakterien lässt sich die Biofilm-Matrix erkennen. Die Bakterien waren meist kokkenförmig und teilweise stäbchenförmig. Aufnahmen a) + c) in 1000-fache und b) + d) in 10000-fache Vergrößerung

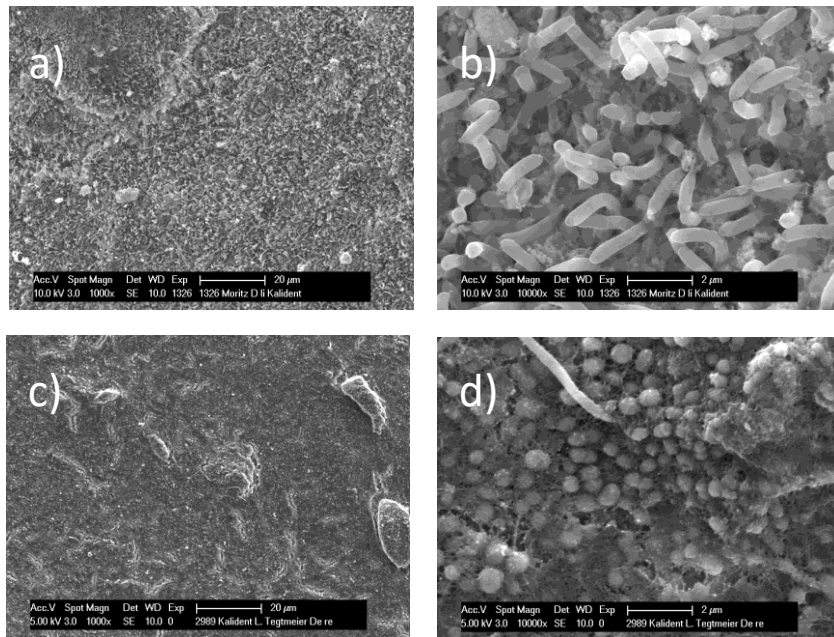


Abbildung 15: repräsentative REM- Aufnahmen eines 48h- Biofilm nach der Spülung mit **Hydroxylapatit**. **a) + b):** 1. Spülprotokoll; **c) + d):** 2. Spülprotokoll; Die Prüfkörper waren vorwiegend gekennzeichnet durch einen mehrschichtigen Biofilm. Zwischen den Bakterien lässt sich die Biofilm-Matrix erkennen. Die Bakterien waren meist kokkenförmig und teilweise stäbchenförmig. Aufnahmen a) + c) in 1000-fache - und b) + d) in 10000-fache- Vergrößerung

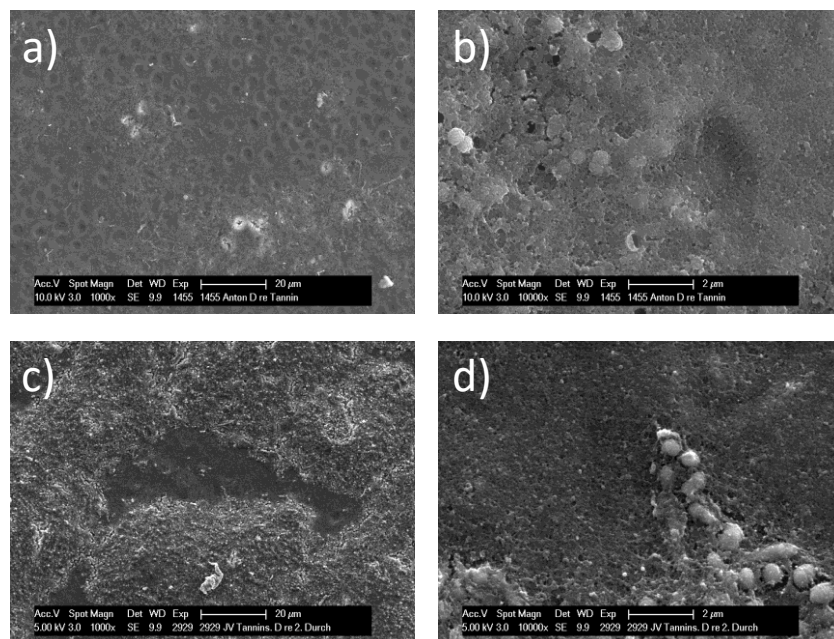


Abbildung 16: repräsentative REM- Aufnahmen eines 48h- Biofilm nach der Spülung mit **Tanninsäure** **a) + b):** 1. Spülprotokoll; Die Prüfkörper zeigten im 1. Durchgang einen weniger bedeckenden Biofilm als die Kontrollgruppe. Teilweise vereinzelte Bakterien und teilweise größere Bakterienaggregationen. Die Bakterien waren vor allem kokkenförmig; **c) + d)** 2. Spülprotokoll: die Prüfkörper zeigten sich durch teilweise mehrschichtige Bakterienagglomeraten und teilweise durch Pellikel und bakterienfreie Flächen; Aufnahmen a) + c) in 1000-fache- und b) + d) in 10000-fache- Vergrößerung

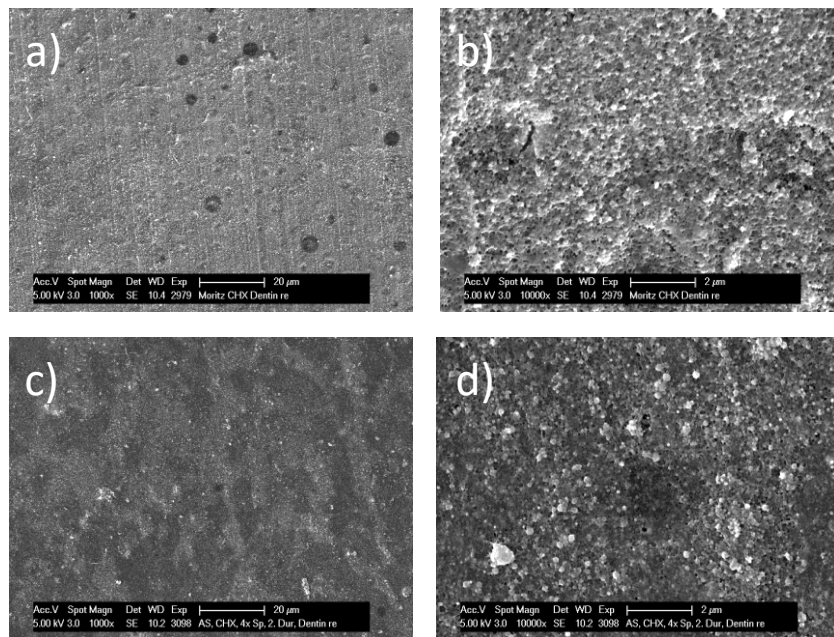


Abbildung 17: repräsentative REM- Aufnahmen eines 48h- Biofilm nach der Spülung mit **Chlorhexidin. a) + b):** 1. Spülprotokoll und **c) + d)** 2. Spülprotokoll; Die Prüfkörper waren vorwiegend gekennzeichnet durch vereinzelte Bakterien, welche meist kokkenförmig und teilweise stäbchenförmig waren. Der Biofilm war zusammengesetzt aus Pellicel, welche den Prüfkörper überzog; Aufnahmen a) + c) in 1000-fache- und b) + d) in 10000-fache- Vergrößerung

5 Diskussion

5.1 Diskussion von Material und Methode

5.1.1 Bovines Zahnmaterial (Dentin)

Um Untersuchungen in Bezug auf die orale Biofilmentwicklung beim Menschen durchführen zu können, müssen Faktoren wie similitäre Eigenschaften, Verfügbarkeit und Standardisierung der Prüfkörper erfüllt sein. In zahlreichen Studien wurde bereits bovines Material als eine Alternative zu humanem Zahnhartgewebe für die Untersuchung von Adhäsion, Biofilmbildung und Erosionsverhalten an humanem Zahnhartgewebe erfolgreich genutzt [77,99,150]. Beim Vergleich der chemischen Zusammensetzung von Schweine-, Schaf- und Rinderdentin mit menschlichem Dentin zeigte das bovine Dentin die höchste Similarität [138]. Zudem sind die bovinen Zähne in ihren histochemischen Eigenschaften und anatomischen Strukturen den menschlichen Zähnen ähnlich [99]. Durch die Betrachtung mit dem Elektronenmikroskop konnte gezeigt werden, dass die Dichte an Dentintubuli und deren Durchmesser bei Rindern in keinem signifikanten Unterschied zu humanem Material steht [123].

Des Weiteren sind standardisierte Proben bei Rindern einfacher als beim Menschen zu erhalten. Die in der Studie genutzten Prüfkörper stammen von zweijährigen Rindern eines Schlachthofes, die gleichen Umweltbedingungen ausgesetzt waren und den gleichen Ernährungsumstand vorwiesen. Die Verfügbarkeit einer hohen Anzahl von Zähnen gleicher Mineralisation und kariöser Unversehrtheit ist bei Menschen mit unterschiedlichen Essgewohnheiten und Fluoridzufuhr nicht gegeben [150]. Die Mehrzahl der Studien widmen sich der Pathogenese auf der Schmelzoberfläche und weniger der auf Dentin, wobei auch diese wegen freiliegender Zahnhälse und Attrition von großer Relevanz ist [77]. Es konnte gezeigt werden, dass die initiale Biofilmbildung bei Dentin mit der Zeit konstant steigt [77], während bei Schmelz die bakterielle Besiedlung ein Maximum erreicht [53]. Dieses Phänomen könnte durch die kollagene Matrix des Dentins oder durch die Öffnungen der Dentintubuli zu erklären sein [76]. Die Dentinmatrix besteht vorwiegend aus dem Kollagentyp 1, woran Streptokokken binden können. Unter anderem konnte in einer elektronenmikroskopischen Studie gezeigt werden, dass sich Bakterien hauptsächlich in den Bereichen der Odontoblastenfortsätzen anlagern [42]. In einer Studie zur Überprüfung von Rinderzähnen als Ersatz für menschliche Zähne konnte kein signifikanter Unterschied in den oberflächlichen Adhäsionseigenschaften von humanem und bovinem Dentin festgestellt werden, sodass sich diese für den Vergleich eignen [99].

5.1.2 Modell der Studie

Zur Untersuchung der Biofilmbildung und deren Beeinflussung durch chemische Substanzen gibt es bereits In- vitro-, In- vivo- und In- situ- Studien. Die In- vitro- Untersuchungen zeichnen sich durch eine vermeintliche, vorteilhafte Standardisierung und Reproduzierbarkeit aus, jedoch ist fraglich, inwiefern sie die intraorale In-vivo-Situation wiedergeben. So konnte gezeigt werden, dass sich auf mit Wasser gespülten Prüfkörpern ein dickerer Biofilm etabliert als auf ungespülten Prüfkörpern. Die chemische Zusammensetzung an der Oberfläche der Prüfkörper hat maßgeblichen Einfluss auf die Pellicel- und Biofilmentwicklung [54]. Der Speichel als zentrales Medium für unterschiedliche Bakterien, Enzyme und Pellicel bildende Proteine ist für die initiale Biofilmbildung und für die Reifung von hoher Relevanz [58]. In-situ bildet sich ein strukturierter, organisierter Biofilm, der sich von dem In-vitro- Film als weniger anfällig für antimikrobielle Substanzen unterscheidet [125,152]. Die Problematik besteht darin, dass der mikrobielle Metabolismus im Biofilm von verschiedenen Faktoren wie z.B. Ernährung und niedermolekulare Signalvermittlung zur Genexpression abhängig ist, was In- vitro schwer simulierbar ist [82]. Untersuchungen zeigten bisher signifikante Unterschiede vom natürlichen Pellicel zum Pellicel In-vitro [154]. Die Zusammensetzung und Enzymaktivität des Biofilms sind in-situ von vielen Faktoren wie Ernährung, Bakterienlast oder Speichelfluss abhängig und zeigen sowohl inter- als auch intraindividuelle Variationen. Die Versuchsmodelle in der Mundhöhle mit herausnehmbarer Trageschiene bilden eine geeignete Alternative zur reproduzierbaren und standardisierten Untersuchung im natürlichen Mundhöhlenmilieu [54]. Unter Beachtung, dass verschiedene Lokalisationen in der Mundhöhle unterschiedliche Biofilmformationen bilden [60], können die Prüfkörper an den gleichen Stellen auf der Trageschiene positioniert und verglichen werden. Die direkte Entnahme des Biofilms von der humanen Zahnhartsubstanz hat sich als schwierig gestaltet. Mithilfe der Fixation in Silikon können die Prüfkörper unverändert entnommen und analysiert werden. Die Positionierung an den Molaren stellte für die Probanden keine Einschränkungen in der Ästhetik dar und garantierte eine ungestörte Biofilmentwicklung. Bei der Einhaltung des Spülprotokolls und bei der Entnahme der Schienen während der Nahrungsaufnahme musste auf das wissenschaftliche Pflichtbewusstsein der Probanden vertraut werden.

5.1.3 Studienbedingungen

Die Studienbedingungen sollten genau definiert und ausdifferenziert sein, um interindividuelle Unterschiede möglichst zu reduzieren. Um Pellikel und Biofilm beeinflussende externe Faktoren zu vermeiden, wurden spezielle Konditionen aufgestellt.

Die Probanden mussten eine Mundhöhlensituation frei von kariösen, gingivalen und parodontalen Erkrankungen aufweisen. Außerdem wurden Probanden ohne natürliche Salivation aufgrund von Bestrahlung, Medikamenten oder Vorerkrankungen von der Studie ausgeschlossen. Während der intraoralen Tragezeit sollte kein Gebrauch von säurehaltigen Getränken und konventionellen Mundspüllösungen gemacht werden. Um das Phänomen der Hungerpellikel zu vermeiden, erfolgte bei den Probanden eine regelmäßige Wasser- und Nahrungsaufnahme.

Je größer die Probandenanzahl einer Studie, umso weniger beeinflussen interindividuelle Unterschiede die Resultate. Durch die hohe Anzahl der Versuche für die jeweiligen Probanden und die Komplexität in experimenteller und analytischer Methodik stellte sich eine Selektion von 6 Probanden als realisierbar dar.

Die Biofilme wurden im Molarenbereich entnommen, um eine Vergleichbarkeit zu vorherigen Studien herstellen zu können. Um die Langzeiteffekte der antimikrobiellen Substanzen auf den Biofilm zu untersuchen, hat sich bereits in vorherigen Studien eine Versuchsdauer von 48 h bewährt [94]. Hierbei wurde für das Spülprotokoll 1 die Zeitfolge auf 3 min, 12 h, 24 h, 36 h und 47,5 h und für das Spülprotokoll 2 auf 3 min, 12 h, 24 h, 36 h angesetzt. Über die Spülprotokolle 1 und 2 konnten somit die kurz- und langfristige Wirkung der Agenzien beobachtet werden. Im Spülprotokoll 1 betrug der Zeitabstand von der letzten Spülung mit dem Agens bis zur Auswertung Ex-vivo 30 min. Im Spülprotokoll 2 betrug dieser Zeitabstand 12 h.

Die Aussagekraft der Resultate ist durch die Anzahl der Probanden und aufgrund von interindividueller Unterschiede eingeschränkt.

5.1.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die Quantifizierung der den Biofilm kolonisierenden Bakterien ist umstritten. Verfahren wie Transmissionselektronenmikroskopie, Plattenkulturtechniken und Lichtmikroskopie wurden bereits in Vergangenheit in Erwägung gezogen und genutzt. Die Quantifizierung der Bakterien mit dem Elektronenmikroskop stellt sich durch umfangreiche Fixier- und Einbettungsverfahren zur Visualisierung des mikrobiellen Biofilms als aufwendig dar [53]. Die Zähltechniken über Plattenkulturen weisen Ungenauigkeiten vor. Zum einen sind ca. 50 % der Bakterienspezies der Mundhöhle nicht anzüchtbar, zum anderen selektieren die Zählmethodiken Spezies aus und es kommt im Vergleich der Quantifizierung mittels Fluoreszenzmikroskopie zu erheblichen Diskrepanzen in den Resultaten [106,136]. Die Methodik, über fluoreszierende Farbstoffe Bakterienzellen zu färben und dann über das Mikroskop darzustellen, wurde bereits von Neutschil im Jahr 1983 genutzt. Der Farbstoff hierfür war Ethidiumbromid und Fluoreszindiacetat [100]. Ethidiumbromid ist aufgrund seiner Mutagenität, Toxizität und Instabilität für die Quantifizierung weniger geeignet. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein Vitalitätsverlust der Bakterien nach Anfärbung mit Ethidiumbromid rasch anstieg [136]. Eine Alternative stellt die Live-Dead-Färbemethode dar. Hierbei werden die Bakterien angefärbt, die je nach Vitalitätszustand für lebensfähige Bakterien grünes, oder für avitale Bakterien rotes Licht emittieren. Diese Färbung ermöglicht eine Differenzierung, um z.B. bei der Messung von antimikrobiellen Substanzen die Reaktion des Biofilms zum natürlichen Verhalten vergleichen zu können. Auch ermöglicht dieses Verfahren zwischen antiadhärenten und antibakteriellen Präparaten zu unterscheiden. Das Live-Dead-System verfolgt zwei unterschiedliche Prinzipien der Penetration des bakteriellen Mikroorganismus: einerseits die Einschleusung des Farbstoff in die aktiven Zelle durch Metabolismus und andererseits durch die Permeabilität der bakteriellen Zellmembranen [8,53,136].

Der in der vorliegenden Studie genutzte Farbstoff Syto 9 diffundiert durch die intakte Membran und bindet an Desoxyribonukleinsäuresequenzen. Durch die Bindung kommt es zur Emission des grünen Lichts. SYTO 9 färbt Zellen mit intakter und geschädigter Membran an. Ein weiterer Färbstoff Propidiumiodid kann ausschließlich in Zellen mit geschädigter Membran diffundieren. Durch die chemische Reaktion mit Desoxyribonukleinsäuren kommt es zur Reaktion und Emission von rotem Licht. Durch die höhere Affinität von Propidiumiodid zu den Desoxyribonukleinsäuresequenzen färben sich avitale Zellen rot und die restlichen lebensfähigen Bakterien grün [22].

Neutschil et al. kritisieren Färbeverfahren aufgrund ihrer Konzentrationsabhängigkeit und deren ungenügenden Anwendbarkeit für multispezifische Biofilmmodelle [102]. Grüne Zellen können zudem durch eine lange Belichtungszeit durch das Mikroskop ihre Vitalität verlieren. Die Wechselwirkungen der Bakterien mit den Farbstoffen und deren Auswirkung auf die Vitalität der Bakterienzelle sollte differenziert untersucht werden, um ein genaues Ergebnis zwischen gefärbten Zellen und dem realen Zustand des Biofilms abzubilden. Ein weiterer Vorteil, den die Fluoreszenzmikroskopie bietet, ist das Anfärben des Biofilms ohne die Trennung von der Substratoberfläche. Das Abgewinnen des Biofilms vom Substrat bei der Methodik der Plattenkulturen führt womöglich zur Diskrepanz in den unterschiedlichen Messmethoden [53,136]. Hierbei muss der Biofilm zur Messung von seinem Substrat per Ultraschall entfernt werden.

5.1.5 Rasterelektronenmikroskopie

Um die ultrastrukturelle Morphologie des Biofilms zu betrachten, eignet sich die Rasterelektronenmikroskopie. Andere Verfahren sind die Transmissionselektronenmikroskopie oder die Rasterkraftmikroskopie. Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie wurden bereits mehrere Untersuchungen zu oralen Biofilmen durchgeführt [54,77]. Aufgrund der aufwendigen Methodik zur Vorbereitung der Prüfkörper für die elektronenmikroskopische Untersuchung eignen sich die REM-Bilder zur unterstützenden Beschreibung der statistisch ausgewerteten Fluoreszenzmikroskopiebilder. Mit 2000-facher bis hin zur 20.000-facher Vergrößerung lassen sich sowohl Übersichtsaufnahmen als auch einzelne Bakterienzellen darstellen. Die Rasterelektronenmikroskopie veranschaulicht die Interaktion von beteiligten Mikroorganismen sowohl mit der Biofilmmatrix als auch untereinander.

5.1.6 Quantifizierung durch Scoring

Um die Biofilmbedeckung systematisch auf der Dentinoberfläche zu erfassen, wurde bereits in vergangenen Untersuchungen ein Scoring- System verwendet [115]. Eine Anforderung an das Scoring- System ist es, sowohl wenig besiedelte als auch dicht besiedelte Prüfkörper zu erfassen. Zur systematischen Erfassung der Biofilmbesiedlung von Schmelzoberflächen kann eine alternative technische Software, wie z.B ImageJ, herangezogen werden. Auf Dentinoberflächen gestaltet sich dies schwieriger. Wie im Rasterelektronenmikroskop erkennbar setzen sich Mikroorganismen in die Tiefen der Dentintubuli. Diese werden vom Farbstoff erfasst, sodass sie bei einer softwaregesteuerten Analyse über Farbkontraste mit in die Auswertung einbezogen werden. Ein weiterer Aspekt, der gegen eine Auswertung per Software spricht, ist die Eigen-

fluoreszenz der Prüfkörper. Dentinkanälchen selbst färben sich in gewisser Weise an und fluoreszieren, sodass sich eine Auswertung mit Hilfe des Scoring- System als sinnvolle Alternative zur technischen Software darstellt.

In Bezug auf die Erfassung der Vitalität ist das Bewertungssystem nach den Scoring- Werten z. B. im Fall der Spülung mit Chlorhexidin limitiert. Dies zeigt sich vorwiegend bei von Bakterien schwach besiedelten Prüfkörpern. So wird bei zwei Bakterien, die unterschiedlich angefärbt sind, der Scorewert 3 vergeben, der einen Zustand des Gleichgewichts von vitalen und avitalen Bakterien beschreibt. Da es sich bei den fluoreszenzmikroskopischen Bildern um einen Ausschnitt handelt, ist es möglich, dass ein Ausschnitt gewählt wird, der ein einziges Bakterium, z. B. rot fluoreszierend, abbildet. Hierbei würde der Scorewert 1 gegeben werden. Es zeigt sich, dass das Scoring-System in Bezug auf die Bewertung Vitalität vor allem für die Oberflächen, die von mikrobiellem Biofilm bedeckt sind, aussagekräftig ist. Hierbei ist durch die Quantität der Bakterien der auszuwertende Bildausschnitt weniger großen Schwankungen unterlegen.

5.1.7 Biofilmbildung

Die Dentinoberfläche stellt für die Akkumulation von Mikroorganismen ein wichtiges Substrat dar. Durch kariöse oder abrasive Prozesse kann diese freiliegen. Insbesondere die Dentinkanälchen können Bakterien Schutz vor Scherkräften bieten. Somit wird die Umwandlung von der reversiblen zur irreversiblen Adhärenz der Bakterien nicht gestört. Bei Oberflächenunregelmäßigkeiten und Stellen, an denen Speichelfluss und abscherende Kräfte in der Mundhöhle stagnieren, wurde gezeigt, dass hier Bakterien länger überleben, da sie vor natürlichen Abwehrmechanismen geschützt sind. Für den Zahnschmelz konnte bereits per Elektronenmikroskop gezeigt werden, dass die Biofilmentwicklung von Rillen, Erosionen und Rissen ausgeht [107]. Eine weitere Studie bestätigt die Beobachtung der vorwiegenden Akkumulation von Bakterien an von Scherkräften geschützten Strukturen [97]. Die Dentinkanälchen erwiesen sich in einer anderen Studie als geeigneter Ort für eine ungestörte Akkumulation. Es gilt dabei zu beachten, dass Bakterien nicht direkt an der Zahnoberfläche adhäreren sondern an der dazwischen liegenden Pellikelschicht [77].

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Diskussion der Zielsetzung

Die vorliegende Studie untersuchte den Einfluss der Spüllösungen Chitosan, Hydroxylapatit, Tanninsäure und Chlorhexidin auf die 48- Stunden Biofilmentwicklung am Dentin. Unter diesen Bedingungen stellt der Vergleich der Spüllösungen miteinander einen Informationsgewinn in Bezug auf antibakterielle bzw. antiadhäsive Maßnahmen bei der Entstehung des oralen Biofilms auf Dentin dar.

Die Untersuchung bestätigt, dass eine Mundspülung mit effektiven antibakteriellen Präparaten eine unterstützende Maßnahme im Biofilm- Management darstellen kann. Durch die beobachtete Reduktion von Mikroorganismen bei Anwendung der Spüllösung Chlorhexidin wird bestätigt, dass sich chemische Maßnahmen bei Patienten mit eingeschränkter Motorik zur Unterstützung der mechanischen Zahnreinigung eignen [94,137]. Die Untersuchungen bestätigen auch, dass eine Spülung bei fehlender antiadhäsiver und antibakterieller Wirkung, siehe Wasser, keinen Effekt im Hinblick auf die Reduzierung der Mikroorganismen zeigt [94] und somit in den genannten Situationen keine sinnvolle Option im Biofilm-Management darstellen .

Die vorliegenden Resultate zeigen deutliche Unterschiede in der Biofilmentwicklung (Bedeckung und Vitalität) zwischen den Probanden und auch zwischen den Versuchsreihen. Dieses Phänomen könnte durch verschiedenartigen Speichelfluss und unterschiedliche Essgewohnheiten wie auch aufgrund variierender Kost eines Probanden erklärbar sein [54]. Zum einen ist die Speichelzusammensetzung von der aufgenommenen Nahrung abhängig [54]. Zum anderen verbleiben Speisereste in der Mundhöhle, die für die verschiedenen Bakterienspezies als Substratgrundlage dienen und möglicherweise das Wachstum der Mikroorganismen beeinflussen [29]. Um etwaige Schwankungen zu vermeiden, könnten die Versuchsreihen um ein zusätzliches Ernährungsprotokoll erweitert werden. Eine limitierte Ernährungsmöglichkeit stellt aber zugleich eine deutliche Einschränkung für die Probanden dar und könnte deren Akquise erschweren. Die Biofilmbildung differiert zwischen den einzelnen Probanden auch aufgrund seines Mikrobioms. Dieses ist von zahlreichen Faktoren wie Ernährung, Verdauung, Umweltchemikalien abhängig und demnach durch den Lebensstil des Individuums beeinflusst [80]. Aufgrund dieser Faktoren sind ein physiologischer Speichelfluss und ein Mikrobiom, die von Strahlentherapie und Medikamenteneinnahme unbeeinflusst sind, unerlässliche Voraussetzungen.

Es wurde bei den vorliegenden Untersuchungen die Adhäsion von Mikroorganismen auf der pellicelbedeckten Dentinoberfläche festgestellt. Bereits in vorangegangenen Studien wurde die

Oberflächenrauheit von Zahnhartsubstanzen als relevanter Faktor für die Adhärenz von Mikroorganismen beschrieben. An Oberflächenirregularitäten lagert sich der Biofilm bevorzugt an [107]. Die anatomische Struktur des Dentins stellt einen entscheidenden Faktor für die Adhäsion der Bakterien dar. Die Dentintubuli tragen zur bakteriellen Adhärenz bei und bieten den Mikroorganismen Schutz vor Biofilm beeinflussenden Scherkräften [60,77,139]. Über das Rasterelektronenmikroskop konnte beobachtet werden, dass sich Bakterien an und in den Dentintubuli anlagern. Diese Hohlräume könnten durch ihre anatomische Struktur schwieriger von der Spüllösung benetzt und somit anhaftende Mikroorganismen von einer Beeinflussung durch die Spülung verschont werden. Dentintubuli stellen somit eine besondere Herausforderung für die Anwendung von Spüllösungen dar. Die Beobachtungen, dass sich Bakterien auch bei Anwendung antibakterieller Lösungen in den Tubuli anlagern, stützen diese Aussage. Die Relevanz der anatomischen Struktur in der Entstehung einer Dentinkaries wird, wie Jung et al. (2010) bereits vermuteten, durch die Untersuchungen bestärkt [77].

5.2.2 Kontrollspülung mit Wasser

Um einen Vergleich zu potentiellen antibakteriellen und den Biofilm hemmenden Effekten von Spüllösungen zu ermöglichen, zeigte sich bereits in vorangegangenen Untersuchungen destilliertes Wasser als geeignete Kontrolle [94]. Die Prüfkörper zeigten vorwiegend große Bakterienagglomerate und mehrschichtig organisierten Biofilm. Die mit Wasser umspülten Prüfkörper zeichneten sich häufig durch eine vollständige Bedeckung mit Biofilmen aus. Im Vergleich von Spülprotokoll 1 mit Spülprotokoll 2 ließen sich keine signifikanten Unterschiede erkennen. Nach der Spülung mit Wasser zeigte sich kein Unterschied in der Kurz- und Langzeitwirkung. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie wurden durch die Rasterelektronenmikroskopie gestützt. Die Kontrollgruppe unterlag intra- und interindividuellen Schwankungen, die eine verallgemeinernde Aussage der Ergebnisse limitieren.

5.2.3 Hydroxylapatit als Spüllösung

In den Untersuchungen konnten keine deutlichen Unterschiede der Ergebnisse unter der Spülung mit Hydroxylapatit im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden werden. Für Spülprotokoll 2 ließ sich ein etwas höherer Mittelwert als für Spülprotokoll 1 beobachten. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant, um eine Aussage über eine Lang- und Kurzzeitwirkung nach Spülungen mit Hydroxylapatit zu treffen. Die Werte der fluoreszenzmikroskopischen Analyse unterlagen Schwankungen, die rasterelektronenmikroskopisch bestätigt wurden. Es liegen wenig

vergleichbare Untersuchungen zur antibakteriellen und antiadhärenten Wirkung von Hydroxylapatit in Bezug auf den oralen Biofilm in der Literatur vor. Zahlreiche Publikationen beschäftigen sich mit kariespräventiven Eigenschaften von Nano-Hydroxylapatit. Der untersuchte Mechanismus ist hierbei die Remineralisation von frühkariösen Läsionen. Kim et al. (2007) beobachteten einen synergistischen Effekt von Mundspülungen mit Nano-Hydroxylapatit und Natriumfluoriden bei der Remineralisation von Schmelz [81]. Ähnliche Beobachtungen konnte Onuma et al. (2005) in Bezug auf die Remineralisation machen [105]. Das Medium für die Untersuchung war in dieser Studie allerdings Zahnpasta. Kensche et al. (2017) beobachteten einen antiadhäsiven Effekt mit Nano-Hydroxylapatit-Spülungen. Hierbei wurde der Biofilm 8 h in der Mundhöhle über Nacht gebildet und boviner Schmelz als Substrat für die orale Biofilmbildung genutzt. Ähnlich wie in der vorliegenden Studie konnte auch in der 8 h- Untersuchung kein Effekt von Hydroxylapatit auf die Vitalität des Biofilms beobachtet werden. Im Gegensatz zur vorliegenden Untersuchung wurde jedoch ein signifikanter Unterschied in der Bedeckung mit Biofilm beobachtet [79]. Nach der Spülung mit Hydroxylapatit zeigte sich in der Studie von Kensche et al. ein ausgeprägter antiadhärenter Effekt. Dieser Unterschied könnte im Versuchsaufbau liegen. In der vorliegenden Studie wurde der reife Biofilm nach 48 h anstelle eines 8 h Biofilms untersucht. Zudem handelt es sich im Vorliegenden um den Effekt auf Dentin- und nicht auf Schmelzoberflächen.

Die in der vorliegenden Studie nicht untersuchte Remineralisationseigenschaft von Hydroxylapatit in Mundspüllösungen könnte einen wichtigen kariespräventiven Wirkmechanismus darstellen, weswegen antibakterielle und antiadhäsive Eigenschaften von Hydroxylapatit auf die orale Mundflora weiterhin untersucht werden sollten, um von eventuellen synergistischen Effekten im Biofilmmanagement zu profitieren.

5.2.4 Chitosan als Spüllösung

Die Ergebnisse zu Chitosan zeigen keine deutlichen Effekte einer Reduktion der Biofilmbildung oder antibakterielle Effekte. Bei der Anwendung von Spülprotokoll 1 wies die Vitalität des Biofilms eine geringe aber nicht signifikante Abweichung zur Kontrollgruppe auf. Der Vergleich der Spülprotokolle 1 und 2 zeigte keine signifikanten Unterschiede nach der Spülung mit Chitosan. Dies gilt sowohl für die Bedeckung durch den Biofilm als auch für die Biofilmvitalität der Prüfkörper nach der Spülung mit Chitosan. Es lassen sich anhand der Ergebnisse keine Lang- oder Kurzzeitwirkung von Chitosan auf den Biofilm beobachten. Die rasterelektronenmikroskopische Analyse zeigte kein eindeutiges Bild hinsichtlich antiadhäsiver und antibakterieller Effekten.

Es gibt Untersuchungen zur kariespräventiven Wirkungen von Chitosan, welche jedoch im Hinblick auf die Studienbedingungen der vorliegenden Untersuchung nicht gleichen [12,66]. Diese Untersuchungen unterscheiden sich in der Methodik und den Ergebnissen im Vergleich zu der vorliegenden Studie. In einem In-situ- Experiment wurden eine 0,2 % Chlorhexidin-, eine Chitosanlösung und eine Kombination aus beiden Lösungen an Probanden über vier Tage untersucht [144]. Die Ergebnisse von Uraz et al. (2012) zeigten einen synergistischen Effekt von Chitosan und Chlorhexidin. Zudem beobachteten Uraz et al. einen antibakteriellen Effekt von Chitosan, der sich von Chlorhexidin nicht signifikant unterschied. In der vorliegenden Studie gibt es deutliche Unterschiede zwischen Spülungen mit Chlorhexidin und Chitosan, sowohl in der Beeinflussung der Vitalität als auch in der Bedeckung der Proben mit Biofilm. Die Vermutung, dass Chitosan einen antibakteriellen Effekt auf die orale Mundflora besitzt, kann die vorliegende Studie nicht bestätigen. Im Blick auf die Methodik zeigt sich, dass sich die Studien voneinander unterscheiden und für die Unterschiede in den Ergebnisse verantwortlich sein könnten. Der von Uraz et al. untersuchte Biofilm wurde von der menschlichen Zahnhartsubstanz entfernt und nicht wie vorliegend auf Rinderprüfkörpern direkt untersucht [144]. Costa et al. (2013) beobachteten im Rahmen einer In-vitro- Studie, dass Chitosan die frühe Biofilmbildung deutlich hemmt und den Karies verursachenden Keim *Streptococcus mutans* bei der Adhäsion beeinflusst [36]. Die Unterschiede in den Ergebnissen von Costa et al. und der vorliegenden Studie könnten insbesondere in der unterschiedlichen Methodik begründet sein. Wilson et al. (1998) beobachteten, dass die Anfälligkeit des Biofilms für gewisse antibakterielle Substanzen In- vitro und In- situ deutlich variieren kann [152]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen aufgrund der Probandenzahl von 6 keine endgültige Aussage zur Wirkung von Chitosan zu.

Arnaud et al. (2010) beobachteten in einer In- vitro- Studie eine hemmende Wirkung von Chitosan auf die Demineralisation von Schmelz. In dieser Studie wurde unter Chitosanbehandlung sowohl eine verminderte Phosphatabgabe des Schmelzes als auch eine remineralisierende Wirkung beobachtet [13]. Die Beobachtungen zeigen, dass Chitosan mehrere Mechanismen in der Kariesprävention vereinen könnte, sodass hier weitere Untersuchungen sinnvoll erscheinen.

5.2.5 Tanninsäure als Spüllösung

Nach der Spülung mit Tanninsäure zeigten die Prüfkörper im Mittel eine reduzierte bakterielle Bedeckung im Vergleich zu der Kontrollgruppe Wasser. Der Effekt ist jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei Anwendung der Spüllösung Chlorhexidin. In der Untersuchung zur Vitalität zeigte sich auch im Vergleich zur Kontrollgruppe ein Unterschied. Der Mittelwert des Scoring

besagt, dass sich hier avitale und vitale Bakterien im Gleichgewicht, bzw. grüne Bakterien in leichtem Übergewicht befinden. Sowohl Prüfkörper mit nahezu vollständig bedeckenden Biofilmen als auch Prüfkörper mit vereinzelt Bakterienkolonien wurden beobachtet. Die Ergebnisse könnten auf einen den Biofilm reduzierenden Effekt von Tanninsäure schließen lassen. Gleichsam muss jedoch beachtet werden, dass die hier genutzte Art von Experimenten schon in anderen Untersuchungen hohen Schwankungen unterlag. In diesen waren die experimentellen Fehler teilweise kleiner als die biologischen Unterschiede [54]. Um eine weitergehende Aussage zu den antibakteriellen Eigenschaften von Tanninsäure treffen zu können und individuelle Abweichungen auszugleichen, müssten mehr Probanden in die Studie einbezogen werden.

Sowohl für die Bedeckung als auch für die Vitalität des Biofilms zeigten sich die Prüfkörper nach der Spülung mit Tanninsäure in Spülprotokoll 1 einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe Wasser. Dieser Unterschied wurde beim Spülprotokoll 2 nicht beobachtet. Die Ursache könnten die unterschiedlichen Spülprotokolle sein. In Spülprotokoll 1 wurde der reife Biofilm durch eine weitere Spülung nach 47,5 h erneut der Tanninsäure ausgesetzt, was auf einen kurzwirksamen Effekt von Tanninsäure auf den Biofilm deuten könnte. Die Analyse mittels des Wilcoxon-Test zeigte hierfür aber keine signifikanten Unterschiede.

In früheren Publikationen wird von antibakteriellen Effekten bzw. kariespräventiver Wirkung von Tanninen berichtet [78,112,130]. Zu der vorliegenden Studie gibt es keine vergleichbare Studie. Hertel et al. (2017) testeten Effekte von Tanninsäuren in Bezug auf die Pellikel und den damit verbundenen Erosionsschutz auf der Oberfläche von Schmelzprüfkörpern [68]. Dabei wurde die Beeinflussung des Biofilms in einem Zeitraum von 8 h In-vivo beobachtet. Es zeigte sich eine verringerte Bakterienadhäsion nach der Spülung mit Tanninsäure und eine Pellikelmodifizierung. Die Vermutung von Hertel et al., dass Tanninsäure einen kariespräventiven Ansatz bieten könnte, wird in der vorliegenden Studie teilweise für das Substrat Dentin ergänzt. Um einen antibakteriellen Wirkmechanismus der Tanninsäure zu beschreiben, muss die Klassifikation der Tannine beachtet werden. Akimaya (2001) untersuchte unter anderem für die Klasse der hydrolysierbaren Tannine die Wirkung auf *Staphylococcus aureus* [7]. Dabei wurde eine eisenbindende Wirkung der Tanninsäure beobachtet, die den Bakterien das für ihre Funktion wichtige Eisen entzieht [34]. Der Effekt von aus Tee extrahierten Tanninen, sogenannten Katechinen, wird unter anderem auf eine Schädigung in der Integrität der Zellmembran und eine darauffolgende Lyse zurückgeführt [71]. Akiyama vermutet zudem, dass Tannine zusätzlich zu β -Lactam Antibiotika einen synergistischen Effekt erzielen könnten [7].

Die vorliegenden Ergebnisse weisen auf einen positiven Effekt von Tanninen in Bezug auf das Biofilm-Management in der Kariesprävention hin, um jedoch diese Beobachtungen zu bestätigen, müssen weitere Untersuchungen angestellt werden.

5.2.6 Chlorhexidin als Spüllösung

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen einen Biofilm hemmenden Effekt auf die 48 h Biofilmbildung unter der Spülung mit 0,2 % Chlorhexidin. Dieser Effekt ist im Vergleich mit den anderen Spüllösungen am stärksten ausgeprägt. Zudem zeigte sich bei Prüfkörpern nach der Spülung mit Chlorhexidin eine Devitalisierung des Biofilms. Im Rasterelektronenmikroskop zeigten sich Bilder von Pellikel bedeckten Prüfkörpern, die vereinzelt adhärente Bakterien aufwiesen. Außerdem stellten sich disruptive Bakterien dar. Die Auswertung wies keine signifikanten Unterschiede nach der Spülung mit Chlorhexidin zwischen Spülprotokoll 1 und 2 vor. Dies ließ sich sowohl für die Biofilmbedeckung der Prüfkörper als auch deren Biofilmvitalität nach der Spülung mit Chlorhexidin beobachten. Als Ursache hierfür könnte die Substantivität von Chlorhexidin entscheidend sein. In der Literatur wird eine Verfügbarkeit in der Mundhöhle von Chlorhexidin bis zu 24 h beschrieben [109]. In Spülprotokoll 2 wurde nach 12 h vor der Auswertung letztmalig mit Chlorhexidin gespült. Die vorliegenden Ergebnisse für Biofilmvitalität und Biofilmbedeckung der Prüfkörper bestätigen somit die Langzeitwirkung von Chlorhexidin. In Bezug auf die Vitalität zeigte sich für die Ergebnisse von Chlorhexidin die in Kapitel 5.1.6 beschriebene Problematik des Scorings. Kaum von Bakterien bedeckte Prüfkörper wurden über einzeln gefärbte Bakterien in ihrer Vitalität bewertet, wobei sich eine Aussage über die Vitalität womöglich erst durch die Bewertung zahlreicher Bakterien zuverlässig messen lässt.

Lorenz et al. (2006) untersuchten bereits Chlorhexidinspülungen über 14-Tage und zeigten eine hemmende Langzeitwirkung der Biofilmbildung auf der Zahnhartsubstanz. Die Beobachtungen wurden in dieser Studie sowohl für alkoholhaltige als auch alkoholfreie Spülungen gemacht [89]. Die vorliegende Studie bestätigt die Beobachtung, welche die Forschungsgruppe von Martinez-Hernandez et al. (2020) in einer Untersuchung machen konnte. Die Bedingungen der Studie waren der vorliegenden ähnlich. Hier wurde bei 48 h Tragezeit mit Spülen für 30 s in 12 h Abständen die Oberfläche von Schmelz untersucht und eine 0,2 % Chlorhexidin-Spülung benutzt. Bei Martinez-Hernandez et al. waren sowohl die Bedeckung als auch Vitalität des Biofilms durch die Spülungen mit Chlorhexidin signifikant beeinträchtigt. Im Rasterelektronenmikroskop beobachtete sie zudem eine Disruption von Bakterien, die auch in der vorliegenden

Untersuchung festgestellt wurde [94]. Bereits frühere Veröffentlichungen bestätigten einen Effekt von 0,2 % Chlorhexidin- Lösung zur Prävention der bakteriellen Plaquebildung [4,43]. Eine antibakterielle Wirkung gegen *Streptococcus mutans* und somit eine potentielle Strategie gegen den Leitkeim der Karies konnte bereits In- vitro beobachtet werden [23,73]. Die Studienlage im Jahr 1997 führte Jones bereits dazu, Chlorhexidin als Gold- Standard der Chemotherapeutika in der Behandlung von periodontologischen Erkrankungen zu resümieren.

Der antibakterielle Mechanismus von Chlorhexidin besteht in einer Lyse der Bakterien. Das bikationische Chlorhexidin- Molekül wird von der negativ geladenen Zellwand, geprägt durch Sulfate und Phosphate, angezogen. Es kommt zur spezifischen Adsorption mit Phosphat haltigen Verbindungen. Dies verändert die Integrität der Zellmembran und Chlorhexidin bindet an die innere Zellmembran. An der inneren Membran bindet Chlorhexidin an Phospholipide und verschiedene Moleküle treten aus der Bakterienzelle heraus. Durch Ausfällung des Cytoplasmas kommt es zu phosphathaltigen Komplexen, welche Nukleinsäuren und Adenosintri-phosphat enthalten. Dies stellt einen tödlichen und irreversiblen Zustand der Zelle dar [21,75].

Andererseits wurde die Konzentrationsabhängigkeit von Chlorhexidin in Bezug auf das Verfärbungspotential von Zähnen beschrieben. Je größer der gewünschte antibakterielle Effekt, desto höher scheint das Potential der Verfärbung zu sein [27]. Die Nebeneffekte führen in der Literatur zu einer Kritik in der Langzeitanwendung von Chlorhexidin [18], sodass eine Erforschung nach Alternativen für chemische Methoden in der Kariesprävention von hohem Interesse bleibt.

5.3 Schlussfolgerung

Die Studie konnte mithilfe der Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie zeigen, dass eine 0,2 % Chlorhexidinlösung sowohl einen antiadhäsiven als auch einen antibakteriellen Einfluss auf die 48 h-Biofilmbildung an der Dentinoberfläche ausübt. Die 5 % Tanninsäure zeigte auf die Biofilmbedeckung des Dentins teilweise antiadhäsive und antibakterielle Wirkung. Die Spüllösungen mit Chitosan und Hydroxylapatit zeigten unter den gewählten Studienbedingungen hingegen keine den Biofilm reduzierende oder antibakterielle Eigenschaften nach 48 h. Inwieweit Hydroxylapatit, Chitosan und Tanninsäure in Spüllösungen einen Effekt zur Kariesprävention leisten können, bleibt fraglich und sollte im Fokus weiterer Forschung und größeren klinischen Studien stehen.

6 Literaturverzeichnis

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE (2005) Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43:5721–5732
2. Abou Neel EA, Aljabo A, Strange A, Ibrahim S, Coathup M, Young AM, Bozec L, Mudera V (2016) Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. *Int J Nanomedicine* 11:4743–4763
3. Addy M (1986) Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials: a short review. *J Clin Periodontol* 13:957–964
4. Addy M, Moran JM (1997) Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: Chlorhexidine formulations. *Periodontol 2000* 15:52–54
5. Agarwal P, Nagesh L (2011) Comparative evaluation of efficacy of 0.2% Chlorhexidine, Listerine and Tulsi extract mouth rinses on salivary *Streptococcus mutans* count of high school children — RCT. *Contemp Clin Trials* 32:802–808
6. Aguirre A, Mendoza B, Levine MJ, Hatton MN, Douglas WH (1989) In vitro characterization of human salivary lubrication. *Arch Oral Biol* 34:675–677
7. Akiyama H (2001) Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 48:487–491
8. Al-Ahmad A, Follo M, Selzer AC, Hellwig E, Hannig M, Hannig C (2009) Bacterial colonization of enamel in situ investigated using fluorescence in situ hybridization. *J Med Microbiol* 58:1359–1366
9. Aliasghari A, Khorasgani MR, Vaezifar S, Rahimi F, Younesi H, Khoroushi M (2016) Evaluation of antibacterial efficiency of chitosan and chitosan nanoparticles on cariogenic streptococci: An in vitro study. *Iran J Microbiol* 8:93–100
10. Arakawa T, Ishizaki T, Hayman RE, Hanada N, Senpuku H (2002) Adsorption Effect of Hydroxyapatite to Oral Streptococci. *J Dent Res* 81:2002

11. Arakawa T, Ishizaki T, Hayman RE, Hanada N, Senpuku H (2003) Interaction of Small Crystal Form of Hydroxyapatite with Mutans Streptococci. *J Dent Res* 82:2003
12. Archana V, Prabhuji ML V, Karthikeyan B V, Selvan A (2013) Control of Streptococcus sanguinis oral biofilm by novel chlorhexidine-chitosan mouthwash: an in vitro study. *J Exp Integr Med* 3.2
13. Arnaud TMS, de Barros Neto B, Diniz FB (2010) Chitosan effect on dental enamel remineralization: An in vitro evaluation. *J Dent* 38:848–852
14. Arweiler NB, Hellwig E, Sculean A, Hein N, Auschill TM (2004) Individual vitality pattern of in situ dental biofilms at different locations in the oral cavity. *Caries Res* 38:442–447
15. Arweiler NB, Auschill TM, Sculean A (2018) Patient self-care of periodontal pocket infections. *Periodontol 2000* 76:164–179
16. Attin T, Hornecker E (2005) Tooth brushing and oral health: how frequently and when should tooth brushing be performed? *Oral Health Prev Dent* 3:135–140
17. Auschill T, Sälzer S, Arweiler N (2018) S3-Leitlinie: Häusliches chemisches Biofilmmangement in der Prävention und Therapie der Gingivitis. 2018. AWMF-S3-Leitlinie; Regist 083 - 016
18. Autio-Gold J (2008) The role of chlorhexidine in caries prevention. *Oper Dent* 33:710–716
19. Bae K, Jun EJ, Lee SM, Paik DI, Kim JB (2006) Effect of water-soluble reduced chitosan on Streptococcus mutans, plaque regrowth and biofilm vitality. *Clin Oral Investig* 10:102–107
20. Baehni PC, Takeuchi Y (2003) Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Dis* 9:23–29
21. Balagopal S, Arjunkumar R (2013) Chlorhexidine: The gold standard antiplaque agent. *J Pharm Sci Res* 5:270–274

22. Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R (1999) LIVE/DEAD(®) BacLight(TM): Application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods* 37:77–86
23. Bowden GH (1996) Mutans streptococci caries and chlorhexidine. *J Can Dent Assoc* 62:700,703-707
24. Bowen WH, Koo H (2011) Biology of streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: Role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res* 45:69–86
25. Brading MG, Marsh PD (2003) The oral environment: the challenge for antimicrobials in oral care products. *Int Dent J* 53:353–362
26. Brex M (1997) Strategies and agents in supragingival chemical plaque control. *Periodontol* 2000 15:100–108
27. Brex M, Netuschil L, Hoffmann T (2003) How to select the right mouthrinses in periodontal prevention and therapy. Part II. Clinical use and recommendations. *Int J Dent Hyg* 1:188–194
28. Brothwell DJ, Jutai DK, Hawkins RJ (1998) An update of mechanical oral hygiene practices: evidence-based recommendations for disease prevention. *J Can Dent Assoc* 64:295–306
29. Buddecke E (1981) *Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin*. Walter de Gruyter
30. Butler WT (1984) Matrix Macromolecules of Bone and Dentin. *Top Catal* 4:297–307
31. Carlén A, Nikdel K, Wennerberg A, Holmberg K, Olsson J (2001) Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. *Biomaterials* 22:481–487
32. Chen CY, Chung YC (2012) Antibacterial effect of water-soluble chitosan on representative dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli brevis*. *J Appl Oral Sci* 20:620–627

33. Choi BK, Kim KY, Yoo YJ, Oh SJ, Choi JH, Kim CY (2001) In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *Int J Antimicrob Agents* 18:553–557
34. Chung K-T, Wong TY, Wei C-I, Huang Y-W, Lin Y (1998) Tannins and Human Health: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 38:421–464
35. Chung KT, Lu Z, Chou MW (1998) Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food Chem Toxicol* 36:1053–1060
36. Costa EM, Silva S, Tavaría FK, Pintado MM (2013) Study of the effects of chitosan upon *Streptococcus mutans* adherence and biofilm formation. *Anaerobe* 20:27–31
37. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* (80-) 284:1318–1322
38. Decker EM, Von Ohle C, Weiger R, Wiech I, Brex M (2005) A synergistic chlorhexidine/chitosan combination for improved antiplaque strategies. *J Periodontal Res* 40:373–377
39. Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167–193
40. Dorozhkin S V (2016) Calcium orthophosphates (CaPO₄): occurrence and properties. *Prog Biomater* 5:9–70
41. Emilson CG (1994) Potential efficacy of chlorhexidine against *mutans streptococci* and human dental caries. *J Dent Res* 73:682–691
42. Fagrell TG, Lingström P, Olsson S, Steiniger F, Norén JG (2008) Bacterial invasion of dentinal tubules beneath apparently intact but hypomineralized enamel in molar teeth with molar incisor hypomineralization. *Int J Paediatr Dent* 18:333–340
43. Fardai O, Turnbull RS (1986) A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc* 112:863–869

44. Fujimaru T, Ishizaki T, Hayman R, Senpuku H, Co S (2007) Adsorption of oral pathogenic microbes by small crystal hydroxyapatite. *J Dent Res* 86:5314
45. Fujiwara M, Hayashi Y, Ohara N (2004) Inhibitory effect of water-soluble chitosan on growth of *Streptococcus mutans*. *New Microbiol* 27:83–86
46. Garberoglio R, Brännström M (1976) Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol* 21:355–362
47. Gavriilidou NN, Belibasakis GN (2019) Root caries: the intersection between periodontal disease and dental caries in the course of ageing. *Br Dent J* 227:1063–1067
48. Geurtsen W, Hellwig E, Klimek J (2016) Kariesprophylaxe bei bleibenden Zähnen—grundlegende Empfehlungen. *S2k Leitlin AWMF Regist* 21–83
49. Gilbert P, Das J, Foley I (1997) Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 11:160–167
50. Gjermo P, Bonesvoll P, Rölla G (1974) Relationship between plaque-inhibiting effect and retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *Arch Oral Biol* 19:1031–1034
51. Gong K, Mailloux L, Herzberg MC (2000) Salivary film expresses a complex, macromolecular binding site for *Streptococcus sanguis*. *J Biol Chem* 275:8970–8974
52. Han B, Wei Y, Jia X, Xu J, Li G (2012) Correlation of the structure, properties, and antimicrobial activity of a soluble thiolated chitosan derivative. *J Appl Polym Sci* 125:E143–E148
53. Hannig C, Hannig M, Rehmer O, Braun G, Hellwig E, Al-Ahmad A (2007) Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. *Arch Oral Biol* 52:1048–1056
54. Hannig C, Hannig M (2009) The oral cavity - A key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig* 13:123–139
55. Hannig C, Gaeding A, Basche S, Richter G, Helbig R, Hannig M (2013) Effect of conventional mouthrinses on initial bioadhesion to enamel and dentin in situ. *Caries Res* 47:150–161

56. Hannig M (1999) Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Investig* 3:88–95
57. Hannig M, Balz M (1999) Influence of in vivo Formed Salivary Pellicle on Enamel Erosion. *Caries Res* 33:372–379
58. Hannig M (2002) The protective nature of the salivary pellicle. *Int Dent J* 52:417–423
59. Hannig M, Hess NJ, Hoth-Hannig W, De Vrese M (2003) Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization--an in situ pilot study. *Clin Oral Investig* 7:158–161
60. Hannig M, Joiner A (2006) The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci* 19:29–64
61. Hannig M, Hannig C (2007) Does a dental biofilm; free of bacteria; exist in situ? *J Parodontol D´ Implantol ORALE* 26 No.3:187
62. Harding IS, Rashid N, Hing KAÃ (2005) Surface charge and the effect of excess calcium ions on the hydroxyapatite surface. *J Dent Res* 84:6818–6826
63. Harvey JD (2017) Periodontal Microbiology. *Dent Clin North Am* 61:253–269
64. Hay DI (1973) The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. *Arch Oral Biol* 18:1517–1529
65. Hayashi Y, Ohara N, Ganno T, Yamaguchi K, Ishizaki T, Nakamura T, Sato M (2007) Chewing chitosan-containing gum effectively inhibits the growth of cariogenic bacteria. *Arch Oral Biol* 52:290–294
66. Hayashi Y, Ohara N, Ganno T, Ishizaki H, Yanagiguchi K (2007) Chitosan-containing gum chewing accelerates antibacterial effect with an increase in salivary secretion. *J Dent* 35:871–874
67. Hellwig E, Klimek J, Attin T (2007) Einführung in die Zahnerhaltung. Elsevier, Urban&FischerVerlag

68. Hertel S, Pötschke S, Basche S, Delius J, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C (2017) Effect of Tannic Acid on the Protective Properties of the in situ Formed Pellicle. *Caries Res* 51:34–45
69. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N (2009) Critical Review in Oral Biology & Medicine: Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. *J Dent Res* 88:982–990
70. Horikawa K, Mohri T, Tanaka Y, Tokiwa H (1994) Moderate inhibition of mutagenicity and carcinogenicity of benzo[a]pyrene, 1, 6-dinitropyrene and 3, 9-dinitrofluoranthene by chinese medicinal herbs. *Mutagenesis* 9:523–526
71. Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T (1993) Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *BBA - Biomembr* 1147:132–136
72. İkinci G, Şenel S, Akıncıbay H, Kaş S, Erciş S, Wilson CG, Hıncal AA (2002) Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Int J Pharm* 235:121–127
73. Jarvinen H, Tenovuo J, Huovinen P (1993) In vitro susceptibility of *Streptococcus mutans* to chlorhexidine and six other antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 37:1158–1159
74. Joiner A, Schwarz A, Philpotts CJ, Cox TF, Huber K, Hannig M (2008) The protective nature of pellicle towards toothpaste abrasion on enamel and dentine. *J Dent* 36:360–368
75. Jones CG (1997) Chlorhexidine: Is it still the gold standard? *Periodontol* 2000 15:55–62
76. Jones IL, Leaver AG (1974) Studies on the minor components of the organic matrix of human dentine. *Arch Oral Biol* 19:371–380
77. Jung DJ, Al-Ahmad A, Follo M, Spitzmüller B, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C (2010) Visualization of initial bacterial colonization on dentine and enamel in situ. *J Microbiol Methods* 81:166–174
78. Kandra L, Gyémánt G, Zajác Á, Batta G (2004) Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase. *Biochem Biophys Res Commun* 319:1265–1271

79. Kensche A, Holder C, Basche S, Tahan N, Hannig C, Hannig M (2017) Efficacy of a mouthrinse based on hydroxyapatite to reduce initial bacterial colonisation in situ. *Arch Oral Biol* 80:18–26
80. Kilian M, Chapple ILC, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AML, Tonetti MS, Wade WG, Zaura E (2016) The oral microbiome - An update for oral healthcare professionals. *Br Dent J* 221:657–666
81. Kim MY, Kwon HK, Choi CH, Kim BI (2007) Combined effects of nano-hydroxyapatite and NaF on remineralization of early caries lesion. *Key Eng Mater* 330-332 II:1347–1350
82. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI (2006) Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol* 2000 42:47–79
83. Kornman KS (1986) The role of supragingival plaque in the prevention and treatment of periodontal diseases. *J Periodontal Res* 21:5–22
84. Kroes I, Lepp PW, Relman DA (1999) Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14547–14552
85. Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ (2005) Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J Clin Microbiol* 43:3944–3955
86. Leal SC, Bittar J, Portugal A, Falcão DP, Faber J, Zanotta P (2010) Medication in elderly people: Its influence on salivary pattern, signs and symptoms of dry mouth. *Gerodontology* 27:129–133
87. Lo ECM, Schwarz E, Wong MCM (1998) Arresting dentine caries in Chinese preschool children. *Int J Paediatr Dent* 8:253–260
88. Longbottom C, Ekstrand K, Zero D (2009) Traditional preventive treatment options. *Monogr Oral Sci* 21:149–155

89. Lorenz K, Bruhn G, Heumann C, Netuschil L, Brex M, Hoffmann T (2006) Effect of two new chlorhexidine mouthrinses on the development of dental plaque, gingivitis, and discolouration. A randomized, investigator-blind, placebo-controlled, 3-week experimental gingivitis study. *J Clin Periodontol* 33:561–567
90. Maeda K, Nagata H, Yamamoto Y, Tanaka M, Tanaka J, Minamino N, Shizukuishi S (2004) Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Streptococcus oralis* Functions As A Coadhesin for *Porphyromonas gingivalis* Major Fimbriae. *Infect Immun* 72:1341–1348
91. Marsh P, Martin M V (2003) *Orale Mikrobiologie*, 1. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
92. Marsh PD (2004) Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 38:204–211
93. Marsh PD (2005) Dental plaque: Biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol* 32:7–15
94. Martínez-Hernández M, Reda B, Hannig M (2020) Chlorhexidine rinsing inhibits biofilm formation and causes biofilm disruption on dental enamel in situ. *Clin Oral Investig* 24:3843–3853
95. Mohammadi Z, Abbott P V. (2009) The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J* 42:288–302
96. Moore WEC, Moore LVH (1994) The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 5:66–77
97. Morris IJ, Wade WG, Aldred MJ, Walker DM (1987) The early bacterial colonization of acrylic palates in man. *J Oral Rehabil* 14:13–21
98. Nakagawa T, Yokozawa T (2002) Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food Chem Toxicol* 40:1745–1750
99. Nakamichi I, Iwaku M, Fusayama T (1983) Bovine Teeth as Possible Substitutes in the Adhesion Test. *J Dent Res* 62:1076–1081

100. Netuschil L (1983) Vital staining of plaque microorganisms using fluorescein diacetate and ethidium bromide. *Dtsch Zahnarztl Z* 38:914–917
101. Netuschil L, Reich E, Unteregger G, Sculean A, Brex M (1998) A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. *Arch Oral Biol* 43:277–285
102. Netuschil L, Auschill TM, Sculean A, Arweiler NB (2014) The confusion of the phenomenon of viability 49 different terms. 1–12
103. Niwa M, Sato T, Li W, Aoki H, Aoki H, Daisaku T (2001) Polishing and whitening properties of toothpaste containing hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med* 12:277–281
104. Nyvad B, Kilian M (1987) Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 95:369–380
105. Onuma K, Yamagishi K, Oyane A (2005) Nucleation and growth of hydroxyapatite nanocrystals for nondestructive repair of early caries lesions. *J Cryst Growth* 282:199–207
106. Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE, Aas JA (2005) Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *J Clin Microbiol* 43:5721–5732
107. Quirynen M, Bollen CM (1995) The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol* 22:1–14
108. Rasheed A, Haider M (1998) Antibacterial activity of *Camellia sinensis* extracts against dental caries. *Arch Pharm Res* 21:348–352
109. Reda B, Hollemeyer K, Trautmann S, Hannig M, Volmer DA (2020) Determination of chlorhexidine retention in different oral sites using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Arch Oral Biol* 110:104623
110. Rinaudo M (2006) Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci* 31:603–632

111. Rogers JD, Palmer J, Kolenbrander PE, Scannapieco FA (2001) Role of *Streptococcus gordonii* amylase-binding protein A in adhesion to hydroxyapatite, starch metabolism, and biofilm formation. *Infect Immun* 69:7046–7056
112. Rosen S, Beck FM, Beck EX, Elvin-Lewis M (1984) Anticariogenic Effects of Tea in Rats. *J Dent Res* 63:658–660
113. Roszak DB, Colwell RR (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev* 51:365
114. Roveri N, Battistella E, Bianchi CL, Foltran I, Foresti E, Iafisco M, Lelli M, Naldoni A, Palazzo B, Rimondini L (2009) Surface Enamel Remineralization: Biomimetic Apatite Nanocrystals and Fluoride Ions Different Effects. *J Nanomater* 2009:746383
115. Rupf S, Balkenhol M, Sahrhage TO, Baum A, Chromik JN, Ruppert K, Wissenbach DK, Maurer HH, Hannig M (2012) Biofilm inhibition by an experimental dental resin composite containing octenidine dihydrochloride. *Dent Mater* 28:974–984
116. Russell AD (1986) Chlorhexidine: Antibacterial Action and Bacterial Resistance. *Infection* 14:212–215
117. Russell AD, Day MJ (1993) Antibacterial activity of chlorhexidine. *J Hosp Infect* 25:229–238
118. Rykke M, Sönju T (1991) Amino acid composition of acquired enamel pellicle collected in vivo after 2 hours and after 24 hours. *Eur J Oral Sci* 99:463–469
119. Sakanaka S, Kim M, Taniguchi M, Yamamoto T (1989) Antibacterial Substances in Japanese Green Tea Extract Against *Streptococcus Mutans*, a Cariogenic Bacterium. *Agric Biol Chem* 53:2307–2311
120. Samprasit W, Kaomongkolgit R, Sukma M, Rojanarata T, Ngawhirunpat T, Opanasopit P (2015) Mucoadhesive electrospun chitosan-based nanofibre mats for dental caries prevention. *Carbohydr Polym* 117:933–940
121. Sbordone L, Bortolaia C (2003) Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig* 7:181–188

122. Scannapieco FA (1994) Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit Rev Oral Biol Med* 5:203–248
123. Schilke R, Lisson JA, Bauß O, Geurtsen W (2000) Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol* 45:355–361
124. Shaker LA, Furr JR (1986) Aspects of the action of chlorhexidine on bacterial spores. *Int J Pharm* 34:51–56
125. Shani S, Friedman M, Steinberg D (2000) The anticariogenic effect of amine fluorides on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase in biofilms. *Caries Res* 34:260–267
126. Siegrist BE, Brex MC, Gusberti FA, Joss A, Lang NP (1991) In vivo early human dental plaque formation on different supporting substances. A scanning electron microscopic and bacteriological study. *Clin Oral Implants Res* 2:38–46
127. Soares S, Vitorino R, Osório H, Fernandes A, Venâncio A, Mateus N, Amado F, De Freitas V (2011) Reactivity of human salivary proteins families toward food polyphenols. *J Agric Food Chem* 59:5535–5547
128. Stewart PS, Costerton JW (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358:135–138
129. Storhaug K (1977) Hixitane in oral disease in handicapped patients. *J Clin Periodontol* 4:102–107
130. Strålfors A (1967) Effect on hamster caries by purine derivatives vanillin and some tannin-containing materials caries in relation to food consumption and animal growth. *Arch Oral Biol* 12:321–332
131. Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D (1992) Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnol* 6:257–272
132. Swallow JN, Davies DE, Hawkins SD (1969) Gingival disease prevalence in mentally handicapped adults. The effects of an oral hygiene programme. *Br Dent J* 127:376–379

133. Takahashi N, Nyvad B (2008) Caries ecology revisited: Microbial dynamics and the caries process. *Caries Res* 42:409–418
134. Takahashi N, Nyvad B (2016) Ecological Hypothesis of Dentin and Root Caries. *Caries Res* 50:422–431
135. Tarsi R, Muzzarelli RAA, Guzmàn CA, Pruzzo C (1997) Inhibition of *Streptococcus mutans* adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosans. *J Dent Res* 76:665–672
136. Tawakoli PN, Al-Ahmad A, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C (2013) Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clin Oral Investig* 17:841–850
137. Ten Cate JM, Marsh PD (1994) Procedures for Establishing Efficacy of Antimicrobial Agents for Chemotherapeutic Caries Prevention. *J Dent Res* 73:695–703
138. Teruel J de D, Alcolea A, Hernández A, Ruiz AJO (2015) Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Arch Oral Biol* 60:768–775
139. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M (2006) Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res* 17:68–81
140. Tharanathan RN, Kittur FS (2003) Chitin - The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Crit Rev Food Sci Nutr* 43:61–87
141. Torricelli R, WUTHRICH B (1996) Anaphylaktischer Schock bei epikutaner Applikation von Chlorhexidin. *Allergologie* 19:512–514
142. Trautmann S, Künzel N, Fecher-Trost C, Barghash A, Schalkowsky P, Dudek J, Delius J, Helms V, Hannig M (2020) Deep Proteomic Insights into the Individual Short-Term Pellicle Formation on Enamel—An In Situ Pilot Study. *PROTEOMICS – Clin Appl* 14:1900090
143. Tschoppe P, Zandim DL, Martus P, Kielbassa AM (2011) Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *J Dent* 39:430–437

144. Uraz A, Boynueğri D, Özcan G, Karaduman B, Uç D, Şenel S, Pehlivan S, Öğüs E, Sultan N (2012) Two percent chitosan mouthwash: A microbiological and clinical comparative study. *J Dent Sci* 7:342–349
145. Vacca Smith AM, Bowen WH (2000) In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Arch Oral Biol* 45:277–291
146. Van Strydonck DAC, Timmerman MF, Van der Velden U, Van der Weijden F (2008) Clinical efficacy of a chlorhexidine-delivering toothbrush. *J Clin Periodontol* 35:584–590
147. Van Strydonck DAC, Slot DE, Van der Velden U, Van der Weijden F (2012) Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. *J Clin Periodontol* 39:1042–1055
148. Vassilakos N, Arnebrant T, Rundegren J, Glantz PO (1992) In vitro interactions of anionic and cationic surfactants with salivary fractions on well-defined solid surfaces. *Acta Odontol Scand* 50:179–188
149. Vitkov L, Hannig M, Nekrashevych Y, Krautgartner WD (2004) Supramolecular pellicle precursors. *Eur J Oral Sci* 112:320–325
150. Wegehaupt F, Gries D, Wiegand A, Attin T (2008) Is bovine dentine an appropriate substitute for human dentine in erosion/abrasion tests? *J Oral Rehabil* 35:390–394
151. Weiger R, Netuschil L, Von Ohle C, Brex M (1995) Microbial vitality of supragingival dental plaque during initial stages of experimental gingivitis in humans. *J Periodontol Res* 30:204–209
152. Wilson M, Patel H, Noar JH (1998) Effect of Chlorhexidine on Multi-Species Biofilms. *Curr Microbiol* 36:13–18
153. Wu-Yuan CD, Chen CY, Wu RT (1988) Gallotannins Inhibit Growth, Water-insoluble Glucan Synthesis, and Aggregation of Mutans Streptococci. *J Dent Res* 67:51–55
154. Yao Y, Grogan J, Zehnder M, Lendenmann U, Nam B, Wu Z, Costello CE, Oppenheim FG (2001) Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. *Arch Oral Biol* 46:293–303

155. Yao Y, Berg EA, Costello CE, Troxler RF, Oppenheim FG (2003) Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. *J Biol Chem* 278:5300–5308
156. Yuan P, Shen X, Liu J, Hou Y, Zhu M, Huang J, Xu P (2012) Effects of Dentifrice Containing Hydroxyapatite on Dentinal Tubule Occlusion and Aqueous Hexavalent Chromium Cations Sorption: A Preliminary Study. *PLoS One* 7:e45283
157. Zahradnik RT, Propas D, Moreno EC (1977) Effect of fluoride topicals on enamel subsurface demineralization in vitro. *J Dent Res* 56:664–670

7 Publikation/ Danksagung

7.1 Publikation

Schestakow, A.; Guth, M.S.; Eisenmenger, T.A.; Hannig, M.: Evaluation of anti-biofilm activity of mouthrinses containing tannic acid or chitosan on dentin in situ. *Molecules* 26, 1351 (2021)

7.2 Danksagung

Für die wissenschaftliche Arbeit am Thema „Einfluss von experimentellen Mundspüllösungen auf die 48h- Biofilmbildung am Dentin in situ“ möchte ich mich ausdrücklich bei der Forschungsgruppe der Zahnerhaltung der Universität des Saarlandes bedanken. Vor allem gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Matthias Hannig, Direktor der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde für das Anvertrauen und fachliche Begleiten dieser Arbeit. Seine wertvolle Unterstützung hat maßgeblich zur Fertigstellung dieser Dissertation beigetragen. Frau PD Dr. Dudek und Frau Dr. Nazife Yazdani, sowie Norbert Pütz waren ständige Ansprechpartner und engagierte Unterweiser in der wissenschaftlichen Arbeitsmethodik. Ein herzlicher Dank gilt Herrn Bashar Reda für seine Einweisungen in Analyse-Softwares und zahlreiche hilfreiche Ratschläge. Bei Frau Neissius- Paul möchte ich mich für die Herstellung der Schienen bedanken. Außerdem bedanke ich mich bei allen Probanden für ihren freiwilligen, zugewandten Einsatz. Die Untersuchungen wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, SFB 1027) finanziell gefördert.

8 Anhang

8.1 Datenblätter

8.1.1 Kalident



KALIDENT-Calcium Hydroxyapatite

GENERAL DESCRIPTION

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

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

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

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


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

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



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

8.1.2 Tanninsäure



SIGMA-ALDRICH

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

Product Information

Tannic acid

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

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

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

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

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

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


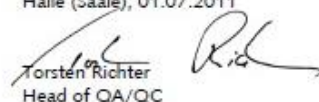
Precautions and Disclaimer
 For Laboratory Use Only. Not for drug, household or other uses.

Preparation Instructions
 This product is soluble in ethanol (100 mg/ml), yielding a clear, yellow to brown solution. This product is also soluble in water (2.8 g/ml), warm glycerol (1 mg/ml), and acetone.⁷ It is practically insoluble in benzene, chloroform, ether, petroleum ether, carbon disulfide, and carbon tetrachloride. Solutions should be sealed tightly and protected from light. Solutions will gradually darken on exposure to air and light.

References

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

8.1.3 Chitosan

		HEPPE MEDICAL CHITOSAN GmbH CEO: Dipl. Biotechnol. Katja Richter Heinrich-Damerow-Straße 1 D-06120 Halle (Saale) Tel: +49 (0) 345 27 996 300 Fax: +49 (0) 345 27 996 378 info@medical-chitosan.com www.medical-chitosan.com																														
Product Specification Sheet																																
Product line:		Chitoscience																														
Product: CAS: Product No.: Storage conditions: Shelf life: Valid from:	Chitosan 95/3000 9012-76-4 23711 < 25 °C, dry and well closed 36 months 01.07.2011																															
		HypoVereinsbank Halle (Saale) Account: 366 864 832 BLZ: 800 200 86 SWIFT: HYVE DE MM 440 IBAN: DE33 8002 0096 0366 8648 32 Volksbank Halle (Saale) eG Account: 0001 160 968 BLZ: 800 937 84 SWIFT: GENO DE F1 HAL IBAN: DE83 8009 3784 0001 1609 66 VAT ID: DE 249 728 608 Amtsgericht Stendal HRB 5561																														
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parameter</th> <th>Method</th> <th>Specification</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Appearance of solid product</td> <td>HMC QK-PA-0001</td> <td>white to light yellow</td> </tr> <tr> <td>Appearance of solution</td> <td>HMC QK-PA-0002</td> <td>clear, colorless to slightly yellowish</td> </tr> <tr> <td>Degree of deacetylation</td> <td>HMC QK-PA-0003</td> <td>≥ 92.6 %</td> </tr> <tr> <td>Viscosity (1 % in 1 % acetic acid, 20 °C)</td> <td>HMC QK-PA-0004</td> <td>2751 - 3250 mPas</td> </tr> <tr> <td>Ashes (sulphated)</td> <td>HMC QK-PA-0005</td> <td>≤ 1 %</td> </tr> <tr> <td>Dry matter content</td> <td>HMC QK-PA-0006</td> <td>≥ 85 %</td> </tr> <tr> <td>Heavy metals</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td> Hg</td> <td>HMC QK-PA-0020</td> <td>≤ 0.2 ppm</td> </tr> <tr> <td> Cd</td> <td>HMC QK-PA-0020</td> <td>≤ 0.5 ppm</td> </tr> </tbody> </table>	Parameter	Method	Specification	Appearance of solid product	HMC QK-PA-0001	white to light yellow	Appearance of solution	HMC QK-PA-0002	clear, colorless to slightly yellowish	Degree of deacetylation	HMC QK-PA-0003	≥ 92.6 %	Viscosity (1 % in 1 % acetic acid, 20 °C)	HMC QK-PA-0004	2751 - 3250 mPas	Ashes (sulphated)	HMC QK-PA-0005	≤ 1 %	Dry matter content	HMC QK-PA-0006	≥ 85 %	Heavy metals			Hg	HMC QK-PA-0020	≤ 0.2 ppm	Cd	HMC QK-PA-0020	≤ 0.5 ppm		
Parameter	Method	Specification																														
Appearance of solid product	HMC QK-PA-0001	white to light yellow																														
Appearance of solution	HMC QK-PA-0002	clear, colorless to slightly yellowish																														
Degree of deacetylation	HMC QK-PA-0003	≥ 92.6 %																														
Viscosity (1 % in 1 % acetic acid, 20 °C)	HMC QK-PA-0004	2751 - 3250 mPas																														
Ashes (sulphated)	HMC QK-PA-0005	≤ 1 %																														
Dry matter content	HMC QK-PA-0006	≥ 85 %																														
Heavy metals																																
Hg	HMC QK-PA-0020	≤ 0.2 ppm																														
Cd	HMC QK-PA-0020	≤ 0.5 ppm																														
Halle (Saale), 01.07.2011  Katja Richter Head of QA/QC																																
		Page: 1/1 Rev: 02																														

8.2 Datensätze der Ergebnisse

8.2.1 Bedeckung

	Spülprotokoll 1: Bedeckung				
	Wasser	Chitosan	Hydroxylapati	Tanninsäure	Chlorhexidin
Proband 1	5	4,29166667	4,79166667	4	2,54166667
Proband 2	4,3125	4,5	3,20833333	2,08333333	1,08333333
Proband 3	4,54166667	4,04166667	2,1375	1,54861111	3,5
Proband 4	4,83333333	4,16666667	4,375	2,75	1,95833333
Proband 5	4,91666667	4,91666667	3,91666667	4,20833333	1
Proband 6	5	3,94166667	4,04166667	2,16666667	1,20833333
Maximum	5	4,91666667	4,79166667	4,20833333	3,5
Minimum	4,3125	3,94166667	2,1375	1,54861111	1
Mittelwert	4,76736111	4,30972223	3,74513889	2,79282407	1,88194444
Standardabweichung	0,28025802	0,3557237	0,94677969	1,08685695	0,99282729
p-Wert Dunn		>0,9999	0,3313	0,0104	0,0007
	Spülprotokoll 2: Bedeckung				
	Wasser	Chitosan	Hydroxylapati	Tanninsäure	Chlorhexidin
Proband 1	5	4,70833333	4,79166667	3,70833333	1,25
Proband 2	5	4,625	4	4,54166667	1
Proband 3	4,58333333	4,66666667	3,95833333	3,33333333	1,70833333
Proband 4	4,95833333	4,04166667	4,33333333	4,04166667	1,45833333
Proband 5	4,95833333	4,625	4,58333333	4,70833333	1,20833333
Proband 6	2,45833333	3,81666667	4,275	2,41666667	1,55
Maximum	5	4,70833333	4,79166667	4,70833333	1,70833333
Minimum	2,45833333	3,81666667	3,95833333	2,41666667	1
Mittelwert	4,49305555	4,41388889	4,32361111	3,79166667	1,3625
Standardabweichung	1,00947479	0,38339371	0,32469715	0,84533031	0,25759302
p-Wert Dunn		>0,9999	0,805	0,1431	0,0005
p-Wert Wilcoxon	0,2813	0,3594	0,0625	0,0469	0,1563

8.2.2 Vitalität

	Spülprotokoll 1: Vitalität				
	Wasser	Chitosan	Hydroxlapati	Tanninsäure	Chlorhexidin
Proband 1	4,70833333	2,5	4,79166667	2,5	2,54166667
Proband 2	4,22916667	4,04166667	3,83333333	3,125	1,70833333
Proband 3	4,75	2,85416667	3,79583333	3,60694444	2
Proband 4	3,41666667	3,70833333	4,08333333	3,18333333	2
Proband 5	4,08333333	3,875	3,53333333	2,625	1,25
Proband 6	4,05	3,41666667	3,79166667	2,45833333	1,375
Maximum	4,75	4,04166667	4,79166667	3,60694444	2,54166667
Minimum	3,41666667	2,5	3,53333333	2,45833333	1,25
Mittelwert	4,20625	3,39930556	3,97152778	2,91643518	1,8125
Standardabweichung	0,49218722	0,60673544	0,43805454	0,46037962	0,47342576
p-Wert Dunn		0,3313	>0,9999	0,0325	0,0021
	Spülprotokoll 2: Vitalität				
	Wasser	Chitosan	Hydroxlapati	Tanninsäure	Chlorhexidin
Proband 1	4,5	4,20833333	4,375	3,41666667	3,0625
Proband 2	4,66666667	4,29166667	4,61666667	3,70833333	1,5
Proband 3	4,22916667	3,5	3	3,33333333	2,45833333
Proband 4	5	4,04166667	4,33333333	3,33333333	2,125
Proband 5	4,475	3,83333333	4	3,20833333	1,31666667
Proband 6	3,33333333	4,11666667	4,59166667	3,56666667	2,74166667
Maximum	5	4,29166667	4,61666667	3,70833333	3,0625
Minimum	3,33333333	3,5	3	3,20833333	1,31666667
Mittelwert	4,36736111	3,99861111	4,15277778	3,42777778	2,20069445
Standardabweichung	0,56697551	0,29037412	0,60696574	0,18117415	0,68991956
p-Wert Dunn		0,805	>0,9999	0,0705	0,0005
p-Wert Wilcoxon	0,5	0,0313	0,2813	0,0469	0,0781

9 Lebenslauf