

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde,

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. M. Hannig

# **Der Einfluss von Naturextrakten und Lysozym auf die Entwicklung des oralen Biofilms**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde*

**der Medizinischen Fakultät**

**der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2021

vorgelegt von:

Isabelle Charlotte Krehbiel

geb. am: 15.01.1988

Tag der Promotion: 14.10.2021

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Hannig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Flockerzi

*Meinem lieben Patenonkel Andreas gewidmet*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Deutsche Zusammenfassung.....	1
1.2	Abstract.....	2
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
2.1	Einführung in die untersuchte Thematik .....	3
2.2	Ziel der Arbeit.....	5
<b>3</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>7</b>
3.1	Der Biofilm.....	7
3.2	Mundspüllösungen.....	10
3.3	Hopfen (Humulus Lupulus).....	12
3.4	Ölsäure .....	17
3.5	Lysozym.....	19
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODE .....</b>	<b>22</b>
4.1	Versuchsplan.....	22
4.2	Spüllösungen.....	24
4.2.1	Experimentelles Hopfenextrakt .....	24
4.2.2	Ölsäure .....	24
4.2.3	Lysozym.....	24
4.3	Probanden .....	25
4.4	Prüfkörper .....	25

4.5	Orale Exposition .....	28
4.6	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Prüfkörper (FM/LDS).....	30
4.6.1	Bildanalyse/ Messung der Ausdehnung des Biofilms und der Vitalität vorhandener Bakterien .....	31
4.7	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Prüfkörper (REM).....	32
4.7.1	Scoring und Auswertung der REM- Bilder .....	34
4.8	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Prüfkörper (TEM) ....	35
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>38</b>
5.1	Fluoreszenzmikroskopie .....	38
5.1.1	Biofilmbildung auf Schmelz .....	38
5.1.2	Tabellarische Übersicht LD- Bilder Schmelz .....	46
5.1.3	Auswertung der Biofilmbildung auf Schmelz .....	49
5.1.4	Biofilmbildung auf Dentin .....	50
5.1.5	Tabellarische Übersicht der LD- Bilder Dentin.....	58
5.1.6	Auswertung Biofilmbildung Dentin .....	61
5.1.7	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	62
5.2	Rasterelektronenmikroskopie .....	63
5.2.1	Biofilmbildung auf Schmelz .....	64
5.2.2	Tabellarische Übersicht der REM- Bilder von Schmelz.....	68
5.2.3	Biofilmbildung auf Dentin.....	71
5.2.4	Tabellarische Übersicht der REM- Bilder von Dentin.....	75
5.2.5	Auswertung Biofilmbildung auf Schmelz und Dentin.....	78
5.2.6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	79
5.3	Transmissionselektronenmikroskopie .....	80
5.3.1	Biofilmbildung auf Schmelz .....	80

5.3.2	Biofilmbildung auf Dentin.....	93
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>107</b>
6.1	Diskussion Material und Methode.....	107
6.1.1	Studiendesign und Fragestellung.....	107
6.1.2	Biofilmgewinnung und Spüllösungen.....	108
6.1.3	Prüfkörperherstellung und Prüfkörperbearbeitung.....	111
6.1.4	Auswahl der Probanden/ Versuchsbedingungen .....	112
6.1.5	Biofilmuntersuchung.....	113
6.2	Diskussion der Ergebnisse.....	117
6.2.1	Fluoreszenzmikroskopie .....	117
6.2.2	Rasterelektronenmikroskopie .....	123
6.2.3	Transmissionselektronenmikroskopie.....	125
6.2.4	Schlussfolgerungen .....	129
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>130</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>140</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>141</b>

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Deutsche Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, natürliche Extrakte (Hopfen, Ölsäure) und Lysozym in Form von Mundspüllösungen im Rahmen einer in-situ-Studie zu testen. Es wurden ein Hopfenextrakt (Flavopura), ein Ölsäurederivat und Lysozym (in einer Konzentration von 1,4 mg/ml) getestet. Die Biofilmbildung erfolgte in-situ auf bovinen Schmelz- und Dentinprüfkörpern, welche an Oberkiefertiefziehschienen befestigt wurden. Diese Schienen wurden von drei Probanden jeweils für 48 h getragen. Direkt 3 min nach Insertion der Schiene und anschließend alle sechs Stunden, wurde der Mund für 30 s mit der jeweiligen Testsubstanz gespült. Eine Spülung mit Wasser diente als Referenz bei gleichem Versuchsaufbau. Es wurden die bakterielle Kolonisation und die Vitalität des vorhandenen Biofilms im Rahmen einer transmissionselektronenmikroskopischen- (TEM), einer rasterelektronenmikroskopischen- (REM) und einer fluoreszenzmikroskopischen- (LDS/FM) Untersuchung analysiert.

Mit allen Untersuchungsmethoden konnte eine starke Wirkung von Hopfen demonstriert werden. Die Auswertung der Dicke des Biofilms, des Verhältnisses lebender zu toter Bakterien und des Ausmaßes der bakteriellen Besiedlung zeigten eine Reduktion bakteriellen Biofilms und eine Abnahme des vitalen Anteils der vorhandenen Bakterien. Nach der Spülung mit Ölsäure zeigte sich eine klare Verschiebung hin zu toten Bakterien im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie, während die Dicke und die Biofilmbedeckung der Prüfkörper ähnlich derer der Kontrolle waren. Im Rahmen der Spülung mit Lysozym konnten bei vorliegender Konzentration und Spüldauer keine nennenswerte Reduktion des Biofilms oder Abnahme der Vitalität in bestehendem Biofilm detektiert werden. Die Ergebnisse aller angewandten Analyseverfahren zeigten keine signifikanten Veränderungen zu den Kontrollprüfkörpern. Im Gegensatz zu Ölsäure und Lysozym zeigt Hopfen als Spüllösung eine Wirksamkeit gegen oralen Biofilm und könnte somit eine vielversprechende Substanz in der Erforschung und Entwicklung neuer pflanzlicher Produkte für das Biofilm- Management darstellen.

## 1.2 Abstract

The aim of the study was to test natural extracts (hops, oleic acid) and lysozyme as mouth rinsing solutions for their influence on the development of oral biofilm and the vitality of existent oral bacteria in situ. Hops extract, oleic acid and lysozyme in a concentration of 1.4 mg/ml were tested. Biofilm was generated in situ on bovine enamel and dentin specimens fixed on upper jaw acrylic splints and worn for 48 hours by three subjects. The mouth was rinsed for 30 s using the particular test substance three minutes after splint insertion and again every six hours. A water control served as reference with an identical test set-up. Bacterial colonization and vitality of the biofilms were analyzed using transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM) and fluorescence microscopy with LIVE/DEAD staining (LDS/FM) respectively.

A strong effect of hops extract was demonstrated with all analytical methods used. The evaluation of the thickness of the biofilm, the proportion of dead to living bacteria and the extent of bacterial colonization showed an effective reduction of the intact bacterial biofilm. For oleic acid, a clear shift towards dead bacteria was determined via LDS/FM, whereas the biofilm thickness and the bacterial morphology were similar to those of the control. In case of lysozyme, no effects were detectable as none of the used methods showed any significant changes when compared to the control. In contrast to oleic acid and lysozyme, hops extract possesses activity against dental biofilm and might be a promising agent for the development of new, plant-based products for biofilm- management.

## 2 Einleitung

### 2.1 Einführung in die untersuchte Thematik

Karies und Parodontopathien gehören zu den häufigsten und am weitesten verbreiteten chronischen Erkrankungen der Welt [26,87,96]. Zahlreiche Menschen leiden unter den Folgen dieser, durch bakteriellen Biofilm verursachten, Erkrankungen. Laut der aktuellsten, fünften Mundgesundheitsstudie ist mindestens jeder zweite Erwachsene in Deutschland parodontal erkrankt [18]. Durch parodontale Erkrankungen kommt es zu einer progredienten Zerstörung des Zahnhalteapparates, welche bei ausbleibender Therapie final im Zahnverlust münden kann. Auch die Versorgung kariesbedingter Kavitäten stellt trotz sinkender Prävalenz in Deutschland noch eine der Hauptaufgaben des Zahnarztes dar. Laut DMS V weisen im Vergleich zum Jahr 1997 Erwachsene heute fast fünf Zähne weniger mit Karieserfahrung auf. Diese Entwicklung ist darauf zurückzuführen, dass im Rahmen dieser Studie die erste Erwachsenenkohorte in einer deutschen Mundgesundheitsstudie untersucht wurde, die bereits in ihrer Kindheit und Jugend von Individual- und Gruppenprophylaxe profitiert hat. Eines der Ziele individual- und gruppenprophylaktischer Maßnahmen ist es, der Bevölkerung ein Bewusstsein über effektives Mundhygieneverhalten zu vermitteln. Im Fokus steht hierbei insbesondere die Bekämpfung des Biofilms, denn Karies stellt eine multifaktorielle Krankheit dar [12]. Neben den Faktoren Wirt, Substrat und Zeit setzt die Entstehung von Karies die Anwesenheit eines Biofilms, also einer Agglomeration von Bakterien, eingebettet in eine Matrix aus Polysacchariden, voraus [5,13,122]. Nur im Falle eines simultanen Auftretens aller oben genannten Kausalfaktoren besteht die Möglichkeit, dass sich eine kariöse Läsion entwickeln kann. Inhalte der Kariesprävention sind somit neben der Intention die mechanische Reinigung der Zähne zu optimieren, auch die Zuhilfenahme antibakteriell wirkender Stoffe zum Biofilmmanagement. Hierfür steht eine Vielzahl verschiedener Produkte zur Verfügung. Abgesehen von unterschiedlichen Anwendungsgebieten und Konsistenzen (Zahnpasten, Mundspüllösungen, Kaugummis etc.) unterscheiden sich die auf dem Markt erhältlichen Produkte auch bezüglich ihrer Inhaltsstoffe.

Während chemisch basierte Mundspüllösungen, wie etwa Chlorhexidindigluconat, aufgrund ihrer nachgewiesenen, antibakteriellen Wirkung schon lange eine große Bedeutung im klinischen Alltag besitzen, erlangen auch Produkte auf natürlicher Basis zunehmende Beachtung [86,88].

Die Entwicklung neuer natürlicher antimikrobieller Therapeutika und die intensive Forschung im Gebiet alternativmedizinischer Pharmaka resultiert vor allem auch aus der wachsenden Resistenzproblematik herkömmlicher Antibiotika [2,49,71]. In der modernen Pflanzenheilkunde wird einigen botanischen Wirkstoffen teilweise eine bakterielle Wirksamkeit zugesprochen. Die Suche nach neuen pharmazeutischen Wirkstoffen orientiert sich aber auch an historisch übermittelten Methoden. So wird neben der reinen Kultivierung von Pflanzen auch die systemische oder topische Anwendung selbiger als Phytopharmaka seit Jahrhunderten beschrieben. Der Dichter und Botaniker Walahfrid Strabo von Reichenau (808 bis 849 n. Chr.) beschrieb in seinem frühmittelalterlichen Werk *Liber de cultura hortorum* die Wirkung der Heilpflanzen des Klostersgartens von Reichenau [14]. So sollte beispielsweise ein Gemisch aus Gartenkerbel, Minze und Papaver (Mohn) als direkter Umschlag bei starken Bauchschmerzen Linderung verschaffen [14]. Ebenso wurden schon früh Kräuter in reiner Form zur Bekämpfung bakterieller Infekte genutzt. Angelika Prentner beschreibt in ihrem Buch „Heilpflanzen der Traditionellen Europäischen Medizin“, dass die Verwendung von Hopfen eine sehr lange Geschichte in Europa aufweisen kann [89]. Nicht nur aufgrund seiner beruhigenden und schlaffördernden Eigenschaften als mildes Sedativum erfreute sich der Hopfen schon früh regen Interesses [89,64,65,70]. Auch wurde die nützliche Verwendung bei Rheuma und Schmerzzuständen beschrieben [119]. Angesichts dieser vielseitigen, allgemeingesundheitsfördernden Eigenschaften ist die Anwendung von Naturextrakten auch im Bereich der Behandlung und Prävention oraler Erkrankungen zu berücksichtigen. Ein möglicherweise positiver Einfluss des Hopfens auf die orale Gesundheit ist unter anderem Gegenstand der vorliegenden Studie.

Neben der direkten Verwendung der Pflanzen wurde auch der Gebrauch der aus den Pflanzen gewonnenen Sekundärprodukte beschrieben. Ein Beispiel hierfür ist das in Indien praktizierte „Ölziehen (Gandusha)“ als alternativmedizinische, ayurvedische Methode „zur Entgiftung der Mundhöhle“ [4]. Ca. 1700 v. Chr. wurden im Rahmen des Gesetzes des Hammurabi heilende Maßnahmen beschrieben, wie etwa die Anwendung eines in Sesamöl getränkten Wundverbandes, dem eine (nach heutiger Definition) antibakterielle Wirkung zugesprochen wurde.

Eine Vielzahl solcher Beispiele sind in der Literatur zu finden und bieten die Grundlage der modernen Phytopharmakaforschung. So soll im Rahmen dieser Arbeit auch eine organische, ölbasierte Lösung untersucht werden.

Neben der Testung botanischer oder chemischer Wirkstoffe stellt die Verwendung bzw. Konzentration körpereigener, antibakterieller Substanzen ein weiteres Feld der Arzneimittelentwicklung zur oralen Biofilmbekämpfung dar [88]. Schon früh gelangte so auch der menschliche Speichel in den Fokus der Forschung. So haben bereits Dold, Lächele und Du Hsing 1936 wie folgt ausgeführt:

„Die immer wieder überraschende Tatsache, daß beim gesunden Menschen (und Tier) in Körperhöhlen, die dauernd in inniger Berührung mit der Außenwelt stehen, z. B. in der Mundhöhle, die dorthin gelangten Keime nicht hemmungslos wuchern, obgleich alle Vorbedingungen dafür vorhanden zu sein scheinen, und die damit zusammenhängende andere Tatsache, daß auch Wunden im Bereich der Mundhöhle in der Regel glatt heilen, obwohl hier nicht nach den Grundsätzen der Antisepsis und Asepsis verfahren werden kann, hat schon viele veranlaßt, nach den Ursachen dieser Erscheinung zu forschen.“ [23]

In der vorliegenden Studie wurde daher auch das im Speichel vorhandene Enzym Lysozym einbezogen, das sich durch eine antibakterielle Wirkung gegen grampositive Bakterien auszeichnet [33,83].

## 2.2 Ziel der Arbeit

Mundspüllösungen dienen als ein sehr gut geeignetes Additivum zur herkömmlichen, mechanischen Reinigung der Zähne. Denn aus epidemiologischen Daten kann auch abgelesen werden, dass mit mechanischen Hygienemaßnahmen häufig nicht das Niveau erreicht werden kann, dessen es bedarf, um parodontale Erkrankungen zu vermeiden [108]. Gerade aufgrund des demografischen Wandels unserer Gesellschaft und der daraus resultierenden Zunahme hochbetagter Menschen besteht ein Interesse, Möglichkeiten einer effizienten Bakterienreduktion zu entwickeln, die unabhängig von der manuellen Geschicklichkeit des Patienten funktionieren.

Während im Jahr 2013 noch etwa 4,4 Mio. 80-Jährige und Ältere in Deutschland lebten, was einem Anteil von 5,4 % der Bevölkerung entsprach, so steigt diese Zahl kontinuierlich und soll nach Angaben des Statistischen Bundesamtes mit über 10 Mio. im Jahr 2050 den höchsten Wert erreichen [123]. Es ist also damit zu rechnen, dass in etwa 50 Jahren rund 13 % der Bevölkerung achtzig Jahre oder älter sein werden. In logischer Konsequenz wird sich hierdurch auch die Zahl der pflegebedürftigen Menschen drastisch erhöhen. Prognosen des Bundesministeriums für Gesundheit schätzen, dass im Jahr 2050 etwa 4,2 Mio. Menschen als pflegebedürftig einzustufen sein werden [85]. Zusätzlich zu diesem Aspekt verschärft ein weiterer Faktor die wachsende Problematik altersgerechter Zahnpflege. Laut DMS V hat sich die Gruppe der Senioren mit völliger Zahnlosigkeit seit 1997 halbiert. Zusammengefasst bedeutet dies, dass es immer mehr pflegebedürftige Menschen mit immer mehr eigenen Zähnen geben wird, die häufig nicht in der Lage sein werden eine ausreichende manuelle, mechanische Reinigung der Zähne zu bewerkstelligen. Besonders in diesen Fällen sollte ergänzend eine chemische Plaquekontrolle erfolgen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Naturextrakte in Form von Mundspüllösungen im Rahmen einer In-situ-Studie auf ihre biofilmverändernde Wirkung, insbesondere im Hinblick auf ihre Einflussnahme auf den oralen Biofilm, zu untersuchen und zu bewerten. Konkret wurde daher der Einfluss dieser natürlichen Agenzien auf die Entstehung und Entwicklung des oralen Biofilms und auf die Vitalität der darin befindlichen Bakterien untersucht. Es sollte somit die bakterielle Wirksamkeit dieser Mundspüllösung im Rahmen des Biofilmmanagements detektiert werden. Durch die Erschließung neuer bio-inspirierter Substanzen und Möglichkeiten der Reduktion bzw. Veränderung pathogenen, strukturierten Biofilms erhofft man sich in Zukunft eine sinkende Zahl der dadurch bedingten oralen Komplikationen [66]. Somit stellt die Biofilmforschung im Rahmen des Biofilmmanagements eine wichtige Säule in der Kariesprävention dar.

Die im Rahmen dieser Untersuchung getesteten Substanzen waren eine experimentelle Lysozymmundspüllösung (1,4 mg/ml Lysozypulver, gelöst in sterilem Wasser), ein experimentelles Hopfenextrakt (Flavopura) und eine pharmazeutisch gereinigte Ölsäure.

## 3 Literaturübersicht

### 3.1 Der Biofilm

Der direkte Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein bakteriellen Biofilms und der Entstehung von Karies und Parodontopathien in der Mundhöhle wurde in zahlreichen Studien belegt und wird häufig in der Literatur beschrieben [5,19,75,80,93,122]. Insbesondere die spezifische Zusammensetzung dentaler Plaque hat einen Einfluss auf die Pathogenität des Biofilms [13,80,93]. Daher ist es von großer Bedeutung für das Biofilmmangement, die Entstehung, Struktur und Pathogenität des oralen Biofilms zu verstehen.

Zunächst kommt es innerhalb weniger Sekunden nach der Zahnreinigung zur Entstehung eines wenige Nanometern dicken, weitgehend bakterienfreien, erworbenen Schmelzoberhäutchens, der sog. Pellikel [35,46,115]. Angesichts der Tatsache, dass, im Gegensatz zu anderen Oberflächen des menschlichen Organismus, auf der Zahnoberfläche keine Abschilferung oder Regeneration stattfindet, kommt diesem initialen Biofilm eine besondere physiologische und pathophysiologische Bedeutung zu [48,79]. Die Pellikel bietet die Grundvoraussetzung für die Entstehung des oralen Biofilms [46,48,115], da sie Proteine besitzt, die als Rezeptoren für die bakterielle Adhärenz agieren. Des Weiteren stellt sie als semipermeable Membran einen Schutz für den Zahnschmelz dar [46,48,115]. Sie besteht aus einer bestimmten Fraktion von Speichelproteinen, die sich auf der Zahnoberfläche adsorbiert werden und ihre initiale Dicke beträgt zwischen 10 und 20 nm [46,115]. Zunächst interagieren bestimmte im Speichel vorhandene Proteine, sogenannte Speichelpräkursoren, mit ihren positiv geladenen Gruppen mit den Phosphationen der Zahnoberfläche [46]. Die negative Ladung der Zahnoberfläche beruht auf der Tatsache, dass die Calciumionen der Zahnhartsubstanz im direkten Kontakt mit einer Elektrolytlösung (in diesem Fall dem Speichel) eine größere Tendenz haben in Lösung zu gehen als Phosphationen. Diese auf der Zahnoberfläche verbliebenen Phosphationen führen schließlich zu einer negativen Ladung der Oberfläche [46].

Zusätzlich zu den ionischen Verbindungen scheinen auch noch andere Anziehungskräfte sowie Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen eine Rolle bei der Entstehung der Pellikel zu spielen [46]. Beispiele für Proteine mit einer hohen Affinität für Hydroxylapatit sind Statherin, Histatine und Prolinreiche Proteine [46,115].

Auf diesen ersten schnellen Schritt der Proteinadsorption folgt schließlich eine vergleichsweise langsamere Phase des Proteinniederschlags auf die bereits mit Proteinen bedeckte Zahnschmelzoberfläche. Diese Phase ist gekennzeichnet durch Interaktionen bereits adsorbierter, dem Schmelz aufsitzender und dadurch fixierter Proteine sowie Proteinaggregaten und Biopolymeren aus dem Speichel [46]. Die Pellikel zeigt initial (nach etwa 2-3 Minuten) eine Dicke von 10-20 nm, welche nun über etwa 30 Minuten weitgehend konstant bleibt. Daraufhin erfolgt ein Wachstum bis um das Dreifache der initialen Dicke, bis schließlich nach 30- 90 Minuten ein Plateau erreicht wird [46]. Innerhalb einer Stunde kann die Pellikel eine Dicke von 100-1000 nm erreichen, abhängig von der Verfügbarkeit der Speichelbiopolymere und den intraoralen Bedingungen [46]. Die Schnelligkeit dieses Wachstums legt die Vermutung nahe, dass die Adsorption von Biopolymeren eher noch als die Adsorption von einzelnen Proteinen für die rasche Zunahme der Pellikeldicke verantwortlich ist.

Nach dieser Formation der Pellikel kommt es erst sekundär zur bakteriellen Besiedlung der Zahnoberfläche [48]. Das nächste Stadium der Biofilmbildung zeigt eine Phase unspezifischer, reversibler Interaktion zwischen Speichelbakterien und dem erworbenen Schmelzoberhäutchen [79,115]. Die Bindung der Bakterien an die Pellikel kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Neben Proteinen, Glycoproteinen, Lipiden und Glycolipiden aus dem Speichel findet man auch extrazelluläre Bakterienmoleküle in der Pellikel, wie etwa Glycosyltransferase und Glukane [79]. Diese absorbierten Moleküle können als Rezeptoren oder Adhäsine für die Bindung der oralen Bakterien agieren [79]. Diese erste, reversible Phase der Bakterienadhäsion scheint eher zufällig und beruht auf physikalisch-chemischen Kräften [48,79,80]. Schließlich kommt es innerhalb von Minuten zur Bindung der sogenannten Primärkolonisierer. In dieser Phase dominieren Streptokokken [1,115] wie *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis* und *Streptococcus mitis* [115]. Man geht davon aus, dass diese Gruppe etwa 80 % der initialen Kolonisierer ausmacht [46]. Die Kolonisation mit der Primärflora erfolgt über Fimbrien, die den Bakterien als Anheftungsstrukturen dienen und es ihnen ermöglichen, eine irreversible Verbindung mit der Pellikel einzugehen [48,79].

Dieser rezeptorvermittelte Verbund entsteht über Adhäsine [48,80] an der Bakterienoberfläche. Nach der primären Bindung schreitet die Ausbildung des Biofilms mit der Anlagerung weiterer Bakterien an die Pionierkeime weiter voran. Entscheidend für die Entwicklung und das Wachstum des Biofilms ist die Zell-zu-Zell-Kommunikation. Die Mechanismen der Kommunikation von Bakterien im oralen Biofilm beruhen auf physikalischen Interaktionen, genetischem Austausch und diffusionsfähigen Signalen [31]. Zwei verschiedene Formen physikalischer Interaktion dominieren hierbei: Koaggregation und Koadhesion. Während Koaggregation die Bindung zweier Zellen im planktonischen Zustand beschreibt, steht Koadhesion für die Verbindung einer planktonischen Zelle mit einer bereits an der Oberfläche haftenden Zelle [31,66]. Die Fähigkeit der Bakterien mit anderen Bakterien zu interagieren, insbesondere jener Bakterien, die bereits an der Oberfläche anheften stellt einen wesentlichen Aspekt der intraoralen Biofilmbildung und Reifung dar [79]. So wird aus planktonischen, also in Flüssigkeit schwimmenden Bakterien ein Bakterienverbund. Eben diese in einem Biofilm eingebundenen Bakterien zeigen ein anderes Verhalten gegenüber bakteriellen Agenzien als jene der gleichen Spezies [2,5] in wässriger Suspension. Sie zeigen eine bis zu 1000-fach erhöhte Resistenz gegen antibakterielle Agenzien und die Immunreaktion des Wirtes [66]. Biofilme haben einen Phänotyp, der antimikrobielle Substanzen, Stress und die körpereigene Immunabwehr weitreichender toleriert als die planktonischen Kulturen der gleichen Bakterien [81,115,116].

Ein weiterer Aspekt der Biofilmbildung ist die bakterielle Produktion von extrazellulären Polysacchariden (EPS) aus Saccharose [79]. Diese bilden die Matrix, in die die Bakterien eingebettet sind, und können zwischen 10 % und 20 % des Trockengewichtes dentaler Plaque ausmachen [79]. Diese extrazelluläre polymere Matrix wird zu großen Teilen von den Bakterien selbst synthetisiert und enthält bakterielle DNA, Proteine, Glycolipide und Polysaccharide [115]. Während Forscher zunächst davon ausgingen, dass EPS nur im initialen Anheftungsprozess eine tragende Rolle spielen, ist heute klar, dass ihnen, auch wenn einige EPS in der Tat mit der Pellicel interagieren, weitere wichtige Aufgaben zukommen. So beeinflussen EPS die strukturelle Integrität und haben Einfluss auf die Pathogenität des Biofilms [20,30,79] und die Resistenz der Bakterien gegen antimikrobielle Agenzien [2]. Beispiel hierfür ist die Fähigkeit der EPS die Kariogenität an der Schmelzoberfläche zu erhöhen.

Dieses Phänomen beruht auf der Tatsache, dass EPS es Zuckermolekülen ermöglichen tiefer in die Plaque einzudringen. Da auch der Puffereffekt auf Bakterien vermindert ist, kommt es so zu einem massiveren pH-Wertabfall am Grenzbereich von Plaque und Schmelzoberfläche [79]. Andererseits können aufgrund dicht gepackter EPS-Strukturen antibakterielle Agenzien weniger tief in die Plaque penetrieren [20,122]. Die Einbettung der Bakterien in eine Umgebung aus EPS gewährleistet ebenfalls einen Austausch genetischer Materialien zwischen den Zellen [20]. Andererseits ist die Zusammensetzung der Matrix nicht unwesentlich beeinflusst durch lokale Umweltfaktoren [13]. Ebenso wie die Bakterien an sich, kann die extrazelluläre Matrix mit Hilfe antibakterieller Agenzien zumindest oberflächlich erfasst und verändert werden.

### 3.2 Mundspüllösungen

Mundspüllösungen und medizinische Mundwässer werden schon viele Jahre als Additivum zur herkömmlichen täglichen Zahnpflege genutzt. Die Entfernung des Biofilms durch die alleinige Verwendung wässriger Präparate ist nicht möglich, jedoch wurde eine ganze Reihe von Produkten entwickelt, die in der Lage sind als Vehikel für antimikrobielle Substanzen die Zahnhygiene sinnvoll zu unterstützen [5]. So soll beispielsweise der nach dem Zähneputzen vorhandene Restbiofilm durch chemische Substanzen inaktiviert werden. Das Spektrum der erhältlichen Mundwässer ist groß und erstreckt sich von den rein atemerfrischenden Mundwässern über kariesverhütende und zahnfleischpflegenden Mundspülungen. Sie alle vereinen eine leichte Anwendbarkeit seitens des Patienten mit der konsistenzbedingt guten Verteilung in der Mundhöhle, die ein Erschließen des Großteils der Zahnoberflächen ermöglicht. Neben den Zahnhartsubstanzen ist es somit auch möglich durch Mundspüllösungen das umliegende Weichgewebe und die Zunge mit zu behandeln. Oral wirksame Lösungen können entweder die Plaqueentstehung oder die Plaquereifung hemmen. Elementar hierfür ist die Verwendung von Stoffen mit gezielter, antimikrobieller Wirkung, die jedoch keine lokalen oder systemischen Nebenwirkungen aufweisen. Auch sollte das Allergisierungspotential und die Gefahr der Resistenzbildung gering sein.

Es gibt Substanzen mit einer direkten bakteriziden Wirkung, die die Bakterienanzahl der bestehenden Plaque minimieren. Hierbei ist zu beachten, dass das ökologische Gleichgewicht der Mundflora nicht zerstört werden darf, weil daraus beispielsweise eine Überwucherung der in der Mundhöhle vorhandenen Pilzsporen resultieren könnte [81]. Es handelt sich um Substanzen, die derart in den Bakterienstoffwechsel eingreifen, dass sie die Akkumulation und Reifung des Biofilms verzögern oder hemmen. Von ihnen abzugrenzen sind Substanzen, die die Entstehung des Biofilms hemmen. Sie können entweder direkt am Zahnschmelz angreifen und seine Anfälligkeit für die Pellikelbildung herabsetzen, oder sie interagieren direkt mit der vorhandenen Pellikel und verändern sie.

Ein weiterer Aspekt in der Bewertung von Mundspüllösungen ist ihre Substantivität. Unter Substantivität eines Arzneimittels versteht man sein Vermögen auch nach der direkten Anwendung ausreichend lange und in ausreichend hoher Konzentration am Wirkort verfügbar zu sein. So besitzt das im klinischen Alltag hochfrequentiert benutzte antibakterielle Chlorhexidingluconat eine hohe Substantivität, indem es elektrostatisch an die negativ geladene Oberfläche von Zähnen, Gingiva und Mukosa sowie an der Plaque selbst adsorbiert und nachfolgend langsam wieder freigesetzt wird.

### 3.3 Hopfen (*Humulus Lupulus*)



**Abb. 1: *Humulus Lupulus***

Der echte Hopfen *Humulus Lupulus* (Abb.1) ist eine Pflanzenart der Gattung Hopfen und gehört zu der Familie der Hanfgewächse (*Cannabaceae*). In Anlehnung an die charakteristische Eigenschaft des Hopfens, um andere Pflanzen herum zu wachsen wie ein Wolf das Beuteschaf umklammert, erhielt er seinen Namen vom Lateinischen „Lupus= Wolf“.

98 % des weltweiten Hopfenverbrauchs lassen sich auf die Bierbrauindustrie zurückführen [119]. Während er dort zunächst aufgrund seiner antibakteriellen Eigenschaften ausschließlich als Konservierungsmittel genutzt wurde, begann man ihn schließlich dem Bierbrauprozess beizumischen, um dem Bier seinen bitteren Geschmack zu verleihen und den Schaum zu stabilisieren [119]. Nebst dieser Funktion beinhaltet der Hopfen pharmazeutisch interessante Bestandteile. So wurde er vom Studienkreis Entwicklungsgeschichte der Arzneipflanzenkunde an der Universität in Würzburg 2007 auch zur Arzneipflanze des Jahres 2007 gewählt.

Generell unterscheidet man bei Pflanzeninhaltsstoffen zwischen primären und sekundären Pflanzenstoffen. Zu den primären Pflanzenstoffen gehören unter anderem Kohlenhydrate, Fette und Proteine. Ihre Aufgaben sind der Energiestoffwechsel und der Aufbau der Zellstruktur. Dem gegenübergestellt sind die sekundären Pflanzenstoffe, die nur in geringen Mengen produziert werden. Sie agieren als sogenannte „bioaktive Substanzen“ und bestehen aus einer Gruppe chemisch heterogener Substanzen. Alle bioaktiven Substanzen haben in der Regel pharmazeutische Wirkung. Dazu zählen beispielsweise antikanzerogene, immunmodulierende, entzündungshemmende, antithrombotische, blutdruckmodulierende, cholesterinsenkende, blutzuckersenkende und / oder antibakterielle Eigenschaften [94]. Zu den wichtigsten sekundären Pflanzenstoffen gehören die Polyphenole, Carotinoide, Sulfide, Phytoöstrogene, Proteaseinhibitoren, Saponine, Glucosinolate, Phytosterine und Monoterpene [94].

Bezüglich des Hopfens unterscheidet man drei Hauptgruppen sekundärer Metabolite, die Polyphenole, die ätherischen Öle und die Harze [65,70,97]. Aufgrund ihrer ausgeprägten, chemischen Heterogenität ist es kein Wunder, dass den Wirkstoffen eine große Spannbreite pharmakologisch wichtiger Eigenschaften zugesprochen wird.

Für die antibakterielle Wirkung des Hopfens werden also unter anderem die Hopfenbitterstoffe (Harze) Humulone und Lupulone verantwortlich gemacht [65,70,106]. Gerade in der Erforschung neuer pflanzenbasierter Antiseptika gegen kariogene und parodontal schädliche Bakterien spielen die Hopfenbitterstoffe eine wichtige Rolle [70]. Die Bitterstoffe entstammen den Drüsenhaaren der weiblichen Hopfendrüse, welche ein harzartiges, gelbes Exkret enthält. Man unterscheidet hierbei zwischen Hartharz und Weichharz. Diese Unterscheidung basiert auf dem Vermögen des jeweiligen Harzes in Hexan gelöst zu werden [70]. Das Weichharz, welches in Hexan löslich ist, lässt sich wiederum in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Harz unterteilen. Den Hauptanteil des  $\alpha$ -Harzes stellen die Humulone dar (35-70% des totalen Harzanteils), daneben existieren Cohumulone (20-55% (65%)) und Adhumulone (10-15%) [65,70,97,119]. Lupulone hingegen nehmen etwa 30-55% des  $\beta$ -Harzanteils ein, neben Colupulonen (20%-55%) und Adlupulonen (5%-10%) [65,119]. Neben diesen Hauptgruppen existieren noch kleinere Gruppen wie Posthumulone/ Postlupulone, Prehumulone/ Prelupulone und weitere.

Die Wirkung der Humulone und Lupulone gegen gram-positive Bakterien (wie zum Beispiel Mikrokokken, Staphylokokken, Mycobakterien und Streptomycceten) beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen der Moleküle mit Teilen der Bakterienzellwand, die dadurch beschädigt wird [8,65,106]. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Säuren sind in der Zellwand integriert, agieren dort als Carrier-Ionophore und erhöhen so die Permeabilität der Membran [8,65,70]. Dadurch ermöglichen sie den elektronenneutralen Influx von Molekülen, katalysieren an Selbigem den Austausch von Protonen durch zweiwertige Kationen, wie etwa Mangan, und fördern den anschließenden Efflux des dadurch neu entstandenen Produktes. So resultiert nach einiger Zeit ein Ionenkonzentrationsgefälle, da es intrazellulär zur Akkumulation von Protonen kommt [64,99]. Dies hat zur Folge, dass der transmembrane Protonengradient zerfällt und es zum Zelltod kommt [65]. Auch antifungale Wirkungen, unter anderem gegen *Candida albicans*, wurden beschrieben [97]. Weitere Mechanismen der antibakteriellen Wirkung des Hopfens wurden beobachtet. Er ist ebenfalls im Stande die Permeabilität der Zellwand zu verändern, eine Undichtigkeit der Cytoplasmamembran und darauffolgend eine Hemmung der Atmungskette und von Proteinen sowie der DNA- und RNA-Synthese zu bewirken [8,95]. Diese antibakteriellen Fähigkeiten wurden hauptsächlich für grampositive Bakterien entdeckt [8,97], während gramnegative Bakterien nahezu nicht inhibiert wurden, vermutlich aufgrund ihrer vor dem Hopfen schützenden, äußeren Membran [8]. Ein weiterer Mechanismus der antibakteriellen Wirkweise der Hopfenbitterstoffe ist die Induktion der Apoptose, also des Zelltodes [70]. In welcher Weise die Hopfenharze die Einleitung der Apoptose triggern, ist bisher noch nicht gänzlich erforscht. Es ist bekannt, dass die Apoptose durch zweierlei Wege induziert wird: mitochondrial intrinsisch und extrinsisch [70]. Die Bitterstoffe beeinflussen den intrinsischen Weg, indem sie die Bcl-2-Familie der Proteine beeinflussen und den extrinsischen Weg, indem sie die Expression von p38 verstärken. P38 ist Bestandteil des Signaltransduktionswegs, der eine entscheidende Rolle beim programmierten Zelltod spielt. Da es sich bei den Säuren des Hopfens um schwache Säuren handelt und lediglich die undissoziierte Form aktiv ist, verringert sich die antibakterielle Aktivität mit sinkendem pH [65]. Die potentielle antimikrobielle Aktivität steigt außerdem mit wachsender Hydrophobie des Hopfenderivats [106]. Vergleicht man die antibakterielle Effizienz der einzelnen Hopfenbitterstoffe, beobachtet man folgende Reihenfolge: Lupulone > Humulone > Isohumulone [65].

Die ätherischen Öle des Hopfens sind eine sehr vielschichtige Gruppe mehrerer hundert Vertreter mit unterschiedlichen physikochemischen, biologischen und organoleptischen Eigenschaften [65]. Diese Verbindungen werden von den Lupulindrüsen zusammen mit den Bitterstoffen sezerniert, wenn die Biosynthese der Bitterstoffe vollendet ist [65]. 1981 entwickelten Sharpe und Laws [98] eine Klassifikation, die alle bekannten Hopfenöle in drei Fraktionen unterteilt (Hydrocarbone, sauerstoffhaltige Verbindungen und schwefelhaltige Verbindungen) [70,98]. Hierbei macht der Hydrocarbonanteil mit etwa 50 %-80% des Ölgehalts den Hauptanteil aus, gefolgt von den sauerstoffhaltigen Verbindungen (etwa 30% des gesamten Ölgehalts) und schließlich den schwefelhaltigen Verbindungen mit nur etwa 1 % des Ölanteils [98]. Die antibakterielle und antivirale Wirkung von ätherischen Ölen wurde anhand eines sehr breiten Spektrums von Pflanzenölen untersucht und gezeigt. Hierbei wurde der Fokus jedoch häufig auf Pflanzenextrakte gelegt, die eine komplexe und variable Zusammensetzung besitzen. Somit gibt es wenige Informationen und Studien über die antibakteriellen Eigenschaften reiner ätherischer Öle. Allgemein lässt sich sagen, dass die Wirksamkeit ätherischer Öle des Hopfens im Hinblick auf die Bakterien schwächer ist als die der Hopfenbitterstoffe [65]. Moderate antibakterielle Wirksamkeit von Hopfenöl gegen gramnegative *E. coli*-Bakterien und grampositive Bakterien, wie *B. subtilis* und *S. aureus* oder auch den Pilz *C. albicans* wurden durch die Hydrodistillation von Hopfenzapfen erzielt [65].

Die Gruppe der Polyphenole ist eine weitere große Gruppe von biologisch aktiven sekundären Pflanzenstoffen des Hopfens. Sie machen zwischen 3- 6% des Trockengewichts von Hopfenzapfen aus. Der Großteil der Polyphenole wird im Blatt und im Stiel produziert, mit Ausnahme der Prenylflavonoide, welche ebenfalls von den Lupulindrüsen (zusammen mit den Bitterstoffen und den ätherischen Ölen) hergestellt werden [65]. Ferrazzano et al. veröffentlichten 2011 eine Übersichtsarbeit, die die Studien über die anti-kariogenen Eigenschaften pflanzlicher Polyphenole beleuchtet [28]. Diese Gruppe der Prenylflavonoide stellt einen der wichtigen Vertreter der Polyphenole dar. Sie zeigen eine starke biologische Aktivität und haben einen bewährten, positiven Einfluss auf die menschliche Gesundheit [64,65]. Sie zeigen antimikrobielle Aktivitäten gegen eine Vielzahl von Mikroorganismen, darunter Bakterien, Viren, Pilze [64,70] und Protozoen [64].

Die Hauptprenylflavonoide des Hopfens sind Xanthohumol, Isoxanthohumol, Desmethylxanthohumol und 6- und 8-Prenylnaringenin. Anhand einer Vielzahl von klinischen Versuchen und Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass Polyphenole einen sehr starken antioxidativen Effekt haben. Sie verfügen über die Möglichkeit effektive Antioxidantien darzustellen und somit ein weites Spektrum an reaktivem Sauerstoff und anderen Radikalen abzufangen [64]. Diese Radikale spielen eine Rolle bei oxidativem Stress und können eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Tumoren, Atherosklerose, Diabetes und anderen Krankheiten spielen [65]. Aber auch antibakterielle Aktivitäten können den Polyphenolen zugeschrieben werden. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass Xanthohumol das Wachstum der gram-positiven Bakterien *Staphylococcus aureus* [64,70] und *Streptococcus mutans* [64] hemmt. Diese erlangen sie primär durch die Inhibition der Replikation von Mikroorganismen [65]. Die antibakterielle Kompetenz beinhaltet die Fähigkeit in Zellen zu akkumulieren oder die Phospholipidzellmembran zu penetrieren und eine Inhibition zu induzieren [65].

### 3.4 Ölsäure

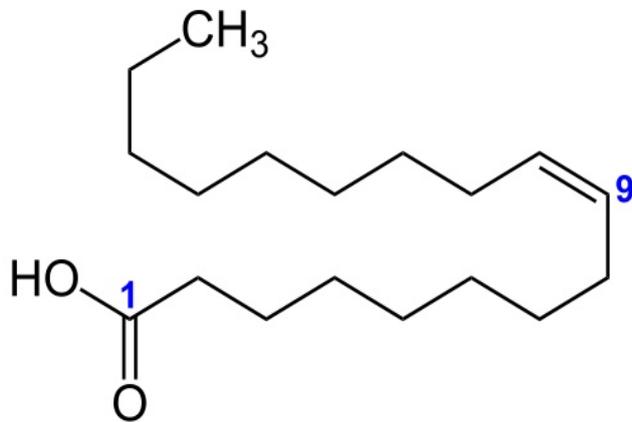


Abb. 2: Strukturformel cis-9-Octadecensäure (Ölsäure)

Ölsäure (Abb.2) ist der wichtigste Vertreter der einfach ungesättigten Fettsäuren und aufgrund der Lage ihrer C-Doppelbindung handelt es sich um eine Omega-9-Fettsäure. Weitere, im Analysenzertifikataufgelistete Inhaltsstoffe sind Linolsäure (maximal 18%), Palmitinsäure (maximal 8%), Palmitoleinsäure (maximal 1%) und Stearinsäure (maximal 4%).

Das natürliche Vorkommen der Ölsäure, chemisch gebunden in Triglyceriden, erstreckt sich über fast alle natürlichen (pflanzlichen und tierischen) Öle und Fette. Besonders hervorzuheben aufgrund des hohen Anteils sind hierbei Olivenöl [53] und Erdnussöl.

Studien haben belegt, dass Ölsäure gegen multiple Bakterien unter in-vitro-Bedingungen antibakteriell wirksam ist [53,121]. Es konnte auch gezeigt werden, dass Ölsäure unter in-vitro-Bedingungen gegen eine Vielzahl oraler Mikroorganismen [17,53], wie beispielsweise *S. mutans*, *A. actinomycetemcomitans*, *C. albicans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* und *S. gordonii* wirksam ist [53]. Fettsäuren allgemein sind ubiquitäre Moleküle, die typischerweise gebunden an andere chemische Verbindungen, wie Glycerin, Zucker oder Phosphate, vorkommen, um Lipide zu formen.

Durch enzymatische Spaltung können daraus freie Fettsäuren entstehen, welche vielseitige und starke biologische Aktivitäten aufweisen. Kurz-, mittel- und langkettige freie Fettsäuren allgemein zeigen antibakterielle Eigenschaften in in-vitro-Studien [21,54,63,82]. Sie agieren als natürliche Abwehrmechanismen, ihre biologische Aktivität dient der Bekämpfung potentiell pathogener oder opportunistischer Mikroorganismen [21]. Diese Aufgabe wird ihnen in vielen multizellulären Organismen, darunter Säugetiere [50], Pflanzen [111], Weichtiere [9] und Seetang [72], zuteil. Ein beeindruckendes Beispiel hierfür ist die menschliche Haut, deren durch lipolytische Spaltung von Fetten der Talgdrüse entstandene Fettsäuren eine starke bakterizide Wirkung aufweisen [24]. Die Anzahl der Kohlenstoffatome ist variabel, alle freien Fettsäuren zeichnen sich jedoch durch eine Carboxylgruppe (-COOH) an einem und einer Methylgruppe (-CH<sub>3</sub>) am anderen Ende aus. Freie Fettsäuren mit weniger als 8 Kohlenstoffatomen werden als kurzkettige, solche mit mehr als 16 Kohlenstoffatomen als langkettige Fettsäuren bezeichnet. Lang- und mittelkettige Fettsäuren scheinen einen stärkeren Effekt auf gram-positive Bakterien zu haben als auf gram-negative Bakterien [21,63,82]. Gram-negative Organismen werden von sehr kurzkettigen (mit sechs oder weniger Kohlenstoffatomen) Fettsäuren angegriffen, während Fettsäuren mit mehr als acht Kohlenstoffatomen keinen Effekt auf selbige haben [82]. Der Begriff „ungesättigt“ bezieht sich auf die Anzahl der Kohlenstoffdoppelbindungen. Verbindungen mit einer oder mehr C=C Doppelbindungen werden als ungesättigte Fettsäuren bezeichnet. Sie scheinen eine höhere antibakterielle Potenz zu haben als gesättigte Fettsäuren mit gleicher Anzahl an Kohlenstoffatomen [21,63,82]. Auch die Anzahl und Ausrichtung der Doppelbindung in Bezug auf ihre Konfigurationsisomerie hat einen Effekt auf die antibakterielle Effektivität der Fettsäuren. Die in der Natur vorkommenden freien Fettsäuren haben typischerweise eine *cis*-Orientierung (relative Stellung zweier Substituenten bezüglich einer Referenzebene) und scheinen eine stärkere antibakterielle Potenz aufzuweisen als jene mit *trans*-Isomerie [21,63,82]. Der Grund hierfür ist vermutlich, dass die Struktur der ungesättigten *trans*-Isomere, denen der gesättigten freien Fettsäuren ähnelt. Ihr chemischer Aufbau und die oben genannten funktionellen Gruppen machen die Fettsäuren zu amphiphilen Molekülen, was einen wesentlichen Aspekt ihrer Wirkweise darstellt [21]. Dies ermöglicht Ihnen mit der Bakterienzellwand zu interagieren und dort vorübergehende oder permanente Poren unterschiedlicher Größe zu bilden. In hoher Konzentration können Detergenzien wie die freien Fettsäuren Zellmembranen in solchem Umfang destabilisieren und auflösen, dass verschiedene Membranproteine oder größere Teile der Lipiddoppelschicht freigegeben werden [21].

Der Schlüsselmechanismus der freien Fettsäuren an der Bakterienzellwand ist die Energiegewinnung mittels Interferenz mit der Elektronentransportkette und die Störung der oxidativen Phosphorylierung der Zelle. Dies geschieht beispielsweise durch das Binden an Carrier der Elektronentransportkette, die den Protonengradienten zwischen Zellaußen- und Zellinnenwand aufrechterhalten. So ist es ihnen möglich, diese zu hemmen und somit den Gradienten zu verringern. Da dieser Ladungsunterschied wesentlich für die ATP Synthese der Zelle ist, kommt es hierdurch zu einem entscheidenden Energieverlust des Systems. Auch andere Wege der bakteriostatischen und bakteriziden Wirkung freier Fettsäuren werden beschrieben. So kann es in Anwesenheit der freien Fettsäure zur Zellyse, Inhibition von Enzymaktivitäten, Herstellung von toxischen Oxidationsprodukten, Beeinträchtigung der Nährstoffaufnahme und weiteren zellschädigenden Ereignissen kommen [21].

### 3.5 Lysozym

Lysozym ist ein den Hydrolasen zugehöriges Enzym, das unter anderem im Speichel vorkommt und durch seine antibakterielle Wirksamkeit das angeborene Immunsystems unterstützt [88]. Die Namensgebung lässt sich auf den bekannten, schottischen Mediziner und Bakteriologen Alexander Fleming (1881-1955) zurückführen, der die antibakterielle Wirkung dieses Enzyms auf das Bakterium *Micrococcus lysodeikticus* beobachtete [29,33,59]. Während er es zunächst lediglich als ein Produkt des Nasenschleims vermutete, wurde ihm später die Tragweite seiner Untersuchungen bewusst. Generell muss ein lytisches Enzym eine bestimmte Reihe an Eigenschaften erfüllen, um als Lysozym bezeichnet werden zu können. Hierzu zählt, dass es sich um ein basisches Protein handeln muss, welches ein geringes Molekulargewicht (etwa 15000) hat. Des Weiteren muss es bei saurem pH beständig und bei pH=4,5 ein bis zwei Minuten auf 100 °C erhitzt werden können, ohne an Aktivität zu verlieren [33,59]. Außerdem muss es bei alkalischem pH instabil und aktiv gegenüber dem Bakterium *Micrococcus lysodeikticus* sein. Lysozym ist in der Lage die  $\beta$ -1,4- glykosidischen Bindungen zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosaminresten zu spalten [25,56,59]. Dadurch ist es ihm möglich das Peptidoglykangerüst bakterieller Zellwände abzubauen und diese dadurch zu zerstören [25,35,55].

Durch diese Hydrolyse der Peptidoglykanschicht bakterieller Zellwände erhöht Lysozym die Permeabilität der Bakterien und dies führt letztlich zu osmotischen Veränderungen, welche in der Lyse der Mikroorganismen enden [35]. Des Weiteren beinhaltet die antibakterielle Wirkung des Lysozyms ebenfalls die Aggregation von Bakterien, die Aktivierung bakterieller Autolyse, die Inhibitions bakterieller Adhärenz und des Glucosestoffwechsels der Bakterien [88]. Zu den reichsten Lysozymquellen gehören die menschlichen Leukozyten sowie das Hühnereiweiß. Jedoch enthalten auch eine ganze Reihe weiterer menschlicher, tierischer und pflanzlicher Zellen und Sekrete (Speichel, Nasensekret, Tränenflüssigkeit, Blutseren, Liquor cerebrospinalis, Lunge, Milz, Niere, Knochen, Plazenta, Milch etc.) Lysozyme [33]. Untersuchungen haben ergeben, dass sich die antibakterielle Wirkung des Lysozyms hauptsächlich auf gram-positive Bakterien bezieht [15,25,83,88]. Im Gegensatz hierzu sind die meisten gram-negativen Bakterien resistent gegen die Effekte des Lysozyms, da die äußere Membran das Peptidoglykangerüst vor äußeren Einflüssen schützt [15,25,88]. Da Lysozym nicht im Stande ist, diese Membran ohne weiteres zu durchbrechen, gilt es als ein Enzym, welches nur eine sekundäre Funktion in der Wirtsabwehr gram-negativer Bakterien hat. Auch konnten Studien die antifungale Wirkung des Lysozyms nachweisen. So zeigten Samaranyake et al. 1997, dass unter in-vitro- Bedingungen zwanzig aus der Mundhöhle, von an *Candida krusei* erkrankten Patienten isolierte *Candida krusei*-Sporen, empfindlich gegenüber Lysozym reagierten. Ebenso verhielt es sich bei fünf, ebenfalls aus der oralen Flora erkrankter Patienten isolierten *Candida albicans*-Proben [92]. Das aus Hühnereiweiß gewonnene Lysozym ist das erste Enzym, dessen Tertiärstruktur aufgeklärt werden konnte [60]. Die Aminosäuresequenz des aus Hühnereiweiß gewonnenen Lysozyms ist bekannt und besteht aus 129 Aminosäureresten, die in einer einzigen Polypeptidkette aufgereiht sind und über vier Disulfidbrücken der Cysteinreste gehalten werden [60]. Die Polypeptidkette ist, die dreidimensionale Struktur betrachtet, in etwa zwei gleich großen Teilen angeordnet, zwischen denen ein tiefer Spalt klafft. In diesem Spalt werden die Substrate (und Inhibitoren) durch Wasserstoffbrücken gebunden und unter Mitwirkung von den Aminosäuren Glutaminsäure (an Position 35) und Asparaginsäure (an Position 52), welche das aktive Zentrum des Enzyms bilden, hydrolysiert [60]. 2001 konnten Voadlo et al. experimentelle Evidenz für die exakten Abläufe der Spaltung der Bakterienzellwand liefern: Zunächst wird das Substrat (Polysaccharid) durch das Enzym an einem 6 Saccharid langen Teil gebunden. In Folge dessen wirkt die Carboxylgruppe von Asparaginsäure auf Position 52 als Nucleophil um das Glycosylintermediat zu bilden, das zu einer Konformationsänderung des Substrates führt.

Die Seitenkette des Glu 35 (Aminosäure des Lysozyms an 35. Stelle) überträgt nun ein Proton ( $H^+$ ) auf das glykosidische Sauerstoffatom. Das Enzymcarboxylat selbst wird durch Wasser von dem Glycosyl-Enzym-Intermediat getrennt, was mit einer erneuten Konfirmationsumwandlung in den Ursprungszustand einher geht [12,69]. Lysozym hat neben dieser Wirkung auch noch eine antimikrobielle Eigenschaft, die unabhängig von dieser enzymatischen Wirkung ist. Es konnte mit Hilfe von enzymatisch inaktivem Lysozym gezeigt werden, dass es dennoch die bakterielle Autolyse aktivieren kann [35,73]. Es ist ebenfalls struktureller, immobilisierter Bestandteil der Pellikel, welche als Proteinschicht auch einige antibakteriell wirkende Proteine beinhaltet [35,36,38]. Da die Bindung (Immobilisation) von Enzymen innerhalb der Pellikel mit einer Änderung der Sekundär- und Tertiärstruktur einhergeht, sind die physikalischen und chemischen Eigenschaften jener Proteine verändert [35,44]. Hierbei kann auch das aktive Zentrum des Enzyms verändert sein, was bei einigen dieser Enzyme (z.B. Alkalische Phosphatase) zu einer geringeren Aktivität im an Hydroxylapatit gebundenen Zustand führt [35]. Dennoch konnte gezeigt werden, dass einige Enzyme wie z.B. Amylase und Lysozym in einer aktiven Form in der in-situ gebildeten Pellikel gebunden sind [35,36,44]. So konnten Hannig et al. ebenfalls in in-situ-Studien zeigen, dass bereits nach sehr kurzer Zeit (1 min) der Pellikelbildung eine antibakterielle Wirksamkeit durch das in der Pellikel gebundene Lysozym detektiert werden kann. So stellt es den Hauptanteil der unspezifischen, antibakteriell wirkenden Komponenten der initialen, aus dem Niederschlag von Speichelproteinen entstandenen Pellikel dar [35,38]. Das Lysozym aus dem Speichel kann auf zwei Arten in der Pellikel gebunden sein. Ein Teil, der fest im immobilisierten Zustand in der Pellikel verankert ist und von einer Substratspülung nicht entfernt werden kann, und einem schwächer assoziierten Teil gebundenen Lysozyms, der von einer Substratlösung entfernt werden kann [35]. Eine weitere Eigenschaft des in der Pellikel gebundenen Lysozyms ist es, spezielle Bakterien spezifisch zu binden und somit die bakterielle Aggregation und Adhärenz zu erleichtern [35]. Dieser Tatsache entgegen hemmt Lysozym jedoch die Adhärenz von Streptokokken auf dem mit Speichel bedeckten Hydroxylapatit [35]. Da die Pellikel einer ständigen und dynamischen chemischen und enzymatischen Modifikation unterliegt, zeigt sie sowohl Adsorption als auch Desorption von Biomolekülen, darunter auch von Enzymen [35]. In einer weiteren Studie konnten Hannig et al. zeigen, dass es möglich ist, die Immobilisation des Lysozyms in der in-situ gebildeten Pellikel gezielt zu erhöhen [41].

## 4 Material und Methode

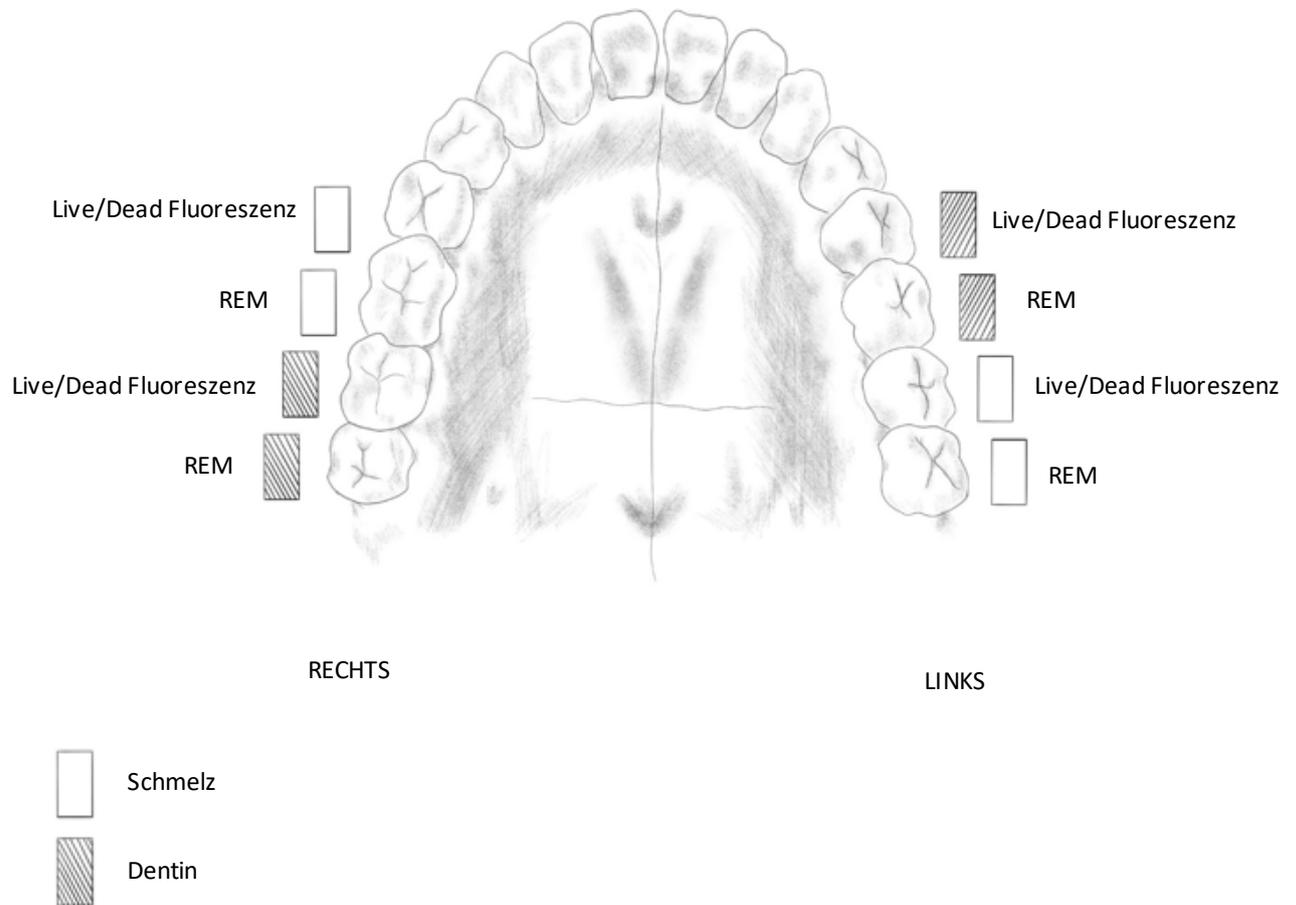
### 4.1 Versuchsplan

Ziel der Studie war die In-situ-Testung verschiedener Naturextrakte auf ihre bakterielle Wirkung anhand boviner Schmelz- und Dentinprüfkörper, welche intraoral exponiert wurden. Hierzu wurden zunächst drei gesunde Probanden ausgewählt. Diese Probanden erhielten zu Beginn eine Abformung beider Kiefer mit dem Alginat Blend-a-print Elastic-Alginat (Procter & Gamble, Schwalbach, Deutschland). Nach Ausgießen der Abdrücke mit Superhartgips der Klasse IV (Die-Stone Peach Klasse IV-Gips, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) konnten auf den Modellen partielle Miniplastschienen mit Hilfe eines Vakuumtiefziehgeräts hergestellt werden (Erkopress ES 2004, Erkodent GmbH, Pfalzgrafenweiler, Deutschland).

Bei dem Material der Schienen handelte es sich um hartelastische, transparente Duran®- Folien 1,0 x 125 mm (Scheu-Dental, Iserlohn, Deutschland). Die bovinen Prüfkörper konnten auf diesem Wege auf der Bukkalfläche der Seitenzähne im Oberkiefer mit Hilfe eines A-Silikons angebracht und nach 48 Stunden demontiert werden, um sie anschließend fluoreszenzmikroskopisch, rasterelektronenmikroskopisch und transmissionselektronenmikroskopisch zu untersuchen. Die Verteilung der Prüfkörper auf den Schienen und die systematische Einteilung nach Art der Mikroskopie werden in Abb. 3 gezeigt. Initial nach Einsetzen der Schiene (nach drei Minuten) und alle sechs Stunden erfolgte während der kompletten Tragedauer eine dreißigsekündige Spülung mit den zu testenden Substanzen. Als Referenz wurde selbiges Protokoll mit sterilem Wasser wiederholt, um den Effekt der Naturextrakte auf die Pellikel, den Biofilm und die Bakterien zu untersuchen.

Für die Dauer des Tragens wurde seitens der Probanden gänzlich auf potentiell oder erwiesenermaßen antimikrobielle Nahrungs- und Speisemittel (Kaffee, Alkohol etc.) sowie auf antibakteriell wirkende Zahnpasten oder Mundspüllösungen verzichtet. Somit erfolgte die Mundhygiene innerhalb der 48 h lediglich rein mechanisch, um eine standardisierte Pellikel- und Biofilmbildung gewährleisten zu können.

Dieser Versuchsplan und Versuchsaufbau wurde im Rahmen eines Ethikvotums (238/03; 2016) der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes überprüft und genehmigt.



**Abb. 3.: Versuchsanordnung: Darstellung des Oberkieferzahnbogens. Die rechteckigen Symbole stellen die Prüfkörper dar, welche an den Bukkalflächen der Miniplastschiene im Oberkieferseitenzahnbereich montiert wurden.**

**Abkürzungen: Live/Dead Fluoreszenzmikroskopie mit Vitalfärbemikroskopie**

**REM= Rasterelektronenmikroskopie, TEM= Transmissionselektronenmikroskopie**

## 4.2 Spüllösungen

### 4.2.1 Experimentelles Hopfenextrakt

Das hier verwendete experimentelle, wässrige Hopfenextrakt Flavopura wurde von der Firma NIC (Natural Medical Products, Homburg, Germany) produziert und zur Verfügung gestellt.

### 4.2.2 Ölsäure

Bei der hier verwendeten, pharmazeutisch gereinigten Ölsäure (Ölsäure, GPR RECTAPUR®, VWR Chemicals International GmbH Darmstadt, Deutschland) handelt es sich um eine cis-9-Octadecensäure mit der Summenformel  $C_{18}H_{34}O_2$  (laut Analysezertifikat mindestens 72 %) und sie stellt somit eine langkettige, freie Fettsäure dar.

### 4.2.3 Lysozym

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde ein aus Hühnereiweiß (Albumin) gewonnenes Lysozympulver der Firma Fordras (Fordras, a Bioseutica Group Company, Lugano, Schweiz) verwendet. Dieses wurde mit sterilem, pyrogenfreiem Wasser (Aqua. B. Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in eine 1,4 mg/ml konzentrierte Lösung gebracht.

### 4.3 Probanden

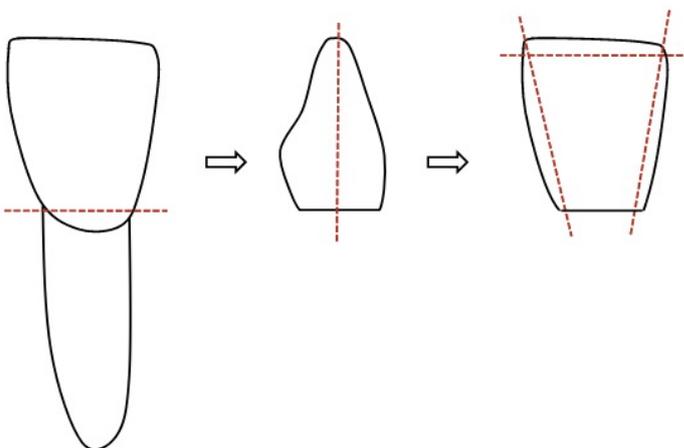
Es nahmen drei Probanden (zwei Männer und eine Frau im Alter zwischen 30 und 38 Jahren) an der Studie teil, deren allgemeinmedizinische Anamnese im Vorfeld überprüft wurde. Allgemeinerkrankungen oder Dauermedikationen, die die intraorale Gesundheit beeinflussen, sollten somit ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurden Schwangerschaft, Nikotinkonsum und Alkoholkonsum während der Versuchsdauer als Ausschlusskriterien eingestuft. Nach Vorauswahl anhand der allgemeinmedizinischen Anamnese erfolgte anschließend eine intraorale Inspektion. Um die Beschaffenheit der Mundflora weitestgehend in einem physiologischen Spektrum zu halten, wurden jene Probanden ausgewählt, bei deren klinischer Untersuchung kein Anhalt für aktive kariöse Läsionen oder Parodontopathien diagnostiziert werden konnten.

### 4.4 Prüfkörper

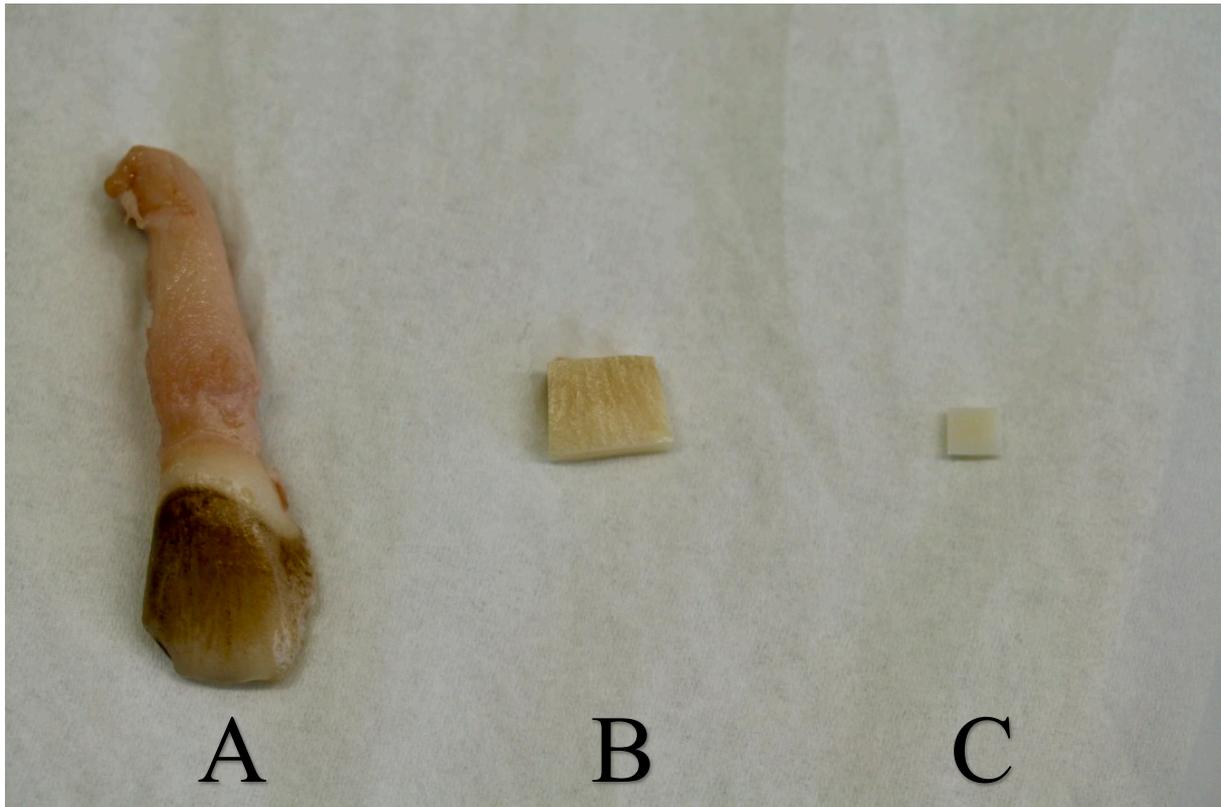
Die zur oralen Biofilmgewinnung genutzten Schmelz- und Dentinprüfkörper entstammten extrahierten, bovinen Schneidezähnen toter, BSE-negativer Rinder vom Schlachthof Zweibrücken (Rheinland- Pfalz), die über einzelne Zwischenstufen zu der gewünschten Form verarbeitet wurden (Abb.5).

Im Anschluss an die Extraktion wurden die Zähne zunächst in 0,1 % iger Thymollösung (0,1 ml Thymol, 10,0 ml 96%iges Ethanol ad 100 ml Aqua purificata) gekühlt gelagert (4° C). Anschließend wurden die Zähne mit Hilfe einer Diamanttrennscheibe (Schleiftrennmaschine WOCO 50p, Conrad GmbH, Clausthal, Deutschland) unter Wasserkühlung rotierend mit Hilfe eines Nassschleifgerätes (Gripo 2V, Metkon Instruments Ltd, Bursa, Türkei) zu quadratisch oder rechteckigen Plättchen aufgearbeitet und schließlich die Oberfläche bis zur Körnung P2500 (Dentin) oder P4000 (Schmelz) poliert. Das Sägeschema hierzu lässt sich Abb. 4 entnehmen. Die Plättchen sollten in etwa 4-5 mm breit und 3-4 mm hoch sein, rechte Winkel und eine parallele und plane Schmelz- und Dentinfläche aufweisen.

Die Mindestschichtstärke sollte 1-1,5 mm betragen, wobei das Verhältnis der Dicke der zu untersuchenden Zahnhartsubstanz zu der unterstützenden Zahnhartsubstanz 2:1 betragen sollte. Bsp.: Zur Herstellung eines Schmelzprüfkörpers sollte die oberflächliche Schicht Schmelz doppelt so dick sein wie die unterstützende Dentinschicht, welche die Gefahr der Schmelzperforation senkt. Während die Bearbeitung der Dentinprüfkörperoberfläche mit aufsteigender Körnung bei P2500 endete, wurden die Schmelzprüfkörper noch einmal sukzessiv bis P4000 poliert. Die Endkontrolle der Politur erfolgte lichtmikroskopisch (Zoom-Stereomikroskope SMZ 168, Motic GmbH, Wetzlar, Deutschland) bei zwölfacher Vergrößerung.



**Abb. 4:** Sägeschema für die bovinen Frontzähne zur Prüfkörperherstellung



**Abb. 5: Stadien der Prüfkörperherstellung: A: Rinderzahn in toto, B: gesägtes bovines Zahnhartsubstanzfragment, C: fertiger boviner Schmelzprüfkörper nach Politur**

Einen Tag vor Versuchsbeginn wurde mit der Reinigung und Desinfektion der Prüfkörper begonnen. Im ersten Schritt verweilten die Prüfkörper jeweils für eine kurze Zeit in 3%iger Natriumhypochloritlösung unter ständiger Bewegung (Wipptisch Rocky, Froebel Laboratory Equipment, Lindau, Deutschland). Nach eingehender Säuberung unter fließendem, deionisiertem Wasser und einer Verweildauer von 5 Minuten für Schmelz und 2 Minuten für Dentin im Ultraschallbad (Sonorex RK 100 H, Bandelin, Berlin, Deutschland), konnten die Prüfkörper im nächsten Schritt für 15 Minuten in 70%igen Isopropylalkohol eingebracht werden. Nach der abschließenden Reinigung mit sterilem Wasser war eine Wässerung der Prüfkörper für mindestens 6 Stunden, aber maximal drei Tage bei 4°C von Nöten, um etwaige Ethanolrückstände auszuschwemmen und zu verdünnen.

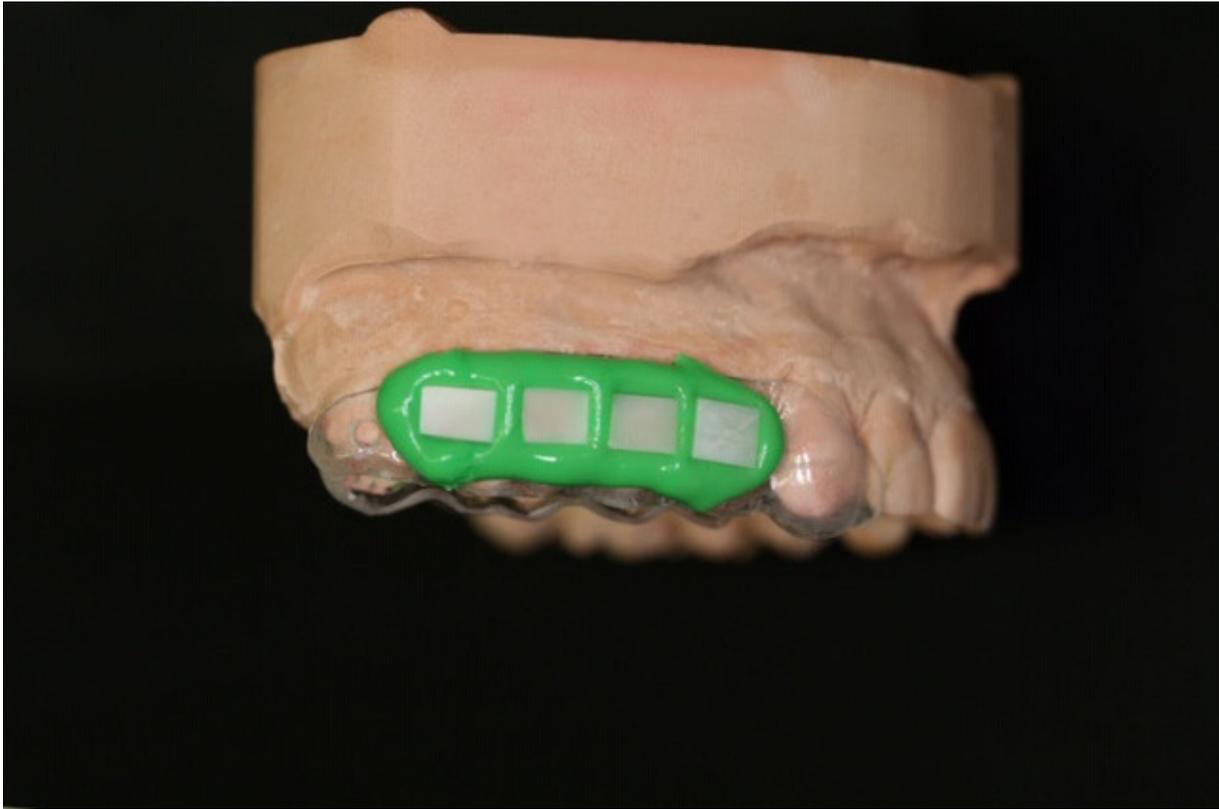
## 4.5 Orale Exposition

Im Rahmen der Versuchsdauer wurden die Prüfkörper durch die Probanden auf den individuell hergestellten Oberkiefertiefziehschienen getragen. Zum Anbringen der Proben auf der Bukkalfläche der Schiene, welche eigens hierfür mit kleinen Perforationen versehen wurde, um eine Retention zu gewährleisten, wurde ein dünnfließendes A-Silikon verwendet (President light body Coltène/Whaledent GmbH und Co. KG, Langenau, Deutschland).

Die insgesamt acht Prüfkörper wurden im Silikon so platziert, dass eine Biofilmbildung und bakterielle Adhärenz nur auf der jeweilig dafür vorgesehenen Dentin- bzw. Schmelzoberflächen möglich waren. Bis die Prüfkörpertrageschienen von den Probanden in situ eingegliedert wurden, lagerten sie in Aqua dest. bei 4°C. Nach 48-stündiger Tragezeit konnten die Prüfkörper mit einer zahnärztlichen Pinzette und einem hölzernen Zahnstocher vorsichtig von der Schienenoberfläche entfernt und nach behutsamer Reinigung mit Braunwasser, um Speichelrückstände zu entfernen, weiteren Untersuchungen zugeführt werden. Im Rahmen der vorliegenden Versuchsanordnung wurden die Prüfkörper, wie auf Abb. 6 zu sehen, montiert.

Während des Tragens der Schienen sollte seitens der Probanden auf gesüßte, alkohol- oder koffeinhaltige Getränke verzichtet werden. Zulässig war das Trinken von Wasser mit oder ohne Kohlensäure. Nach und während der Einnahme von Speisen sollte die Schiene in einer Feuchtkammer, wie etwa einer mit feuchtem Tuch ausgelegten, verschließbaren Plastikbox, gelagert werden, um ein Austrocknen der Prüfkörper und des darauf befindlichen (initialen) Biofilms zu verhindern. Um dem Speichel die Möglichkeit der Remineralisation und der Normalisierung des pH- Wertes im Mund zu geben, wurden die Schienen erst 30 min nach Beendigung der Nahrungsaufnahme und einer mechanischen Zahnreinigung, mittels einer Zahnbürste ohne Zahnpasta, wieder eingegliedert.

Direkt nach Eingliederung der Schiene (nach 3 min) und schließlich alle 6 h, wurde der Mund für jeweils 30 s mit der zu testenden Substanz gleichmäßig gespült. Hierfür wurden jeweils 10 ml der Testlösung in einem Reaktionsgefäß (Eppendorf Conical Tubes 15 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) vorbereitet.



**Abb. 6: Seitenansicht eines Gipsmodells des Oberkiefers mit aufgesetzter Miniplastschiene und befestigten Schmelz- und Dentinprüfkörpern Regio 13-17**

## 4.6 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Prüfkörper (FM/LDS)

Direkt nach Beendigung des Versuches und Entnahme der Prüfkörper aus der Mundhöhle wurden diese umgehend der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung unterzogen. Im Vorfeld erfolgte die Herstellung der Live/Dead Staining Solution (LIVE/DEAD™ *BacLight*™ Bacterial Viability Kit, for microscopy & quantitative assays, Thermofischer Scientific, Waltham Massachusetts, USA). Mit Hilfe dieser Lösung, bestehend aus 1000 µl 0,9%igem NaCl (isotonische Kochsalzlösung NaCl 0,9% Fresenius, Kabi, Deutschland) und jeweils 1 µl SYTO® 9 und 1 µl Propidiumiodid, ist es möglich tote von lebenden Bakterien mittels einer Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung zu unterscheiden. Die Wirkung der Staining Solution basiert auf der Interaktion fluoreszierender Reaktionsfarbstoffe, so genannten Fluorochromen. Diese Stoffe sind fähig, nach Anregung mit einem Licht bestimmter Wellenlänge (Excitation) Licht einer anderen Wellenlänge zu emittieren. Dieses Licht kann im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie durch bestimmte Filter selektiv dargestellt werden und das ermöglicht, tote von lebendigen Bakterien visuell zu unterscheiden. Nach Ansetzen der Lösung sollte diese durch ein Schüttelgerät gründlich durchgemischt werden (Vortex- Genie 2 Scientific Industries, USA) und bleibt dann bei einer Temperatur von 4°C und in Abwesenheit von Licht für 48 h stabil.

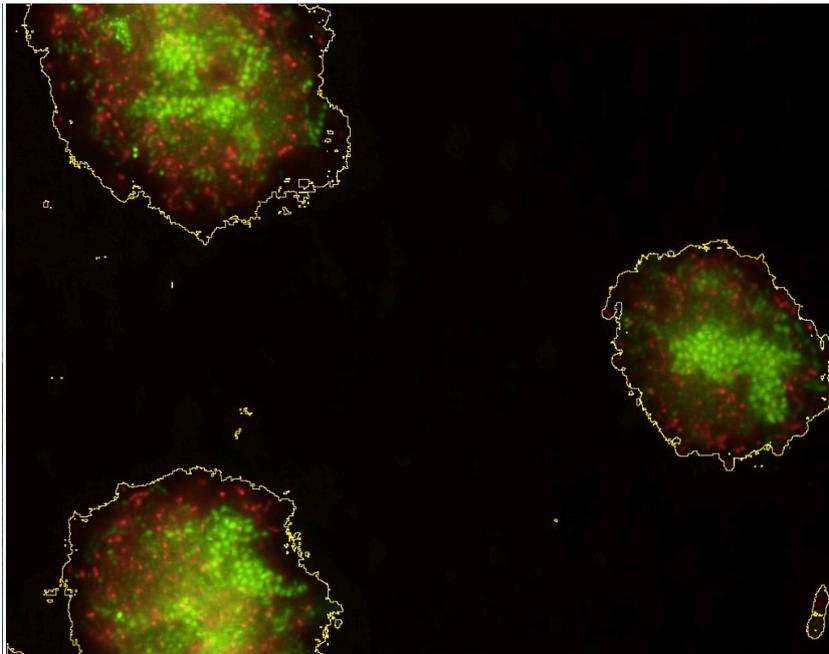
Die gereinigten Prüfkörper wurden mit etwa 7-9 µl, je nach Prüfkörpergröße, der vorbereiteten Lösung versetzt und in Dunkelheit für 10 min inkubiert (Einkanalpipetten, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland). Wichtig hierbei war, dass die gesamte, der oralen Mundhöhle exponierte Fläche des Prüfkörpers von Färbelösung benetzt wurde, um ein flächiges Bild und eine repräsentative Darstellung der Ergebnisse zu gewährleisten. Nach dieser Einwirkzeit konnten die Proben mit Kochsalz gereinigt und für das Mikroskop vorbereitet werden. Hierfür wurde eine etwa erbsengroße Portion Vinylpolysiloxan (A Silikon, hier Provil®novo, Kurzer GmbH Deutschland) auf einen Objektträger gebracht. Diese Kugel diente als Einbettmasse für den Prüfkörper, der zentral in das Silikon eingebracht wurde. Von großer Bedeutung für das spätere Mikroskopieren war die parallele Ausrichtung des Prüfkörpers zum Objektträger, um späteren Ungenauigkeiten und Problemen bei der Fokussuche vorzubeugen.

Sobald der Prüfkörper adäquat im Silikon positioniert war, konnte ein dünner Film Mounting Öl (LIVE/DEAD™ *BacLight*™ Bacterial Viability Kit, for microscopy & quantitative assays, Thermofischer Scientific, Waltham Massachusetts, USA) appliziert werden, welcher als Gleitmittel zwischen Prüfkörper und dem im nächsten Schritt angebrachten Rundgläschen diente. Der erste Schritt unter dem Mikroskop (Axio Imager M2, Zeiss, Deutschland) war nun die 20-fache Vergrößerung der Probe. Mit Zuhilfenahme der Axiovision Mikroskopsoftware Axio Vision 4.8 (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland) konnten auf diesem Wege pro Präparat etwa 6-8 Bilder erstellt werden, die die Verteilung der Bakterien und den Vitalitätszustand selbiger widerspiegeln. Hiermit war es möglich den Einfluss der einzelnen Testsubstanzen auf den Vitalitätszustand und die Verteilung der oberflächlichen Bakterien des Biofilms zu bewerten.

#### 4.6.1 Bildanalyse/ Messung der Ausdehnung des Biofilms und der Vitalität vorhandener Bakterien

Zur Analyse der fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurde das in Java geschriebene, frei zugängliche (open source-) Programm ImageJ verwendet. Es ermöglicht dem Anwender, die bakterielle Besiedlung des Prüfkörpers zu bestimmen. So wird einmal der Bereich des gesamten Prüfkörpers ausgemessen und in einem anderen Arbeitsschritt wird der Prüfkörperbereich markiert, auf dem sich die rot und grün eingefärbten Bakterien befinden (Abb. 7). Die beiden gemessenen Werte werden anschließend miteinander ins Verhältnis gesetzt.

Ebenso erfolgt die Ermittlung der Vitalität des vorhandenen Biofilms. Da im Vorfeld bereits mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops jeweils ein Bild für die Ausdehnung der roten Fluoreszenz (Propidiumiodid, tote Zellen) und ein Bild zur Darstellung der Ausdehnung grüner Fluoreszenz (Syto9, lebende Bakterien) angefertigt wurden, konnte jedes Bild vermessen werden und beide Bilder konnten dann miteinander verglichen werden.



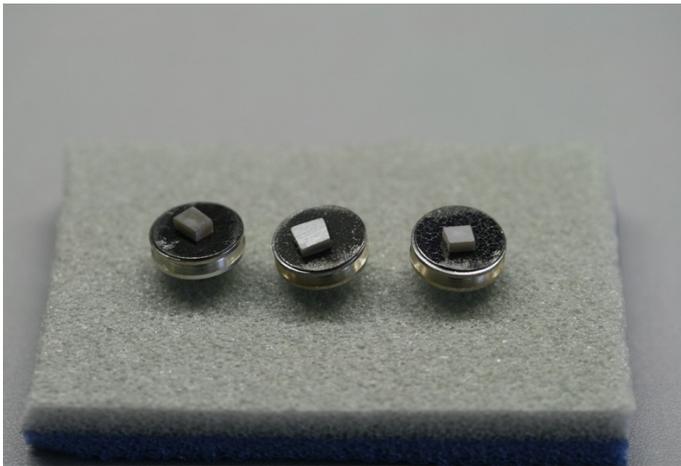
**Abb. 7: Analytische Erfassung der Biofilmausdehnung mit dem ImageJ-Programm**

#### 4.7 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Prüfkörper (REM)

Nach Entnahme der Schiene wurden die Schmelz- und Dentinprüfkörper ebenfalls zunächst vorsichtig gereinigt und für eine Stunde in Fixierlösung (Gemisch aus 1 % igem Glutaraldehyd, 1%igem Paraformaldehyd und 0,1 M Cacodylatpuffer) gelegt. Das nachfolgende Protokoll sah zunächst eine fünf Mal zehnminütige Lagerung in 0,1 M Cacodylatpuffer vor. Die anschließende Trocknung wurde im Rahmen einer Alkoholreihe erreicht. Hierzu wurden die Prüfkörper zunächst für zwei mal fünf Minuten in 50%igen Alkohol eingelegt. Schließlich folgte eine jeweils fünfminütige Lagerung der Proben in Ethanol aufsteigender Konzentration (70%, 80%, 90%) und schließlich eine abschließende zweimalige Lagerung für je zehn Minuten in 100%igem Alkohol.

Nach Ablauf der Zeit wurde der Alkohol mittels einer Pipette entfernt (BrandTech Transferpipette S Single Channel Adjustable Volume Pipette 100-1000uL, BrandTech Scientific, Essex USA) und die Prüfkörper zur Lufttrocknung unter dem Abzug deponiert (Waldner Abzug MC 6, Waldner Laboreinrichtung, Wangen, Deutschland). Nach vollständiger, mindestens 24-stündiger Lufttrocknung konnten die Prüfkörper weiterverarbeitet werden.

Für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Biofilme wurde ein Fei XL30 ESEM FEG Rasterelektronenmikroskop verwendet (Fei Company, Eindhoven, NL). Ein Mikroskopieren der Proben machte zunächst das Be-Sputtern der Prüfkörper mit einem elektrisch leitenden Stoff notwendig. Dies geschah nach Aufbringen der Präparate auf einen Probeteller (SEM pin stub  $\varnothing 12,7$  Diameter top, standard pin, aluminium Micro to Nano V.O.F Haarlem, Niederlande) und durch Aufdampfen einer dünnen Kohlenstoffschicht auf die Oberfläche der Prüfkörper (Kathodenzerstäubungsanlage SCD 030, Oerlikon Balzers, Pfäffikon, Schweiz) (Abb.8).



**Abb. 8:** Fertig vorbereitete und mit Kohlenstoff bedampfte Prüfkörper auf Probeteller

Die Proben wurden bei 5 kV und 25-, 500-, 1000-, 2000-, 5000-, 10000- und bis hin zu 20000-facher Vergrößerung mikroskopiert, um morphologische Unterschiede der Bakterien bzw. des Biofilms zu detektieren und zu interpretieren. Die technischen Einstellungen des Mikroskops, wie etwa der Neigungswinkel, Spot, Größe und Scanmodus wurde für alle untersuchten Proben konstant gehalten. Es wurde jeweils ein repräsentatives, charakteristisches Bild pro Vergrößerungsstufe und Probe aufgenommen. Hierfür wurde die Morphologie und Quantität der Bakterien und des Biofilms der einzelnen Proben mit derer der Kontrollproben verglichen. Dies ließ eine Aussage über die Effektivität der Spüllösungen im Management des oralen Biofilms zu.

#### 4.7.1 Scoring und Auswertung der REM- Bilder

Die mit Hilfe des REM entstandenen Bilder wurden anhand eines Scoring Systems nach Feng et al. klassifiziert und ausgewertet (Tab.1).

**Tabelle 1: Scoringsystem zur Auswertung der REM- Bilder aus Feng et al. [25]**

<b>REM-Analyse: Scoring, Bewertung der Biofilmformation</b>	
<b>Score</b>	<b>Beschreibung</b>
<b>6</b>	Etablierter Multilayer- Biofilm, multiple Morphotypen, bedeckt >50% der Prüfkörperoberfläche
<b>5</b>	Etablierter Biofilm, bedeckt <50% der Prüfkörperoberfläche
<b>4</b>	Multiple mikrobielle Aggregationen oder Monolayer- Biofilm
<b>3</b>	Wenige mikrobielle Aggregationen, hunderte Mikroorganismen
<b>2</b>	Wenige kleine mikrobielle Aggregationen, dutzende Mikroorganismen
<b>1</b>	Deutliche Pellikel, keine oder vereinzelte Mikroorganismen
<b>Die Scores 5 und 6 repräsentieren etablierten Biofilm mit einer ausgeprägten Struktur und einer hohen Dichte an Mikroorganismen, die Scores 4,3,2 beschreiben eine reduzierte mikrobielle Kolonisation, und Score 1 zeigt eine Pellikel mit nur vereinzelten, verstreuten adhärenen Mikroorganismen.</b>	

## 4.8 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Prüfkörper (TEM)

Die Vorbereitung der Transmissionselektronenmikroskopie startete mit der Entnahme der Prüfkörper aus der Fixierlösung (zusammengesetzt aus 1% Formaldehyd und 1% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,4), in die die Prüfkörper nach Beendigung der Tragezeit und Reinigung mit sterilem Wasser eingelegt wurden. Daraufhin folgte das Einbringen selbiger in einen 0,1 M Cacodylatpuffer für 24 Stunden. Nach Ablauf der 24 Stunden konnten die Prüfkörper im nächsten Schritt einer Nachfixierung in einer 4%igen Osmiumlösung, bestehend aus 1g Osmiumtetroxidkristallen, in Braunwasser gelöst und schließlich 1:1 mit 0,2 M Cacodylatpuffer verdünnt, unterzogen werden. Diese Nachfixierung fand in abgedunkelten Verhältnissen für etwa eine Stunde auf dem Schüttler statt. Anschließend wurden die Proben entsprechend des in Tab. 2 zusammengefassten Protokolls entwässert.

**Tabelle 2: Entwässerungsprotokoll TEM- Proben**

1	1x 10 Minuten Ethanol 50%	im offenen Rollrandglas, bei Raumtemp.
2	2x 10 Minuten Ethanol 70%	"
3	2x 10 Minuten Ethanol 90%	"
4	2x 10 Minuten Ethanol 100%	"
5	2x 10 Minuten Ethanol 100%	im geschlossenen Rollrandglas, unter Abzug
6	über Nacht Araldit-Aceton-Gemisch	im offenen Rollrandglas, unter Abzug

Nachdem die Prüfkörper mittels dieses Protokolls entwässert und eine Nacht in einem Araldit-Aceton-Gemisch inkubiert worden waren, konnten die Prüfkörper in ein reines Aralditgemisch umgesetzt werden. Dieses erstgenannte Araldit-Aceton-Gemisch setzt sich aus drei Komponenten zusammen, dem Araldit Resin CY212 (Agar Scientific Ltd, Essex, United Kingdom), DDSA (Dodecenyl Succinic Anhydride, Agar Scientific Ltd, Essex, United Kingdom) und 2,4,6- Tris(dimethylaminomethyl)phenol (SERVA Electrophoreses GmbH, Heidelberg, Deutschland).

Zunächst wurden CY212 und DDSA für 30 Minuten gründlich verrührt und anschließend wurde 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol hinzugegeben, und die Mischung wurde noch einmal 15 Minuten verrührt, um letztlich mit wasserfreiem Aceton im Verhältnis 1:1 versetzt zu werden. Die drei oben genannten Bestandteile stellen ebenfalls die Basis für das reine Aralditgemisch dar, bei dem auf das Aceton verzichtet wurde. Nach dem erneuten Umsetzen der Prüfkörper in reines Araldit-Gemisch am 3. Tag der Einbettung wurden die Proben für 48 Stunden bei 65 °C im Brutschrank inkubiert, um dem Aralditkunststoff die Möglichkeit der vollständigen Auspolymerisation zu geben. Im nächsten Schritt wurden die auspolymerisierten Präparate an der Schleifmaschine substanzreduziert und zu einer geometrischen Form geschliffen, die eine zweifelsfreie Orientierung im Präparat selbst ermöglicht. Die Dentinoberfläche zeigte in diesem Arbeitsschritt Richtung Boden. Im Fall der Schmelzprüfkörper wurde das durch das Osmiumtetroxid braun verfärbte, deutlich zu erkennende Dentin an der Schleifmaschine vollkommen abgeschliffen. Der nach der Reduzierung der Präparate bestehende Rest Schmelz wurde nun mit 1 N HCL herausgelöst. Dieser Vorgang wurde im Auflichtmikroskop kontrolliert, um eine vollständige Entfernung des Schmelzes (Schmelzprüfkörper) zu gewährleisten. Nach dem Herauslösen der Zahnhartsubstanzen, einer kurzen Reinigung der Präparate mit Braun Wasser und einer Trocknung bei Raumtemperatur konnte die Gegenbettung der Proben mit Hilfe einer Kanülenspritze erfolgen. Hierbei wurde erneut reines Aralditgemisch über die Kavitätenränder eingebracht, um den durch Entfernung der Zahnhartsubstanz entstandenen Hohlraum gleichmäßig aufzufüllen. Im Fall der Dentinproben erfolgte keine Demineralisation der Zahnhartsubstanz. Die so vorbereiteten Proben wurden schließlich bis zur Schnittebene angeschliffen (1200 Grit), poliert (4000 Grit) und final zurechtgetrimmt. Nach Beendigung dieser Arbeit war es möglich aus den Proben mittels eines Diamantmessers Ultradünnschnitte herzustellen (65 nm). Um die Schnitte auf die Elektronenmikroskopgrids (Kupfergrid Schlitzblende) aufzubringen, welche das Mikroskopieren als Träger ermöglichen sollten, mussten jene Grids zunächst befilmt werden. Zur Herstellung dieses Trägerfilms diente 1,3%iges Pioloform, welches in einen Tropftrichter als Befilmungsapparatur gefüllt wurde. Die Ultradünnschnitte wurden anschließend kontrastiert. Dies erfolgte mit Hilfe von Uranyless- Fertiglösung und Bleicitratfertiglösung. Somit wurde eine kontrastreiche Darstellung der einzelnen Strukturen unter dem Mikroskop ermöglicht. Das verwendete Mikroskop war das Tecnai 12 der Firma FEI, Eindhoven, Niederlande.

Als Analyseprogramm zur Auswertung der entstandenen Bilder wurde das iTEM- Programm der Firma ResAlta Research Technologies verwendet. Auf diese Weise wurden pro Probekörper etwa 7 Bilder verschiedener Vergrößerung angefertigt. Es wurde jeweils bei mindestens einer der Aufnahmen pro Probe die Biofilmdicke gemessen und digital eingezeichnet.

## 5 Ergebnisse

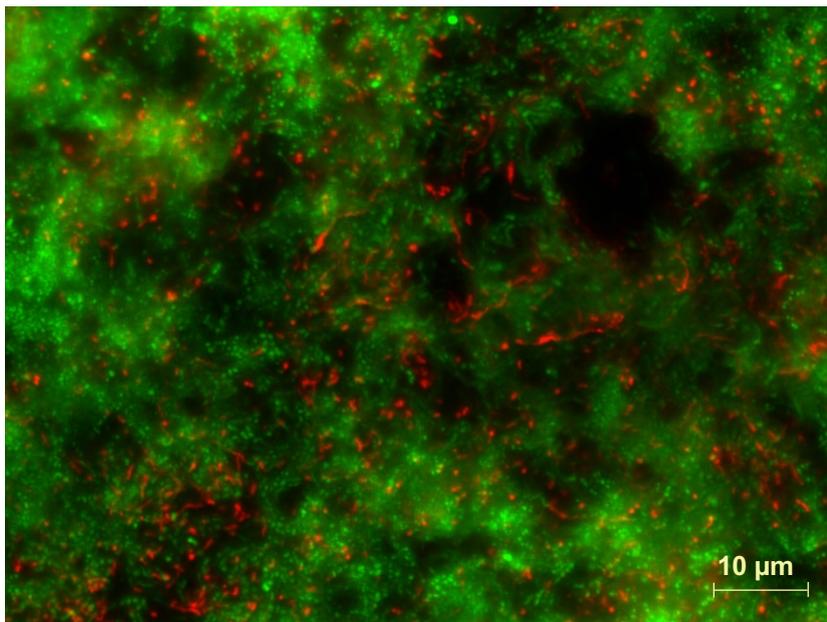
### 5.1 Fluoreszenzmikroskopie

#### 5.1.1 Biofilmbildung auf Schmelz

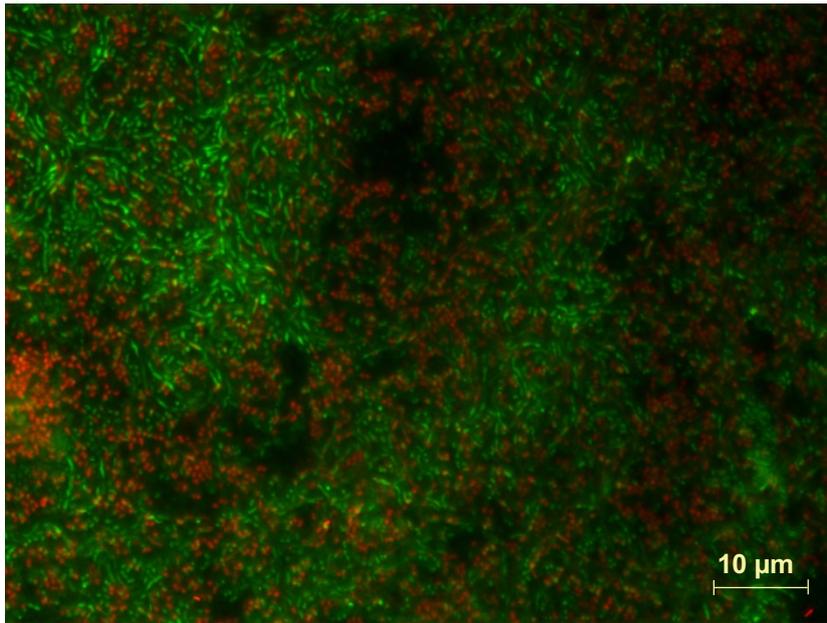
Im Folgenden werden zunächst jeweils zwei repräsentative Bilder gezeigt und schließlich eine tabellarische Übersicht der Bilder. Darauf folgt eine Tabelle mit den mittels ImageJ semi-quantitativ ausgewerteten Werten für die bakterielle Vitalität sowie für das Ausmaß der Biofilmbesiedlung der Proben.

##### **Kontrolle (Spülung mit Wasser)**

Die Schmelzprüfkörper der Probanden zeigen eine flächenhafte Bedeckung mit Biofilm. Es lassen sich stäbchenförmige und kokkoide Bakterien erkennen und der Anteil grün eingefärbter Mikroorganismen überwiegt (Abb. 9,10).



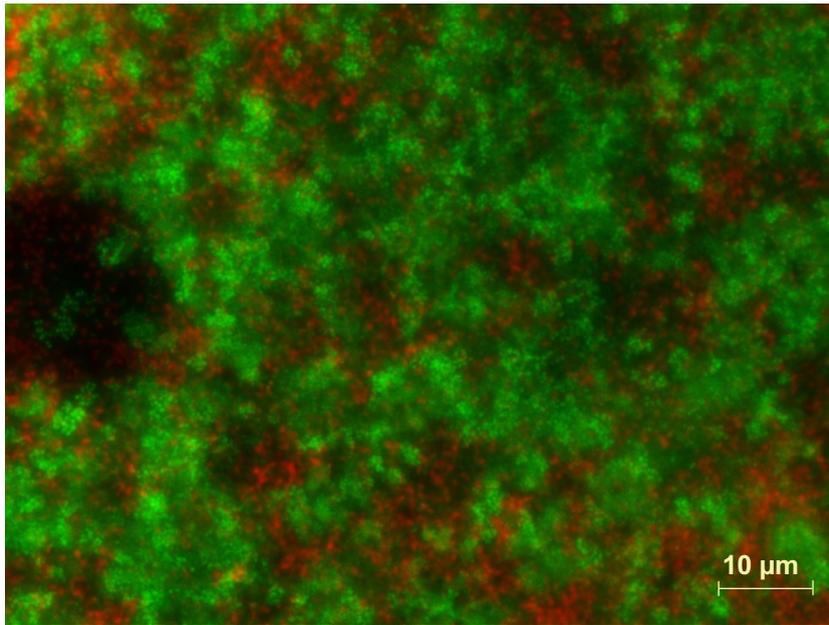
**Abb. 9:** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Biofilms auf Schmelz nach 48 h und regelmäßiger Wasserspülung (Kontrolle) bei 1000-facher Vergrößerung (Live/ Dead Färbung); tote Bakterien stellen sich rot, lebende grün dar; es lassen sich stäbchenförmige und kokkoide Bakterien erkennen, die den Prüfkörperabschnitt vollständig bedecken, es zeigt sich eine ausgeprägte Dominanz grün eingefärbter Zellen.



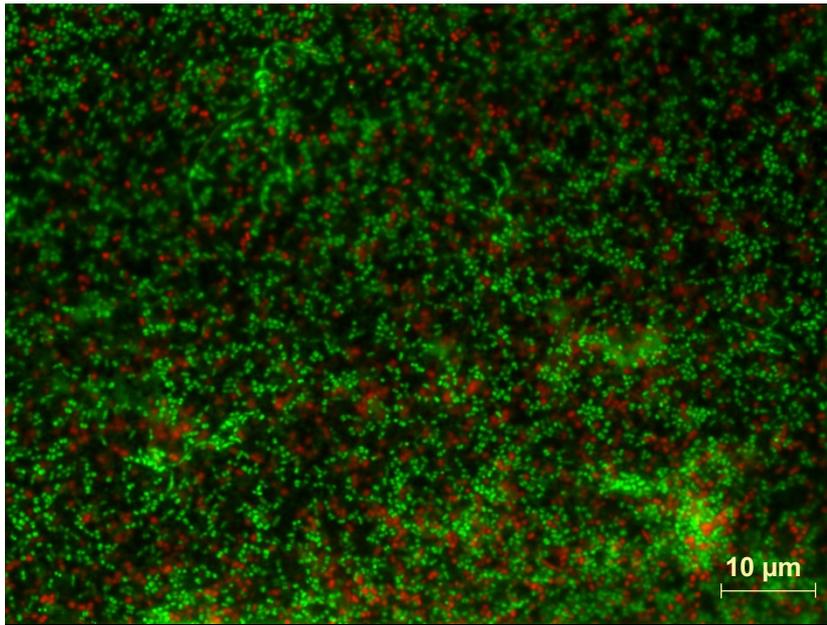
**Abb. 10: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Biofilms auf Schmelz nach 48 h und regelmäßiger Wasserspülung (Kontrolle) bei 1000-facher Vergrößerung (Live/ Dead Färbung); tote Bakterien stellen sich rot, lebende grün dar; es lassen sich stäbchenförmige und kokkoide Bakterien erkennen, die den Prüfkörperabschnitt vollständig bedecken, es zeigt sich eine ausgeprägte Dominanz grün eingefärbter Zellen.**

### **Spülung mit Lysozym**

Nach der Lysozymspülung zeigen die Prüfkörper im Hinblick auf die Biofilmbildung keine Unterschiede zu den Proben der Kontrollversuche mit Wasser. Der Biofilm bedeckt den Großteil der Probenoberfläche und die Anzahl grün eingefärbter Mikroorganismen überwiegt (Abb.11,12).



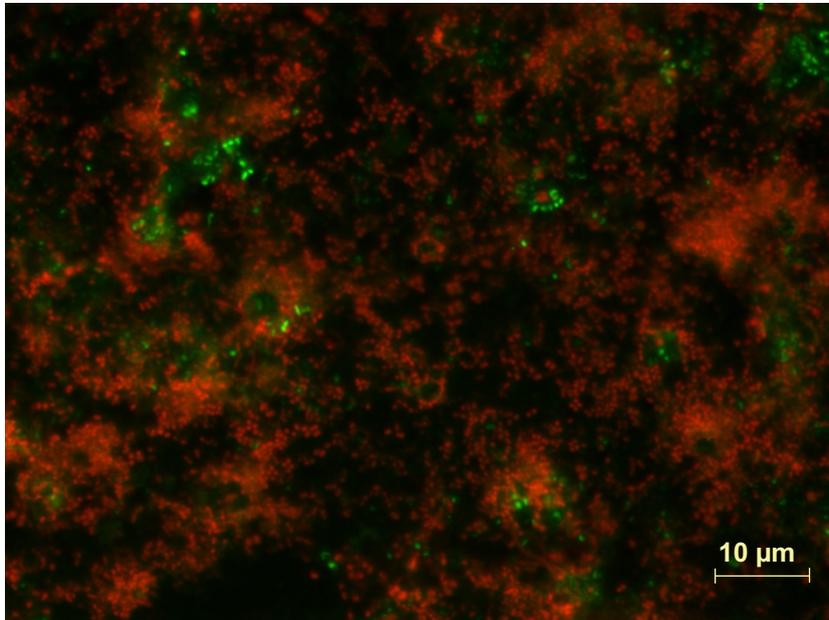
**Abb. 11: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Biofilms auf Schmelz nach 48 h und regelmäßiger Spülung mit Lysozym bei 1000-facher Vergrößerung (Live/ Dead Färbung); tote Bakterien stellen sich rot, lebende grün dar; es lassen sich stäbchenförmige und kokkoide Bakterien erkennen, die den Prüfkörperabschnitt vollständig bedecken, es zeigt sich eine ausgeprägte Dominanz grün eingefärbter Zellen.**



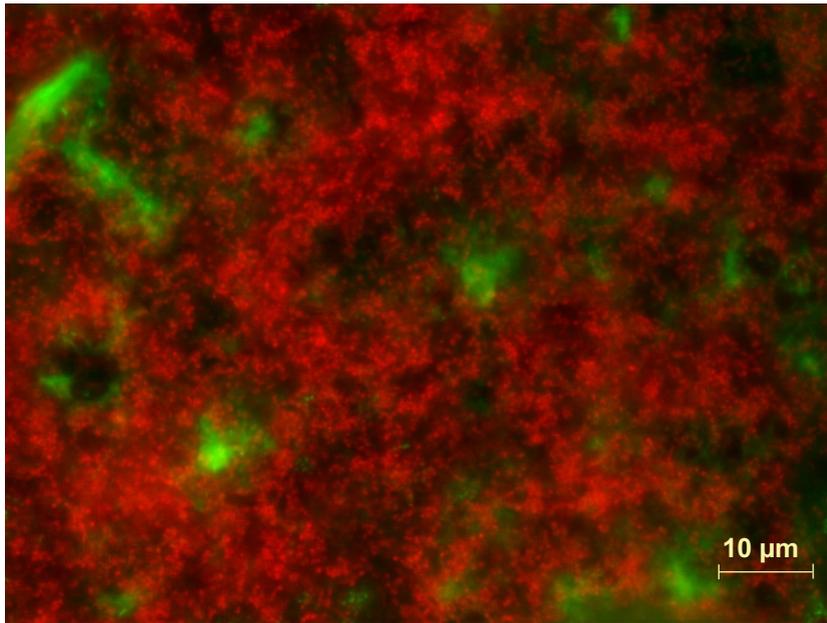
**Abb. 12:** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Biofilms auf Schmelz nach 48 h und regelmäßiger Spülung mit Lysozym bei 1000-facher Vergrößerung (Live/ Dead Färbung); tote Bakterien stellen sich rot, lebende grün dar; es lassen sich stäbchenförmige und kokkoide Bakterien erkennen, die den Prüfkörperabschnitt vollständig bedecken, es zeigt sich eine ausgeprägte Dominanz grün eingefärbter Zellen.

### Spülung mit Ölsäure

Nach Ölsäurespülung zeigen die Schmelzprüfkörper eine flächenhafte Bedeckung mit Biofilm, während das Verhältnis toter zu lebender Bakterien klar hin zu toten Organismen verschoben ist (Abb. 13,14).



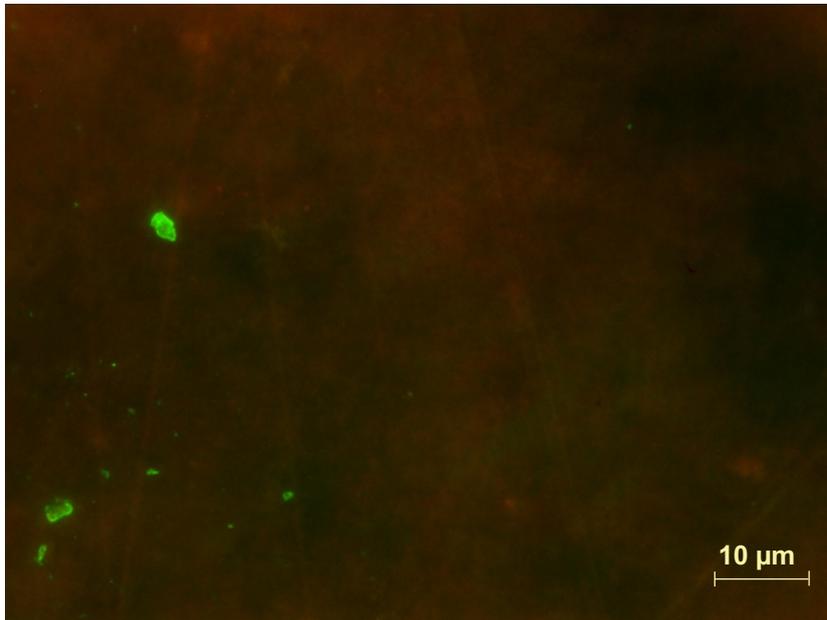
**Abb. 13:** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Biofilms auf Schmelz nach 48 h und regelmäßiger Spülung mit Ölsäure bei 1000-facher Vergrößerung (Live/ Dead Färbung); tote Bakterien stellen sich rot, lebende grün dar; es lassen sich stäbchenförmige und kokkoide Bakterien erkennen, die den Prüfkörperabschnitt vollständig bedecken, es zeigt sich eine ausgeprägte Dominanz rot eingefärbter Zellen.



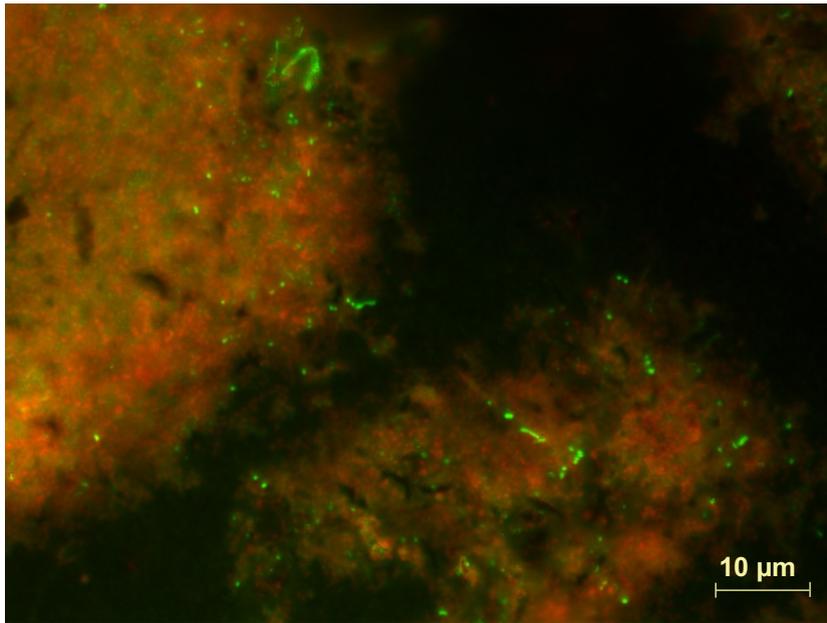
**Abb. 14: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Biofilms auf Schmelz nach 48 h und regelmäßiger Spülung mit Ölsäure bei 1000-facher Vergrößerung (Live/ Dead Färbung); tote Bakterien stellen sich rot, lebende grün dar; es lassen sich stäbchenförmige und kokkoide Bakterien erkennen, die den Prüfkörperabschnitt vollständig bedecken, es zeigt sich eine ausgeprägte Dominanz rot eingefärbter Zellen.**

### **Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt**

Nach Spülung mit Hopfen weisen die Schmelzprüfkörper Veränderungen auf. Im Bereich der gesamten Prüfkörper finden sich sehr große Areale, die keinerlei Biofilm aufweisen (Abb. 15). Jene Areale, die einen vorhandenen Biofilm besitzen, zeigen in selbigem keine flächenhafte Bedeckung und eine deutliche Verschiebung hin zu toten Bakterien (Abb. 16).



**Abb. 15: Fluoreszenzmikroskopische Analyse eines Schmelzprüfkörpers nach 48 h und regelmäßiger Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt bei 1000-facher Vergrößerung (Live/ Dead Färbung); tote Bakterien stellen sich rot, lebende grün dar; es ist kein Biofilm erkennbar, ebenfalls lassen sich auch keine vereinzelt Mikroorganismen erkennen.**

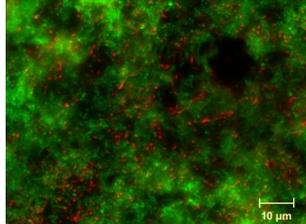
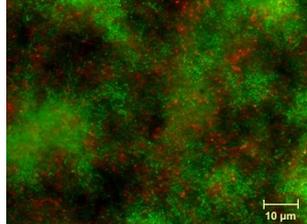
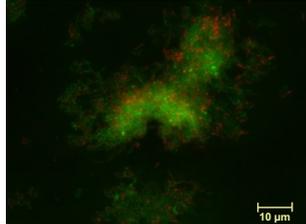
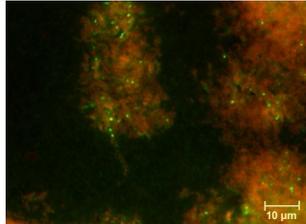
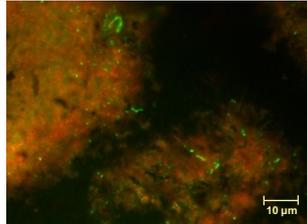
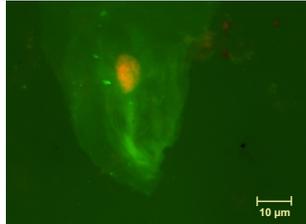
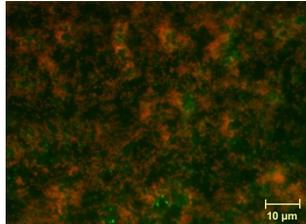
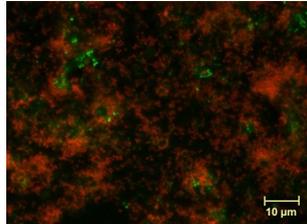
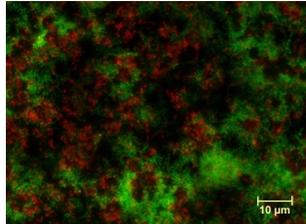


**Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Biofilms auf Schmelz nach 48 h und regelmäßiger Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt bei 1000-facher Vergrößerung (Live/ Dead Färbung); tote Bakterien stellen sich rot, lebende grün dar; es lassen sich stäbchenförmige und kokkoide Bakterien erkennen, die den Prüfkörperabschnitt nicht vollständig bedecken, es zeigt sich eine ausgeprägte Dominanz rot eingefärbter Zellen.**

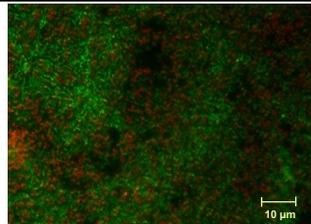
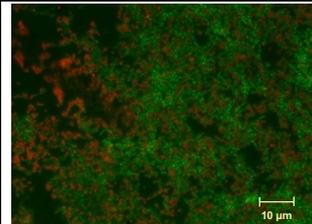
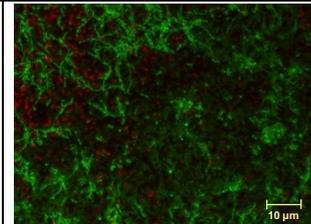
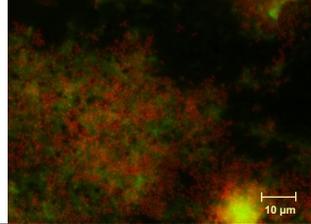
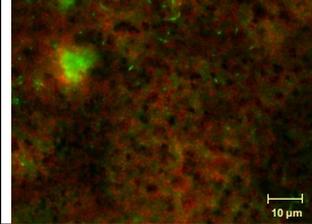
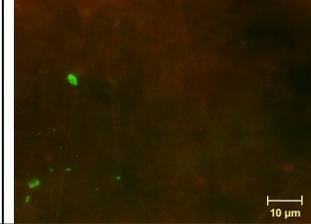
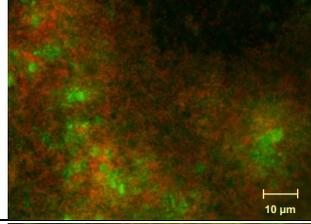
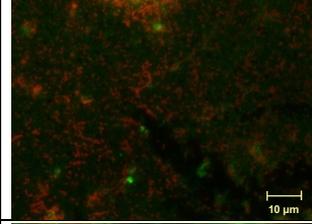
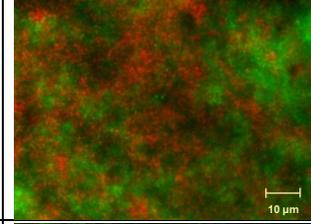
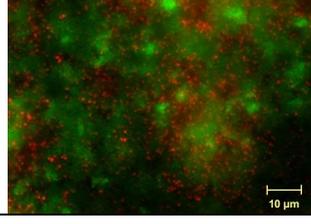
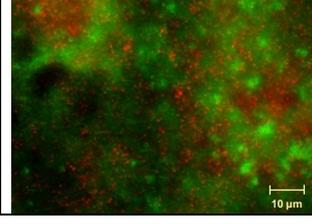
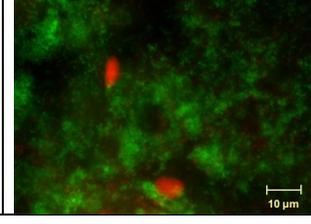
### 5.1.2 Tabellarische Übersicht LD- Bilder Schmelz

Zu besseren Übersicht und zur Vereinfachung des Vergleichs der Bilder untereinander sind einige der ausgewerteten Bilder in tabellarischer Form, sortiert nach Probanden, unten folgend dargestellt (Tab. 3,4,5). Während die Biofilme auf den Kontrollprobekörpern einen Multilayer-Biofilm zeigen, der den Großteil des Prüberkörpers bedeckt und aus überwiegend grün angefärbten Mikroorganismen besteht, weisen die Prüfkörper nach Spülung mit den Testsubstanzen Veränderungen auf.

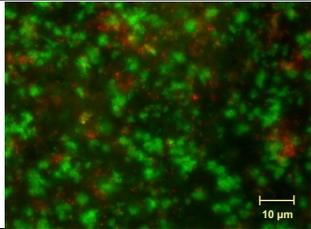
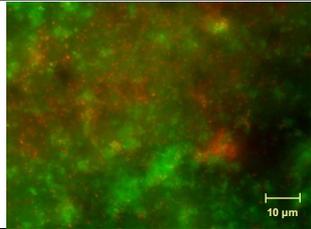
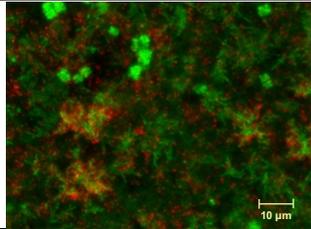
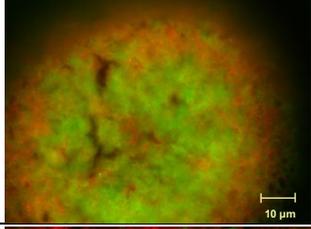
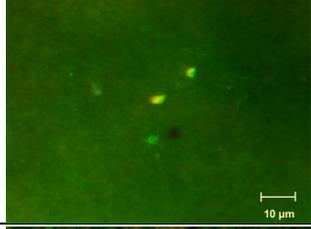
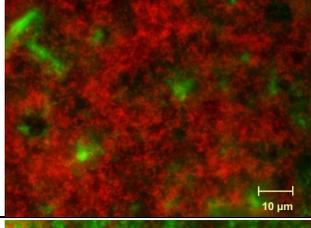
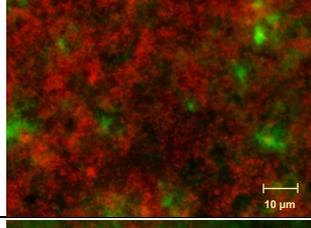
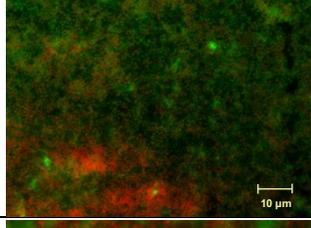
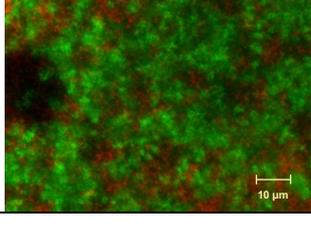
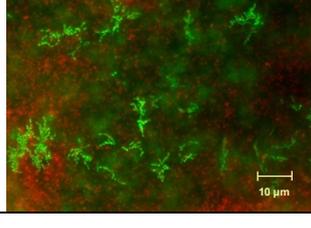
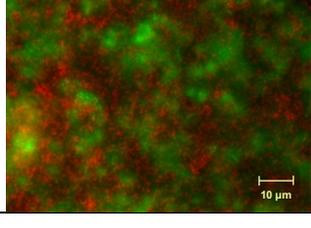
**Tabelle 3: Übersicht fluoreszenzmikroskopischer Bilder des Biofilms nach 48 h Tragezeit und jeweils alle 6 h für 30 Sekunden Spülung mit den Testsubstanzen, Proband 1, Schmelz (1000-fache Vergrößerung und Live/ Dead Färbung)**

<b>Proband 1</b>  <b>Schmelz</b>			
<b>Kontrolle Aqua dest.</b>			
<b>Experimentelles Hopfenextrakt</b>			
<b>Ölsäure</b>			

**Tabelle 4: Übersicht fluoreszenzmikroskopischer Bilder des Biofilms nach 48 h Tragezeit und jeweils alle 6 h für 30 Sekunden Spülung mit den Testsubstanzen, Proband 2, Schmelz (1000-fache Vergrößerung und Live/ Dead Färbung)**

<b>Proband 2</b>			
<b>Schmelz</b>			
<b>Kontrolle Aqua dest.</b>			
<b>Experimentelles Hopfenextrakt</b>			
<b>Ölsäure</b>			
<b>Lysozym 1,4 mg/ml</b>			

**Tabelle 5: Übersicht fluoreszenzmikroskopischer Bilder des Biofilms nach 48 h Tragezeit und jeweils alle 6 h für 30 Sekunden Spülung mit den Testsubstanzen, Proband 3, Schmelz (1000-fache Vergrößerung und Live/ Dead Färbung)**

<b>Proband 3</b>			
<b>Schmelz</b>			
<b>Kontrolle Aqua dest.</b>			
<b>Experimentelles Hopfenextrakt</b>			
<b>Ölsäure</b>			
<b>Lysozym 1,4 mg/ml</b>			

### 5.1.3 Auswertung der Biofilmbildung auf Schmelz

Im Rahmen der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ergaben sich nach semiquantitativer Computer- Auswertung (ImageJ) folgende Werte in Prozent (Tab.6,7):

**Tabelle 6: Mittelwert der Oberflächenbedeckung der Prüfkörper tabellarisch dargestellt in Prozent, Schmelz**

#### **Oberflächenbedeckung (OB)**

OB Schmelz	Kontrolle	Lysozym	Ölsäure	Exp. Hopfen-extrakt
Proband 1	60 %	86 %	62 %	24 %
Proband 2	62 %	76 %	89 %	35 %
Proband 3	88 %	93 %	96 %	18 %

**Tabelle 7: Mittelwert der Vitalität der Bakterien tabellarisch dargestellt in Prozent, Schmelz**

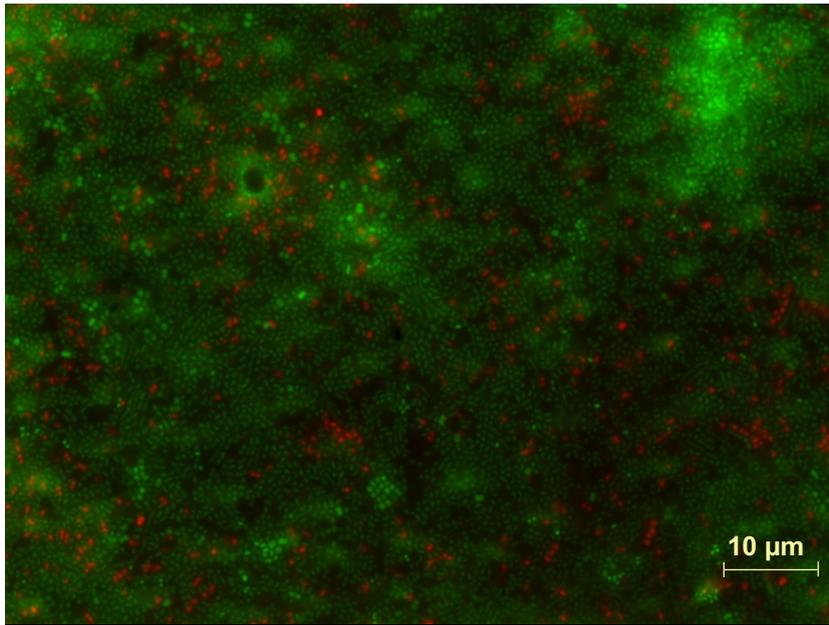
#### **Vitalität**

VITALITÄT Schmelz	Kontrolle	Lysozym	Ölsäure	Exp. Hopfen-extrakt
Proband 1	73 %	66 %	38 %	1 %
Proband 2	74 %	62 %	47 %	20 %
Proband 3	56 %	56 %	43 %	54 %

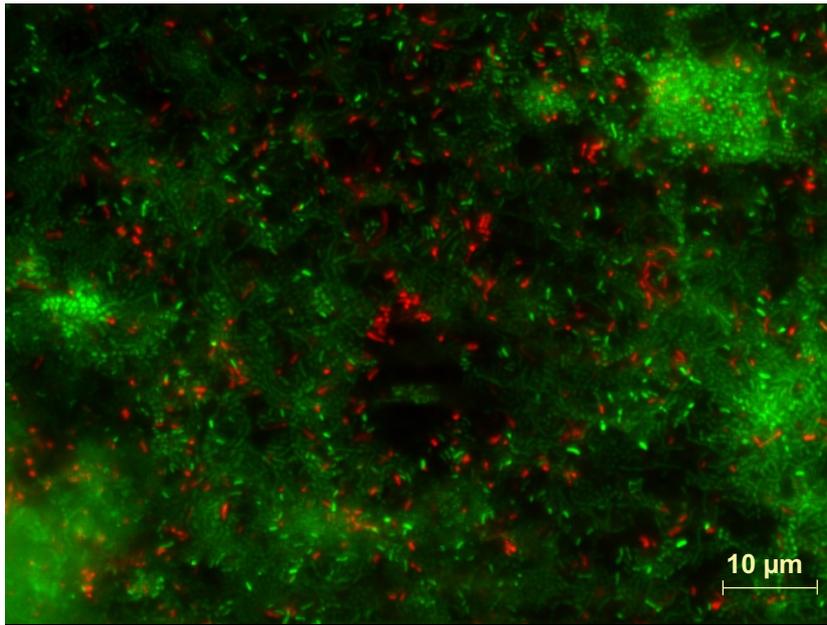
#### 5.1.4 Biofilmbildung auf Dentin

##### Kontrolle (Spülung mit Wasser)

Nach der Spülung mit Wasser zeigen die Dentinprüfkörper eine flächenhafte Bedeckung mit Biofilm. Der Anteil grün eingefärbter Mikroorganismen überwiegt (Abb. 17,18).



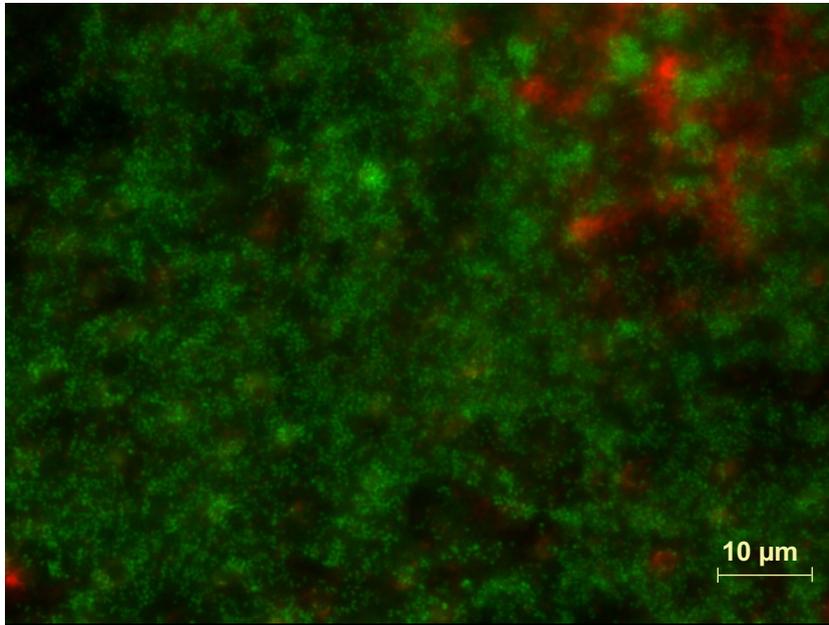
**Abb. 17:** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Biofilms auf Dentin nach 48 h und regelmäßiger Wasserspülung (Kontrolle) bei 1000-facher Vergrößerung (Live/ Dead Färbung); tote Bakterien stellen sich rot, lebende grün dar; es lassen sich stäbchenförmige und kokkoide Bakterien erkennen, die den Prüfkörperabschnitt vollständig bedecken, es zeigt sich eine ausgeprägte Dominanz grün eingefärbter Zellen.



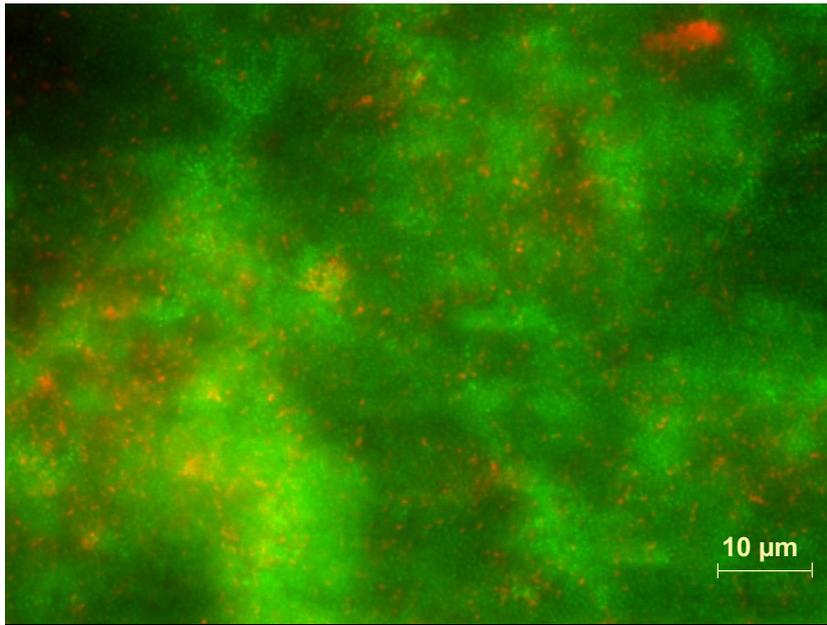
**Abb. 18:** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Biofilms auf Dentin nach 48 h und regelmäßiger Wasserspülung (Kontrolle) bei 1000-facher Vergrößerung (Live/ Dead Färbung); tote Bakterien stellen sich rot, lebende grün dar; es lassen sich stäbchenförmige und kokkoide Bakterien erkennen, die den Prüfkörperabschnitt vollständig bedecken, es zeigt sich eine ausgeprägte Dominanz grün eingefärbter Zellen.

### Spülung mit Lysozym

Nach Spülung mit Lysozym zeigen die Prüfkörper auch Ähnlichkeit mit den Prüfkörpern der Kontrolle mit Wasser. Der Biofilm bedeckt den Großteil der Probenoberfläche und der Anteil grün eingefärbter Mikroorganismen überwiegt (Abb.19,20).



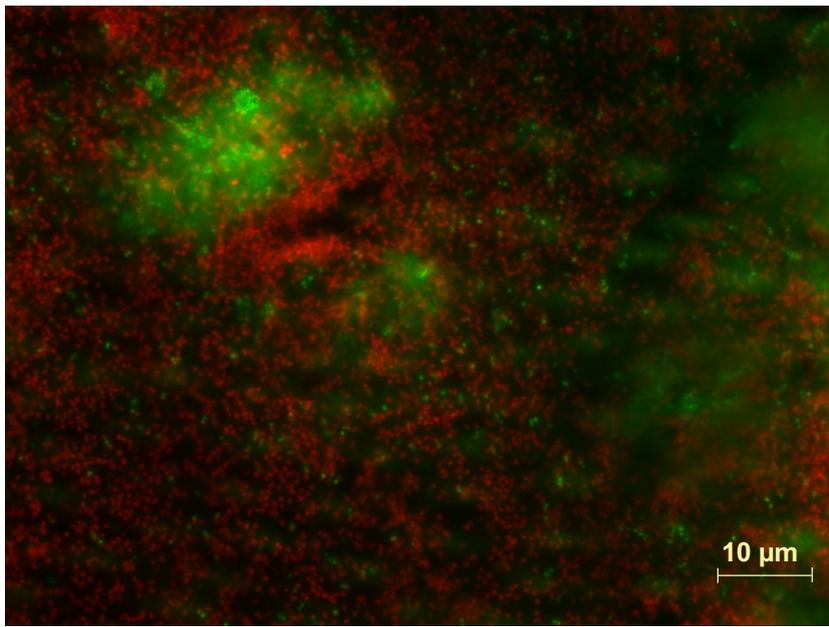
**Abb. 19:** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Biofilms auf Dentin nach 48 h und regelmäßiger Spülung mit Lysozym bei 1000-facher Vergrößerung (Live/ Dead Färbung); tote Bakterien stellen sich rot, lebende grün dar; es lassen sich stäbchenförmige und kokkoide Bakterien erkennen, die den Prüfkörperabschnitt vollständig bedecken, es zeigt sich eine ausgeprägte Dominanz grün eingefärbter Zellen.



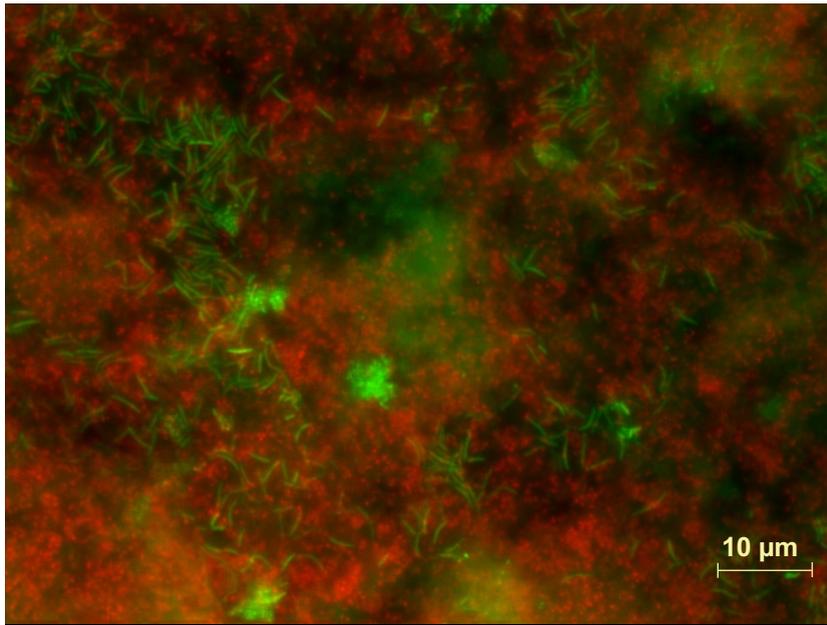
**Abb. 20:** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Biofilms auf Dentin nach 48 h und regelmäßiger Spülung mit Lysozym bei 1000-facher Vergrößerung (Live/ Dead Färbung); tote Bakterien stellen sich rot, lebende grün dar; es lassen sich stäbchenförmige und kokkoide Bakterien erkennen, die den Prüfkörperabschnitt fast vollständig bedecken, es zeigt sich eine ausgeprägte Dominanz grün eingefärbter Zellen.

### Spülung mit Ölsäure

Nach Spülung mit Ölsäure zeigen die Dentinprüfkörper eine Veränderung des vorhandenen Biofilms. Die Bedeckung des Prüfkörpers zeigt keinen Unterschied zur Kontrolle, während das Verhältnis der durch Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung eingefärbten Mikroorganismen auch hier zu rot eingefärbten Zellen hin verschoben ist (Abb. 21,22).



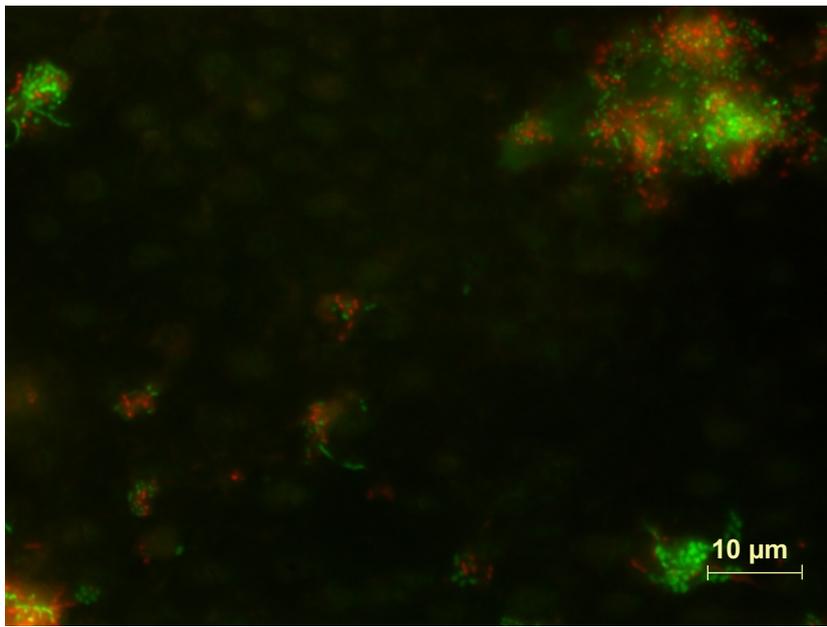
**Abb. 21: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Biofilms auf Dentin nach 48 h und regelmäßiger Spülung mit Ölsäure bei 1000-facher Vergrößerung (Live/ Dead Färbung); tote Bakterien stellen sich rot, lebende grün dar; es lassen sich stäbchenförmige und kokkoide Bakterien erkennen, die den Prüfkörperabschnitt vollständig bedecken, es zeigt sich eine ausgeprägte Dominanz rot eingefärbter Zellen.**



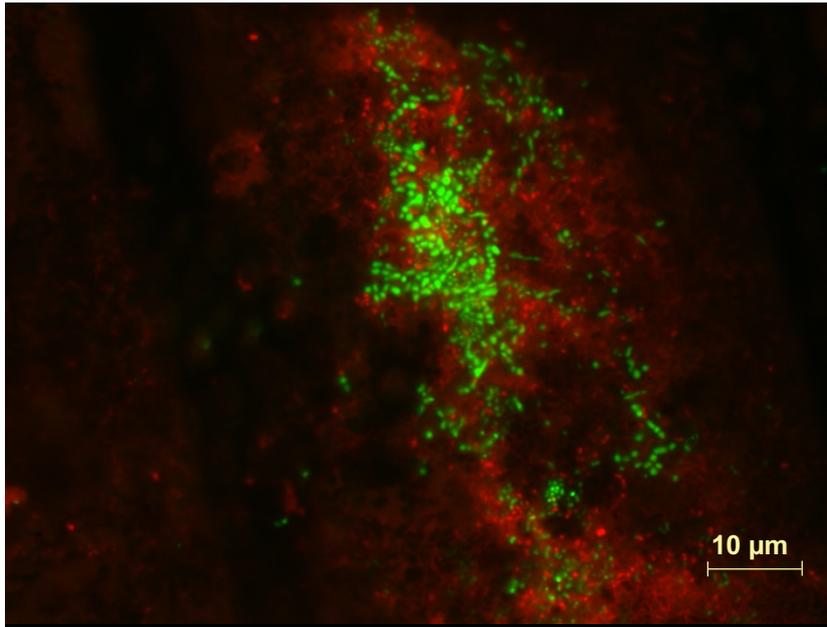
**Abb. 22: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Biofilms auf Dentin nach 48 h und regelmäßiger Spülung mit Ölsäure bei 1000-facher Vergrößerung (Live/ Dead Färbung); tote Bakterien stellen sich rot, lebende grün dar; es lassen sich stäbchenförmige und kokkoide Bakterien erkennen, die den Prüfkörperabschnitt vollständig bedecken, es zeigt sich eine ausgeprägte Dominanz rot eingefärbter Zellen.**

### **Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt**

Auch im Dentin zeigen sich nach Anwendung der Hopfenspüllösung beeindruckende Ergebnisse. Die Bedeckung des Prüfkörpers mit Biofilm erscheint stark reduziert, und auch eine Verringerung des Lebendzellanteils ist erkennbar, wenn auch etwas weniger stark ausgeprägt als auf den Schmelzprüfkörpern (Abb. 23,24).



**Abb. 23: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Dentinprüfkörpers nach 48 h und regelmäßiger Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt bei 1000-facher Vergrößerung (Live/ Dead Färbung); tote Bakterien stellen sich rot, lebende grün dar; lassen sich stäbchenförmige und kokkoide Bakterien erkennen, die nur einen geringen Teil der Prüfkörperoberfläche bedecken, es zeigt sich eine Dominanz rot eingefärbter Zellen; im Hintergrund sind die dezent grün fluoreszierenden Dentintubuli erkennbar.**



**Abb. 24:** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Biofilms auf Dentin nach 48 h und regelmäßiger Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt bei 1000-facher Vergrößerung (Live/ Dead Färbung); tote Bakterien stellen sich rot, lebende grün dar; lassen sich stäbchenförmige und kokkoide Bakterien erkennen, die den Prüfkörperabschnitt nicht vollständig bedecken, es zeigt sich eine Dominanz rot eingefärbter Zellen.

### 5.1.5 Tabellarische Übersicht der LD- Bilder Dentin

Zu besseren Übersicht und zur Vereinfachung des Vergleichs der Bilder untereinander sind einige der ausgewerteten Bilder in tabellarischer Form, sortiert nach Probanden, unten folgend dargestellt (Tab. 8,9,10). Während auch hier die Mikroorganismen auf den Kontrollprobekörpern in einem Multilayer-Biofilm organisiert sind, der den Großteil des Prüberkörpers bedeckt und aus überwiegend grün angefärbten Mikroorganismen besteht, weisen die Prüfkörper nach Spülung mit den Testsubstanzen Veränderungen auf.

**Tabelle 8: Übersicht fluoreszenzmikroskopischer Bilder des Biofilms nach 48 h Tragezeit und jeweils alle 6 h für 30 Sekunden Spülung mit den Testsubstanzen, Proband 1, Dentin (1000-fache Vergrößerung und Live/ Dead Färbung)**

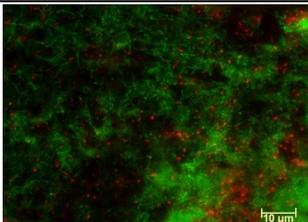
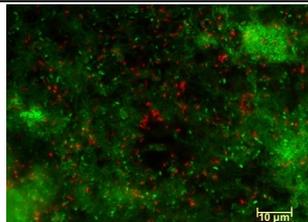
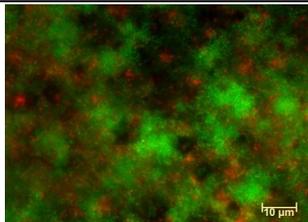
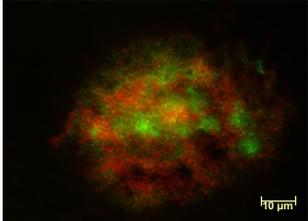
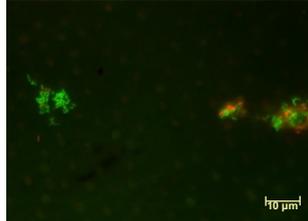
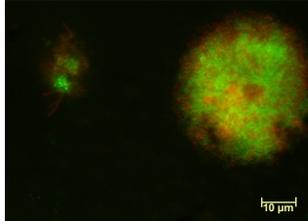
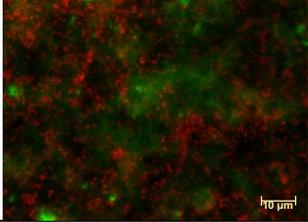
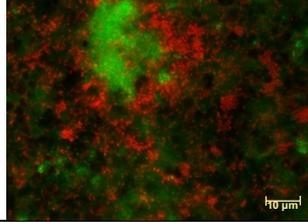
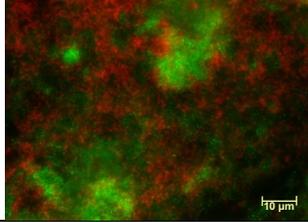
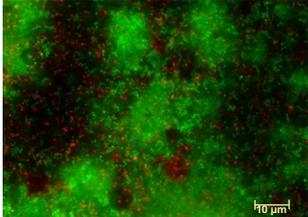
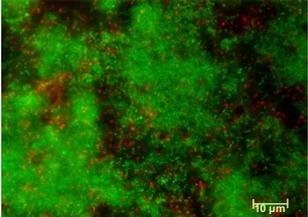
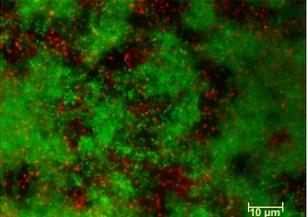
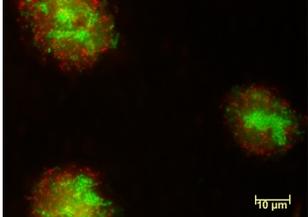
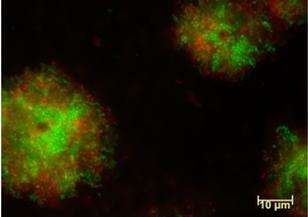
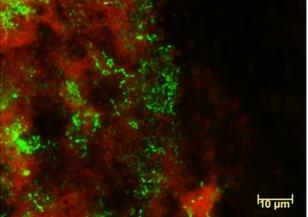
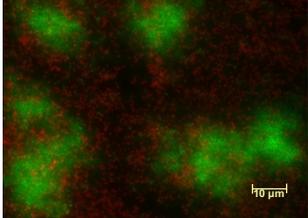
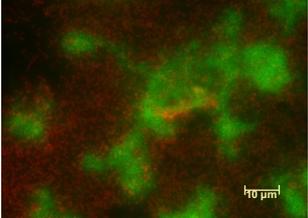
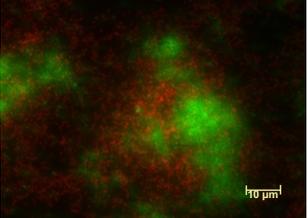
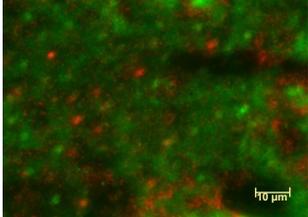
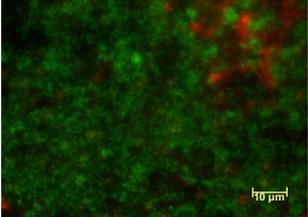
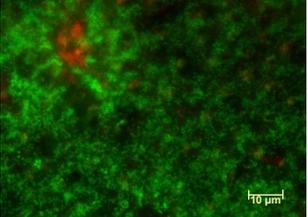
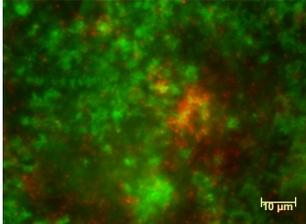
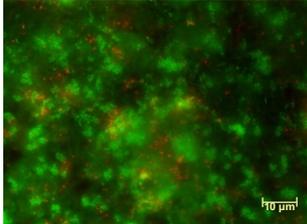
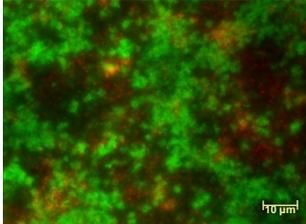
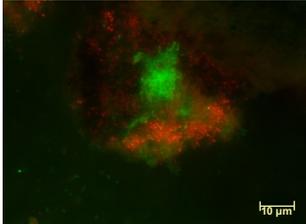
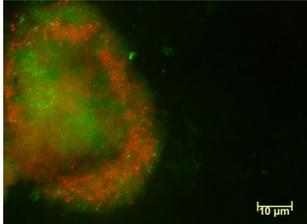
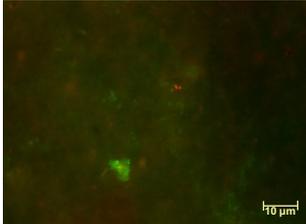
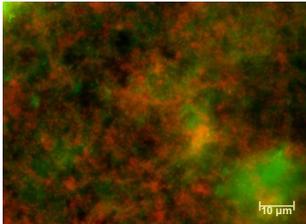
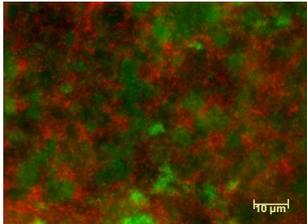
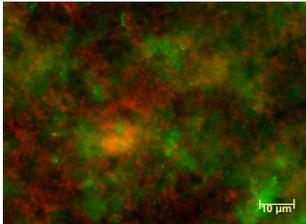
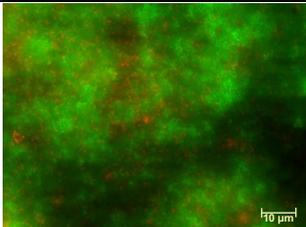
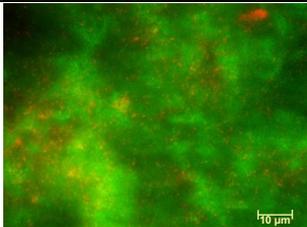
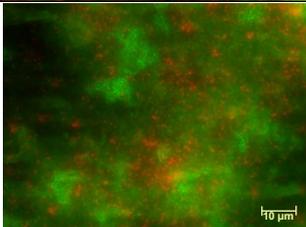
<b>Proband 1</b>  <b>Dentin</b>			
<b>Kontrolle Aqua dest.</b>			
<b>Experimentelles Hopfenextrakt</b>			
<b>Ölsäure</b>			

Tabelle 9: Übersicht fluoreszenzmikroskopischer Bilder des Biofilms nach 48 h Tragezeit und jeweils alle 6 h für 30 Sekunden Spülung mit den Testsubstanzen, Proband 2, Dentin (1000-fache Vergrößerung und Live/ Dead Färbung)

<b>Proband 2</b>  <b>Dentin</b>			
<b>Kontrolle Aqua dest.</b>			
<b>Experimentelles Hopfenextrakt</b>			
<b>Ölsäure</b>			
<b>Lysozym 1,4 mg/ml</b>			

**Tabelle 10: Übersicht fluoreszenzmikroskopischer Bilder des Biofilms nach 48 h Tragezeit und jeweils alle 6 h für 30 Sekunden Spülung mit den Testsubstanzen, Proband 3, Dentin (1000-fache Vergrößerung und Live/ Dead Färbung)**

<b>Proband 3</b>  <b>Dentin</b>			
<b>Kontrolle Aqua dest.</b>			
<b>Experimentelles Hopfenextrakt</b>			
<b>Ölsäure</b>			
<b>Lysozym 1,4 mg/ml</b>			

### 5.1.6 Auswertung Biofilmbildung Dentin

Im Rahmen der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ergaben sich nach semiquantitativer Computer- Auswertung (ImageJ) folgende Werte in Prozent (Tab. 11,12):

**Tabelle 11: Mittelwert der Oberflächenbedeckung der Prüfkörper tabellarisch dargestellt in Prozent, Dentin**

#### Oberflächenbedeckung (OB)

OB Dentin	Kontrolle	Lysozym	Ölsäure	Exp. Hopfenextrakt
Proband 1	78 %	83 %	59 %	23 %
Proband 2	92 %	87 %	71 %	47 %
Proband 3	88 %	79 %	95 %	14 %

**Tabelle 12: Mittelwert der Vitalität der Bakterien tabellarisch dargestellt in Prozent, Dentin**

#### Vitalität

VITALITÄT Dentin	Kontrolle	Lysozym	Ölsäure	Exp. Hopfenextrakt
Proband 1	75 %	62 %	44 %	42 %
Proband 2	82 %	76 %	39 %	41 %
Proband 3	81 %	65 %	43 %	65 %

### 5.1.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

#### **Lysozym**

Anhand der Werte lässt sich ablesen, dass sich im Fall des Lysozyms keine deutlichen Unterschiede zwischen den Kontrollprüfkörpern und den Probeprüfkörpern erkennen lassen. Sowohl die Ausdehnung des bakteriellen Biofilms als auch die Vitalität der vorhandenen Mikroorganismen zeigen keine deutlichen Unterschiede zur Kontrolle. Auch lassen sich in diesem Fall keine Unterschiede zwischen den Dentin- und den Schmelzoberflächen erkennen.

#### **Ölsäure**

Für die Versuchsreihe der Ölsäureapplikation lassen sich Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle erkennen. Betrachtet man zunächst die Oberflächenbedeckung der Prüfkörper, lässt sich feststellen, dass es hier zu keiner eindeutigen Reduktion der flächenhaften Biofilmbesiedlung kam. Die Ausdehnung der bakteriellen Besiedlung ähnelt derer der Kontrollprüfkörper.

Unterschiede lassen sich jedoch bei näherer Betrachtung der Vitalität der Mikroorganismen erkennen. Die Werte weisen auf eine deutliche Verminderung des Lebendzellanteils hin. Sowohl auf den Dentinprüfkörpern als auch auf den Schmelzprüfkörpern findet sich eine deutliche Verschiebung hin zu toten Bakterien.

#### **Experimentelles Hopfenextrakt**

Das im Rahmen dieser Versuchsreihe benutzte Hopfenextrakt zeigt die deutlichsten Ergebnisse. Sowohl die Bedeckung der Prüfkörper mit bakteriellem Biofilm als auch die Anzahl lebender Mikroorganismen auf dem vorhandenen Biofilm sind eindeutig vermindert. Dieser Effekt lässt sich sowohl auf den Dentinprüfkörpern als auch auf den Schmelzprüfkörpern feststellen.

## 5.2 Rasterelektronenmikroskopie

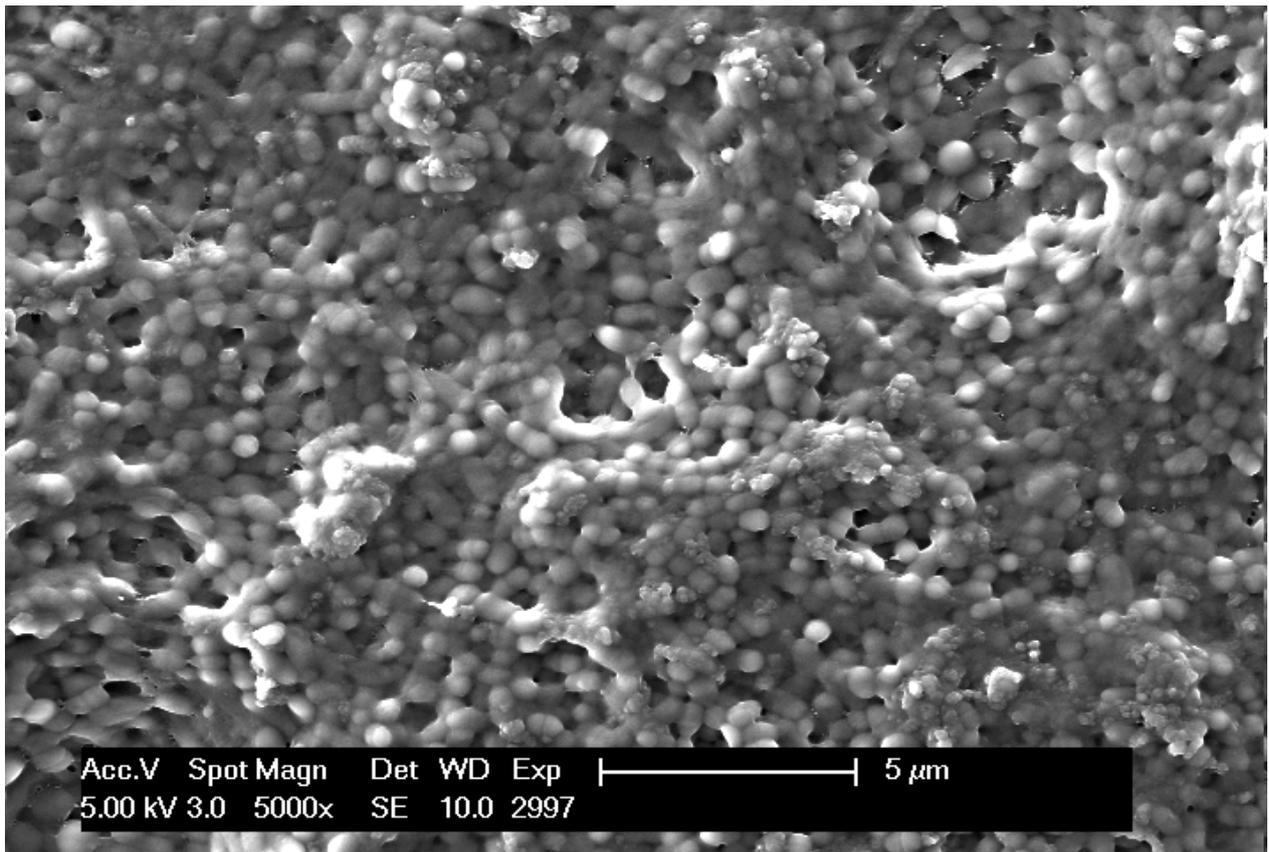
Parallel zu der Fluoreszenzmikroskopie wurde ein Teil der Proben unter dem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Hier wurde vor allem auf die Morphologie des Biofilms und die flächenhafte Verteilung der bakteriellen Besiedlung geachtet. Um die Probekörper miteinander vergleichen zu können, wurde, wie oben bereits beschrieben, zur Auswertung ein Scoring verwendet (siehe Tab.1), welches das Ausmaß bakterieller Besiedlung objektivieren und darstellen sollte.

Auch hier wird zunächst jeweils ein repräsentatives Bild gezeigt, gefolgt von einer tabellarischen Übersicht und einer tabellarischen Darstellung der Scoring- Auswertung.

### 5.2.1 Biofilmbildung auf Schmelz

#### Kontrolle (Spülung mit Wasser)

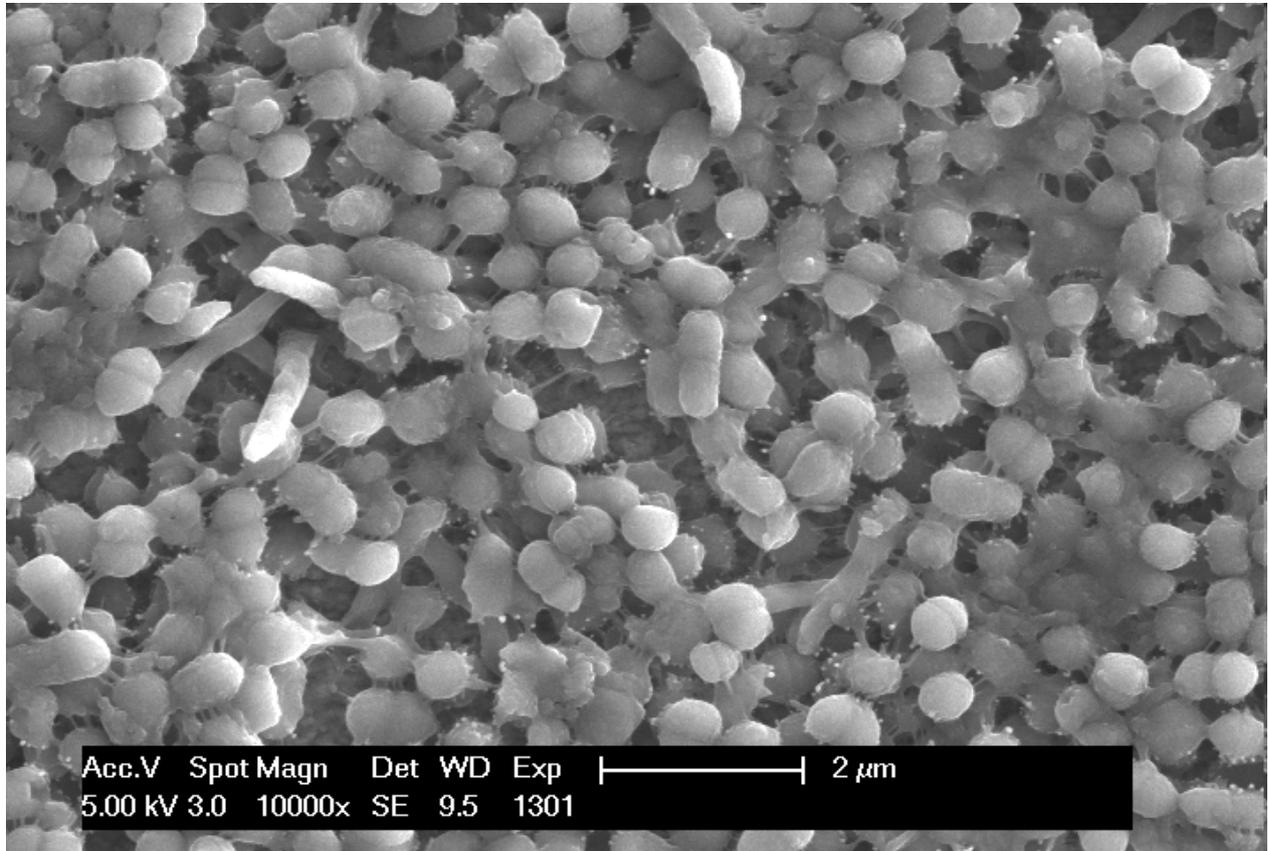
Die REM-Bilder der Prüfkörper nach Spülung mit der Kontrollspüllösung (Wasser) zeigen wie dieses Beispielbild (Abb. 25) einen vielschichtigen, etablierten Biofilm mit multiplen Morphotypen. Der Prüfkörper ist damit zu weit mehr als 50 % bedeckt.



**Abb. 25: REM-Bild des 48 h-Biofilms mit 5000-facher Vergrößerung**  
Kontrollprüfkörper nach regelmäßiger Wasserspülung, Schmelz. Es ist ein dichter und geschlossener Biofilm erkennbar, der sich über den ganzen Probekörperausschnitt erstreckt. In ihm lassen sich hauptsächlich koccoide Bakterienstrukturen erkennen.

### Spülung mit Lysozym

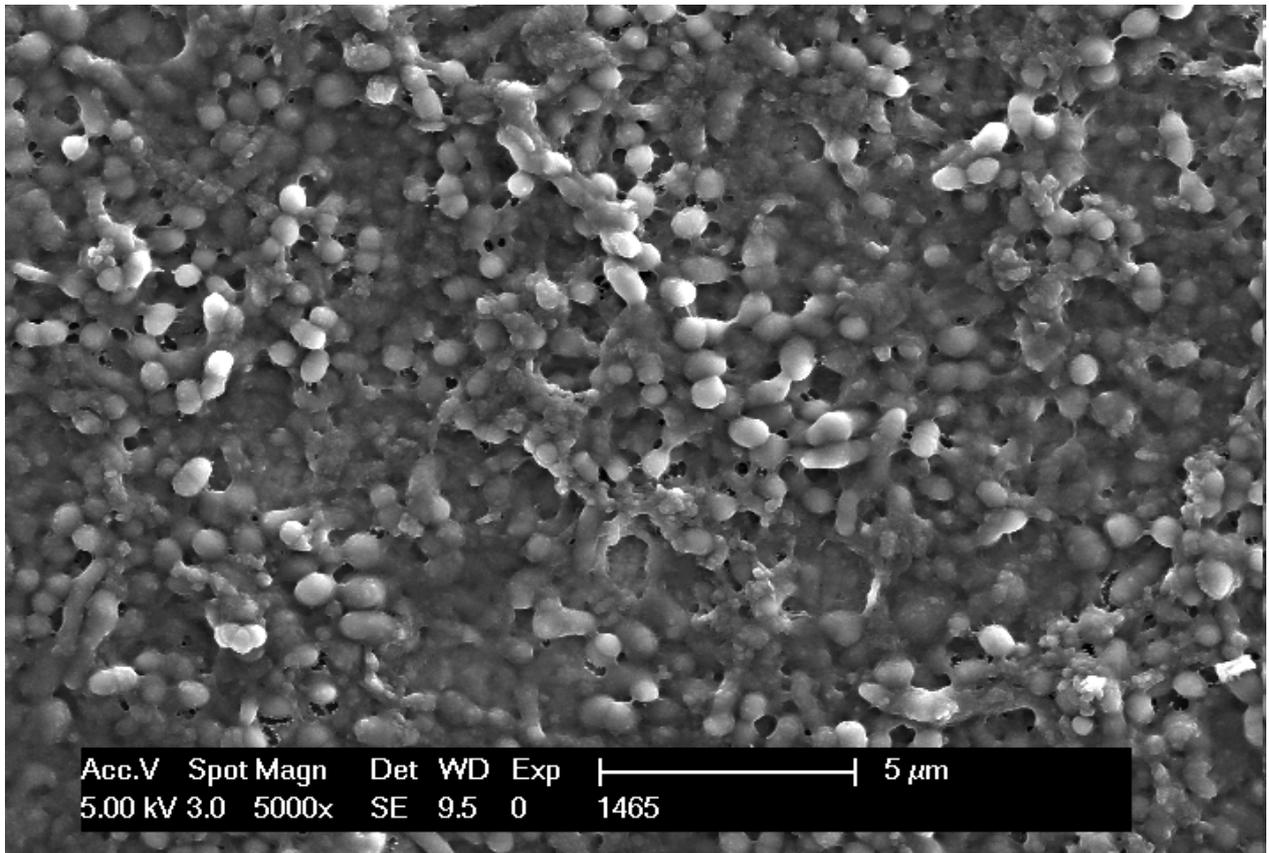
Das Bild der Schmelzprüfkörper nach Lysozymspülung zeigt ebenfalls die breitgefächerte Bakterienmorphologie eines etablierten Multilayer- Biofilms, der sich über die Größe des Prüfkörpers erstreckt (Abb. 26).



**Abb. 26: REM-Bild des 48 h-Biofilms mit 10000-facher Vergrößerung**  
Prüfkörper nach regelmäßiger Lysozymspülung, Schmelz. Es ist ein dichter und geschlossener Biofilm erkennbar, der sich über den ganzen Probekörperausschnitt erstreckt. In ihm lassen sich hauptsächlich kokkoiden Bakterienstrukturen, aber auch einige stabförmige Mikroorganismen erkennen.

### Spülung mit Ölsäure

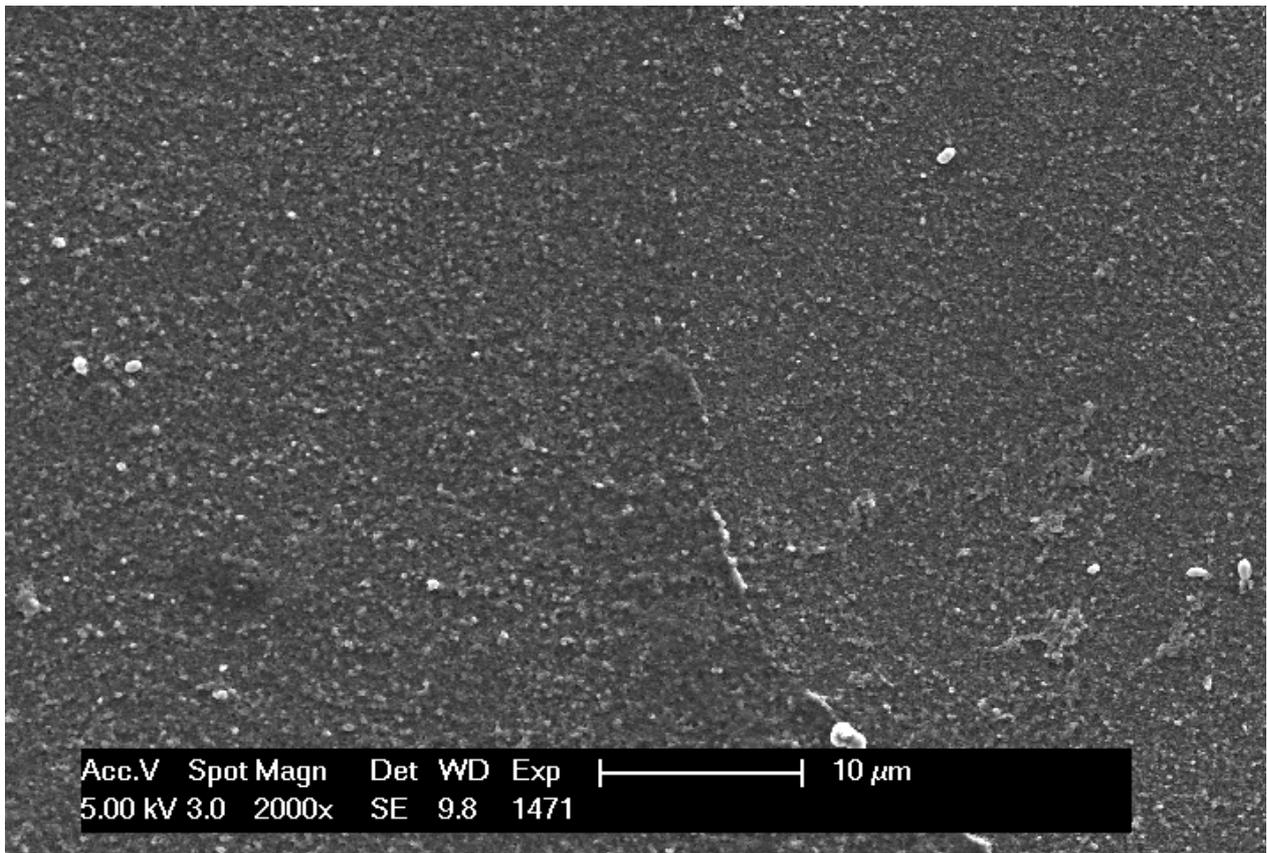
Die Prüfkörper nach Ölsäure zeigen einen flächenhaft ausgedehnten Biofilm. Auch hier lässt sich, wie in diesem exemplarischen Bild, ein dreidimensionaler Bakterienrasen erkennen, der die Fläche des Prüfkörpers in Gänze einnimmt (Abb. 27).



**Abb. 27: REM-Bild des 48 h-Biofilms mit 5000-facher Vergrößerung**  
Prüfkörper nach regelmäßiger Ölsäurespülung, Schmelz. Es ist ein dichter und geschlossener Biofilm erkennbar, der sich über den ganzen Probekörperausschnitt erstreckt. In ihm lassen sich hauptsächlich kokkoide Bakterienstrukturen, aber auch einige stäbchenförmige Mikroorganismen erkennen.

### **Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt**

Analog zu den fluoreszenzmikroskopischen Ergebnissen findet sich auch hier das Bild einer Prüfkörperoberfläche mit stark modifizierter Biofilmbildung (Abb.28). Auf nahezu der gesamten Oberfläche der Prüfkörper lassen sich keine bakteriellen Strukturen erkennen. Lediglich eine amorphe Substanz, die als eine (veränderte) Pellicel interpretiert werden kann, bedeckt die Prüfkörperoberfläche.



**Abb. 28: REM-Bild des 48 h-Biofilms mit 2000-facher Vergrößerung Prüfkörper nach regelmäßiger Hopfenspülung, Schmelz. Es ist kein Biofilm erkennbar; lediglich eine amorphe Substanz bedeckt den Prüfkörperausschnitt.**

### 5.2.2 Tabellarische Übersicht der REM- Bilder von Schmelz

Zu besseren Übersicht und zur Vereinfachung des Vergleichs der REM-Bilder untereinander sind auch hier einige der ausgewerteten Bilder in tabellarischer Form, sortiert nach Probanden, unten folgend dargestellt (Tab. 13,14,15).

**Tabelle 13: Übersicht rasterelektronenmikroskopischer Bilder des Biofilms nach 48 h Tragezeit und jeweils alle 6 h für 30 Sekunden Spülung mit den Testsubstanzen, Proband 1, Schmelz (5000-, 10000- und 20000-fache Vergrößerung)**

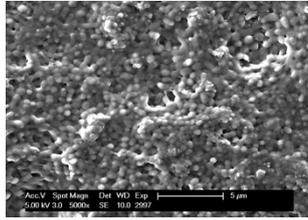
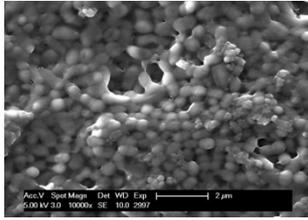
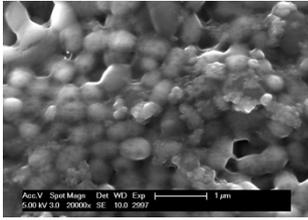
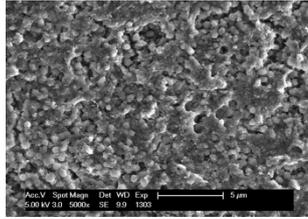
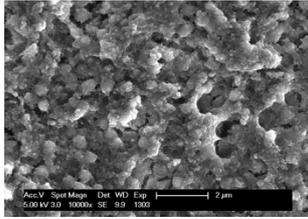
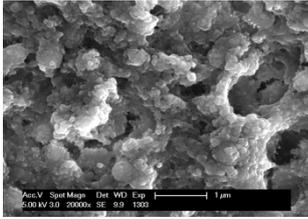
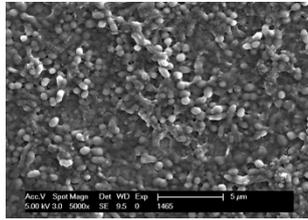
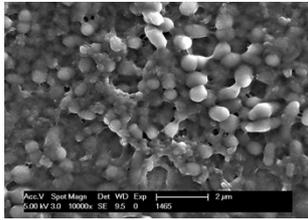
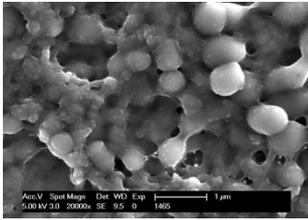
<p><b>Proband 1</b></p> <p><b>Schmelz</b></p>			
<p><b>Kontrolle Aqua dest.</b></p>			
<p><b>Experimentelles Hopfenextrakt</b></p>			
<p><b>Ölsäure</b></p>			

Tabelle 14: Übersicht rasterelektronenmikroskopischer Bilder des Biofilms nach 48 h Tragezeit und jeweils alle 6 h für 30 Sekunden Spülung mit den Testsubstanzen, Proband 2, Schmelz (5000-, 10000- und 20000-fache Vergrößerung)

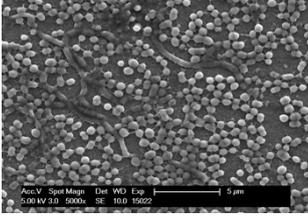
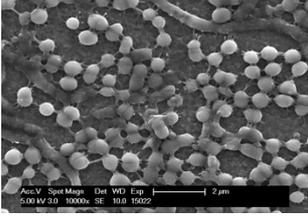
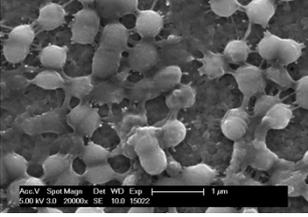
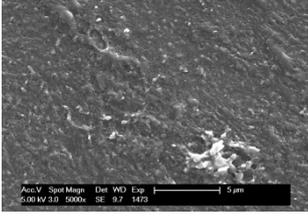
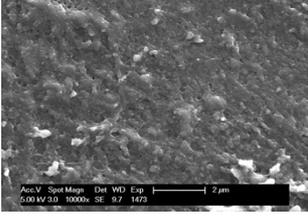
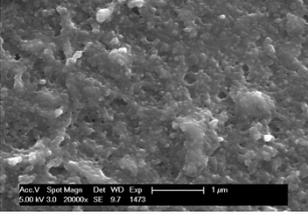
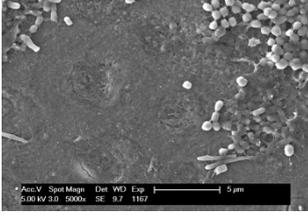
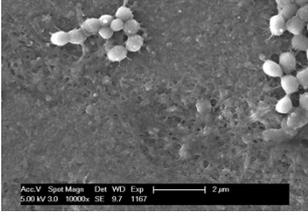
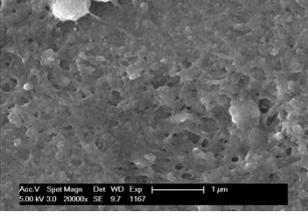
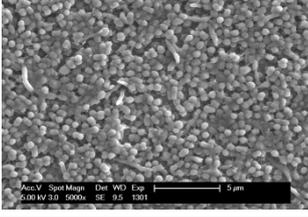
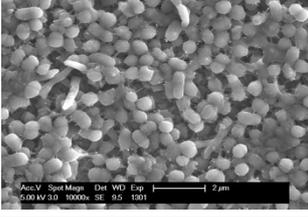
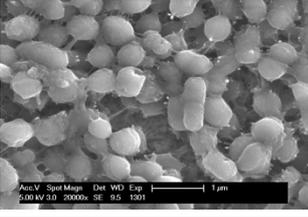
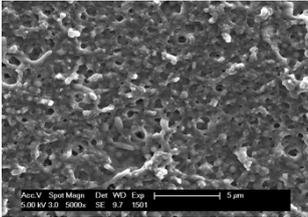
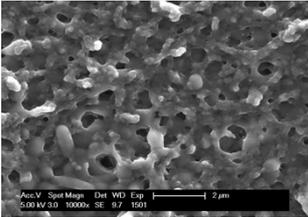
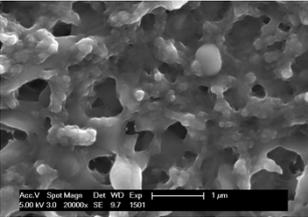
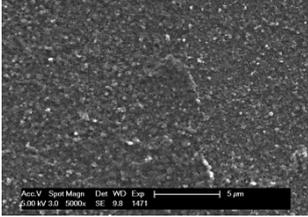
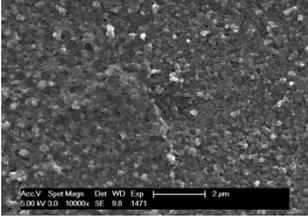
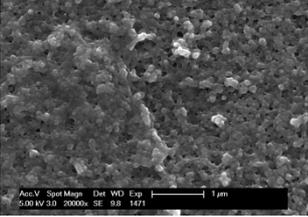
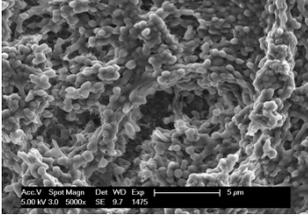
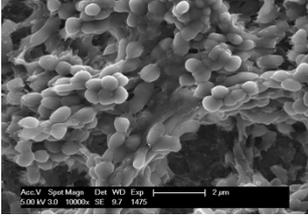
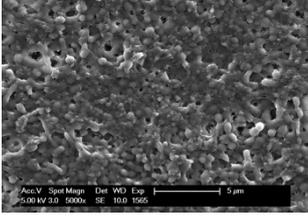
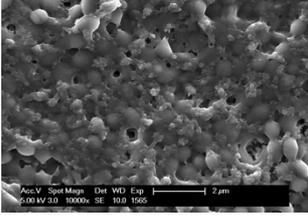
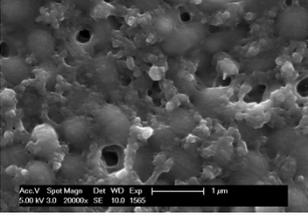
<p><b>Proband 2</b></p> <p><b>Schmelz</b></p>			
<p><b>Kontrolle Aqua dest.</b></p>			
<p><b>Experimentelles Hopfenextrakt</b></p>			
<p><b>Ölsäure</b></p>			
<p><b>Lysozym 1,4 mg/ml</b></p>			

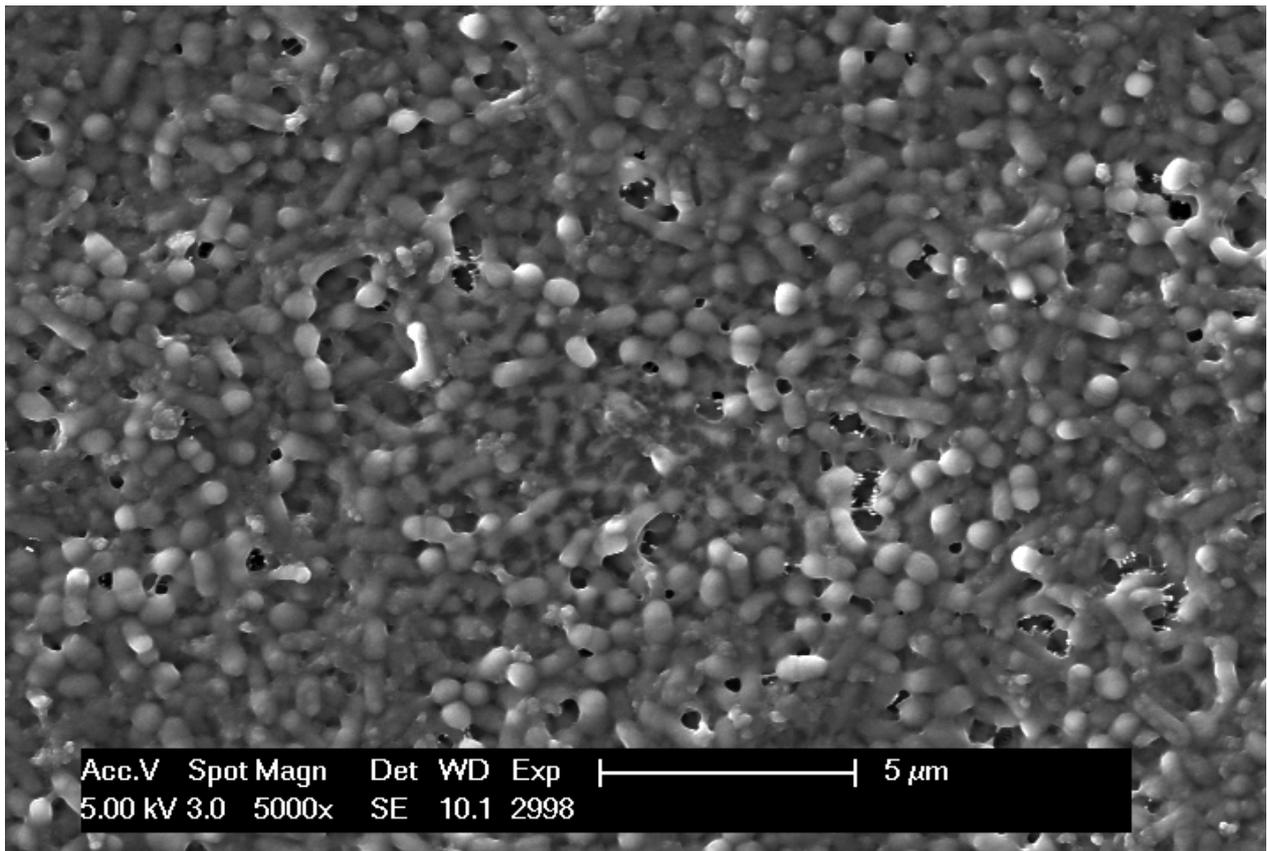
Tabelle 15: Übersicht rasterelektronenmikroskopischer Bilder des Biofilms nach 48 h Tragezeit und jeweils alle 6 h für 30 Sekunden Spülung mit den Testsubstanzen, Proband 3, Schmelz (5000-, 10000- und 20000-fache Vergrößerung)

<p><b>Proband 3</b></p> <p><b>Schmelz</b></p>			
<p><b>Kontrolle Aqua dest.</b></p>			
<p><b>Experimentelles Hopfenextrakt</b></p>			
<p><b>Ölsäure</b></p>			
<p><b>Lysozym 1,4 mg/ml</b></p>			

### 5.2.3 Biofilmbildung auf Dentin

#### Kontrolle (Spülung mit Wasser)

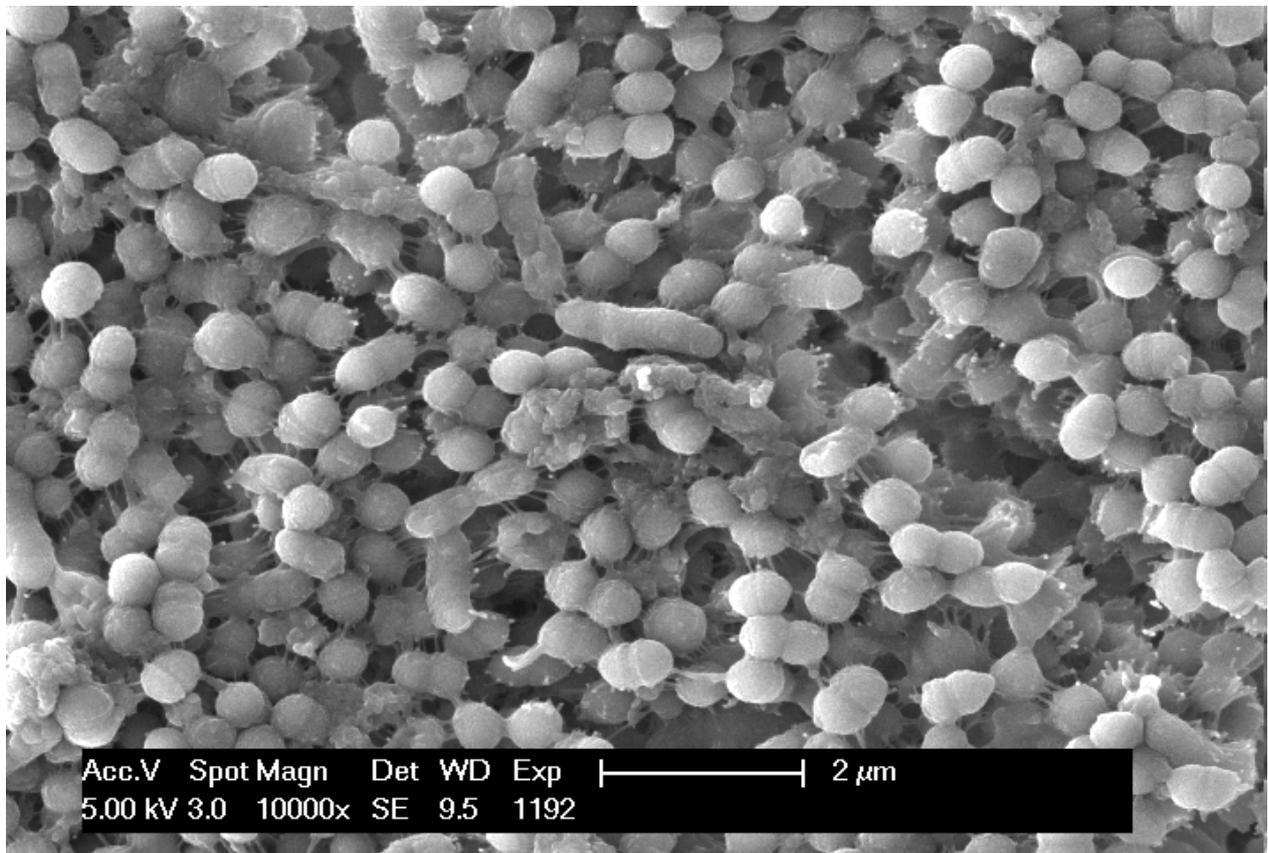
Die Referenzprüfkörper (Dentin) nach Wasserspülung zeigen einen ausgeprägten, breitflächigen Multilayer- Biofilm, wie auf diesem repräsentativen Bild zu sehen (Abb.29).



**Abb. 29: REM-Bild des 48 h-Biofilms mit 5000-facher Vergrößerung Kontrollprüfkörper nach regelmäßiger Wasserspülung, Dentin. Es ist ein dichter und geschlossener Biofilm erkennbar, der sich über den ganzen Probekörperausschnitt erstreckt. In ihm lassen sich hauptsächlich kokkoide Bakterienstrukturen erkennen.**

### Spülung mit Lysozym

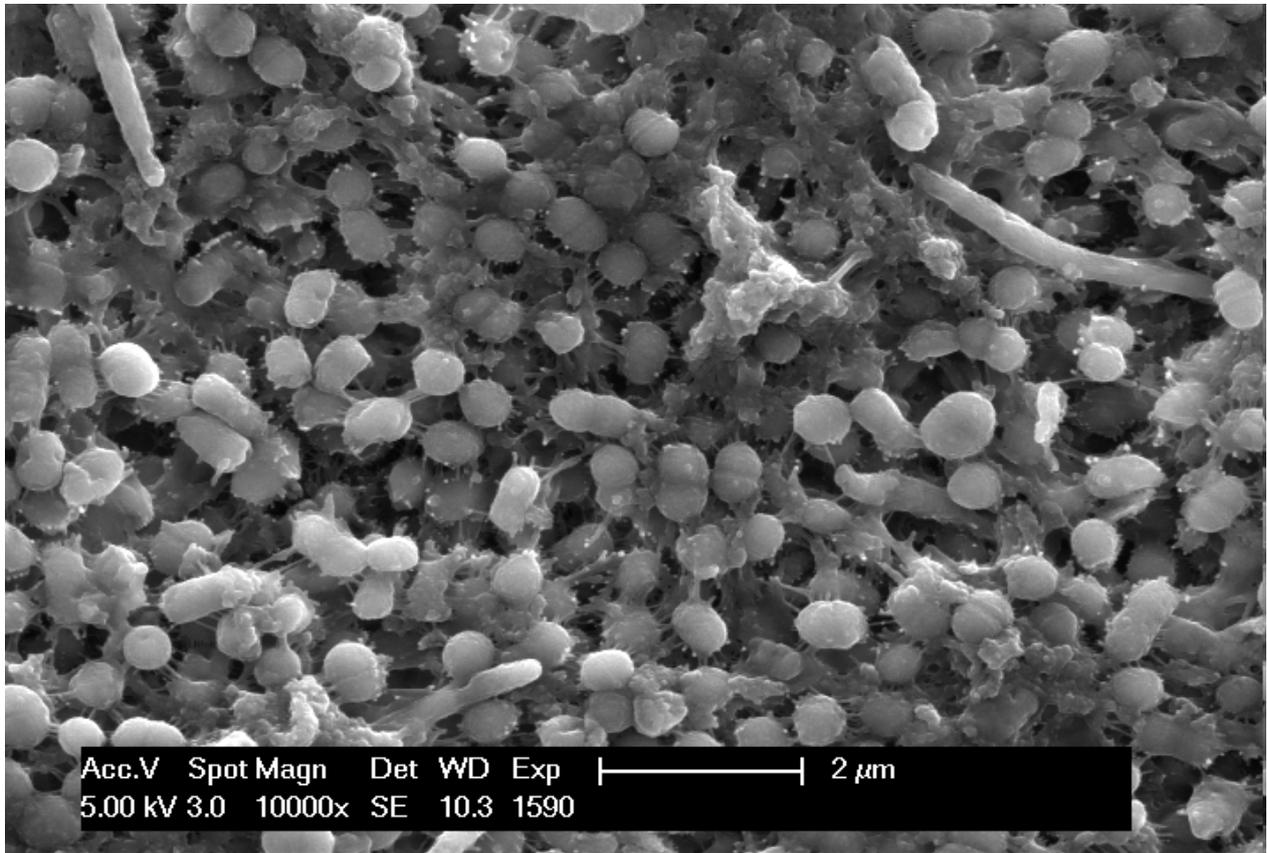
Wie auch auf den Schmelzprüfkörpern zeigt sich an der Oberfläche der Dentinprüfkörper, welche regelmäßig mit Lysozym gespült wurden, eine vollständige Bedeckung mit einem mehrschichtigen, etablierten und gereiften Biofilm (Abb.30).



**Abb. 30: REM-Bild des 48 h-Biofilms mit 10000-facher Vergrößerung**  
Prüfkörper nach regelmäßiger Lysozymspülung, Dentin. Es ist ein dichter und geschlossener Biofilm erkennbar, der sich über den ganzen Probekörperausschnitt erstreckt. In ihm lassen sich hauptsächlich kokkoide Bakterienstrukturen, aber auch einige stabförmige Mikroorganismen erkennen.

### Spülung mit Ölsäure

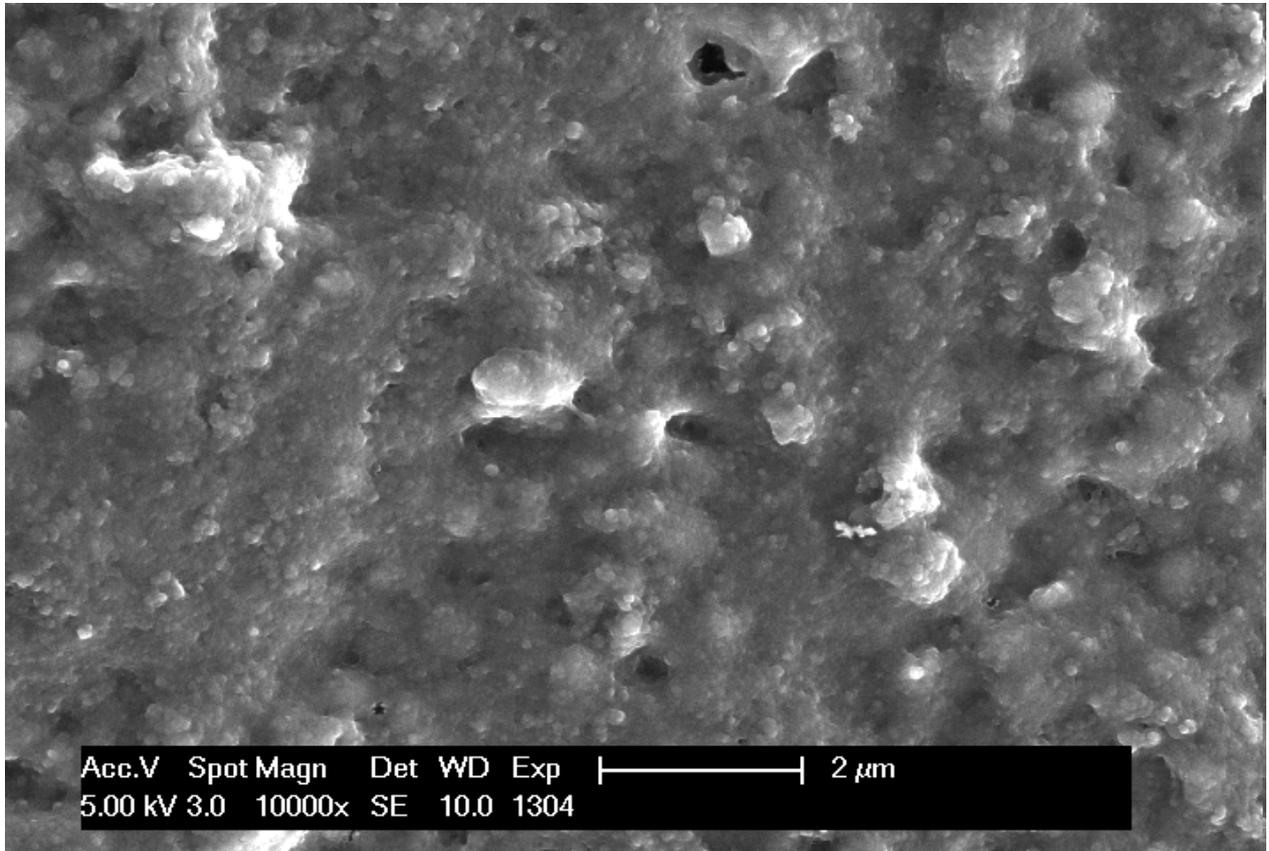
Die Prüfkörper nach Ölsäurespülung zeigen ebenfalls einen polymorphen, etablierten Biofilm, der den Großteil der Oberfläche des untersuchten Objekts bedeckt, wie anhand des repräsentativ gezeigten Bildes erkennbar (Abb. 31).



**Abb. 31: REM-Bild des 48 h-Biofilms mit 10000-facher Vergrößerung**  
Prüfkörper nach regelmäßiger Ölsäurespülung, Dentin. Es ist ein dichter und geschlossener Biofilm erkennbar, der sich über den ganzen Probekörperausschnitt erstreckt. In ihm lassen sich hauptsächlich kokkoiden Bakterienstrukturen, aber auch einige stabförmige Mikroorganismen erkennen.

### **Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt**

Auch auf den Dentinprüfkörpern nach Hopfenspülung zeigt sich lediglich eine amorphe Substanz, in der sich keine Mikroorganismen erkennen lassen (Abb.32).

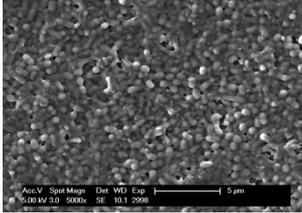
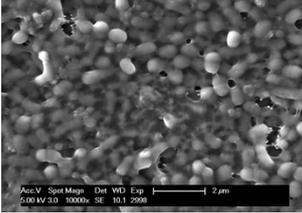
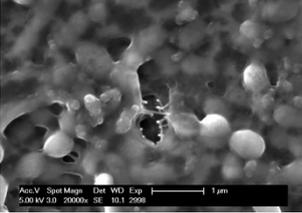
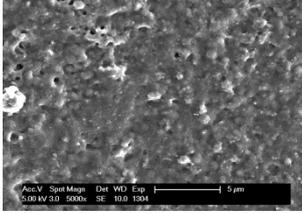
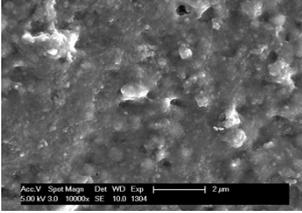
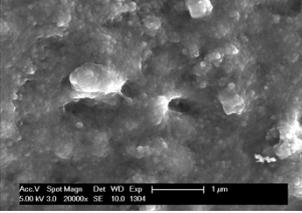
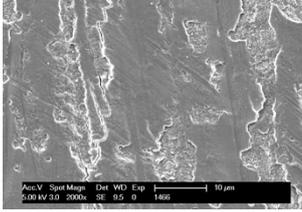
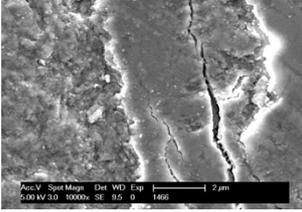
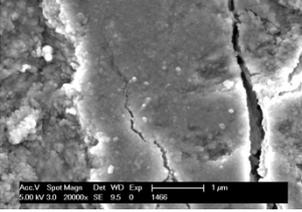


**Abb. 32: REM-Bild des 48 h-Biofilms mit 10000-facher Vergrößerung  
Prüfkörper nach regelmäßiger Hopfenspülung, Dentin. Es lässt sich kein Biofilm, sondern lediglich eine amorphe, dem Dentin aufliegende Substanz kennen.**

### 5.2.4 Tabellarische Übersicht der REM- Bilder von Dentin

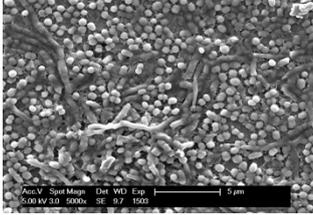
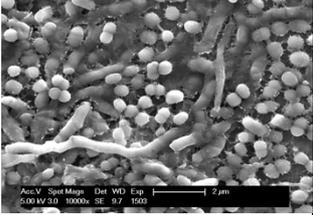
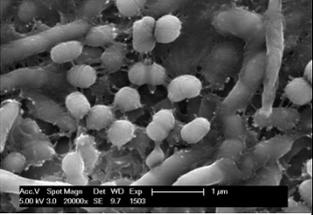
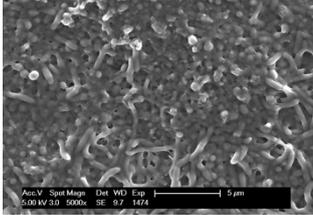
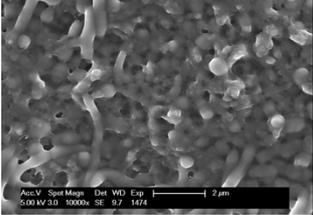
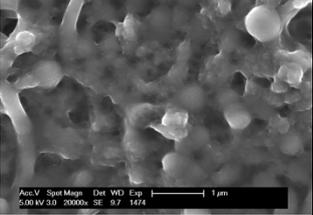
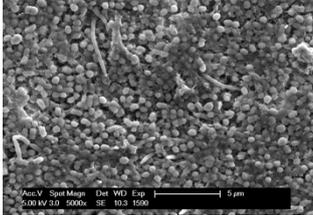
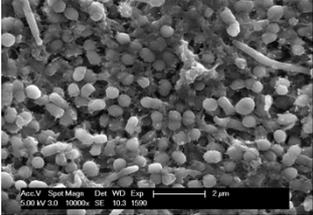
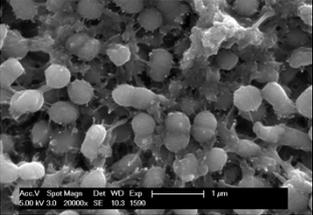
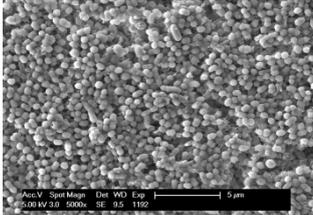
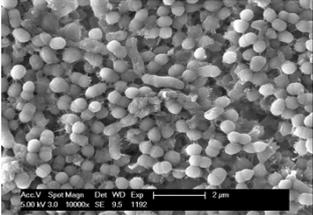
Zu besseren Übersicht und zur Vereinfachung des Vergleichs der REM-Bilder untereinander sind auch hier einige der ausgewerteten Bilder in tabellarischer Form, sortiert nach Probanden, unten folgend dargestellt (Tab. 16,17,18).

**Tabelle 16: Übersicht rasterelektronenmikroskopischer Bilder des Biofilms nach 48 h Tragezeit und jeweils alle 6 h für 30 Sekunden Spülung mit den Testsubstanzen, Proband 1, Dentin (5000-, 10000- und 20000-fache Vergrößerung)**

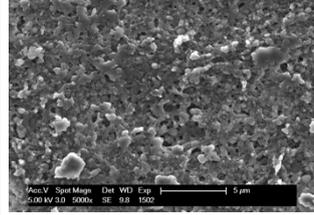
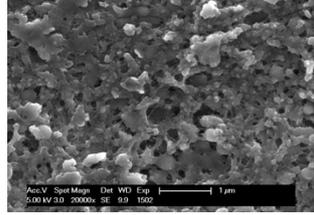
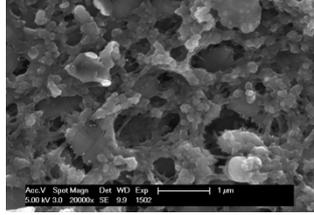
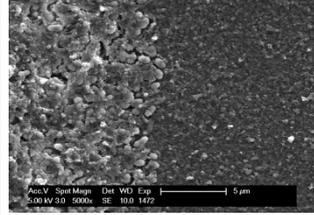
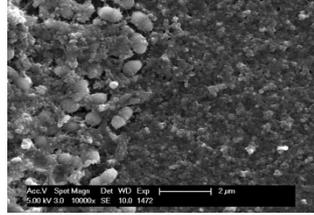
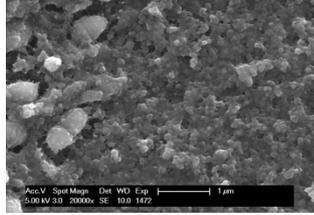
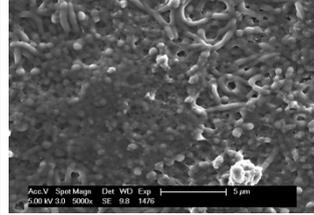
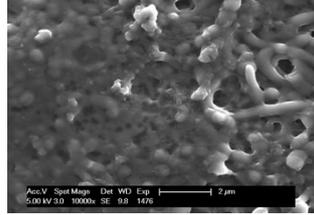
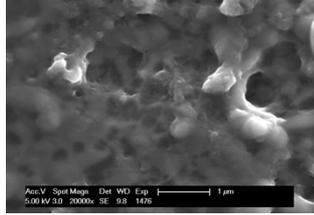
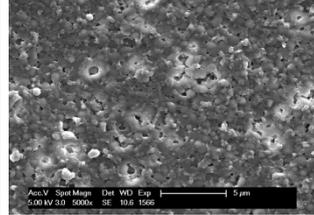
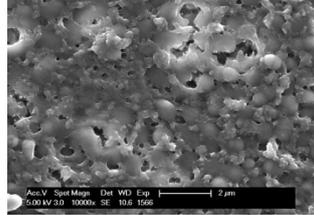
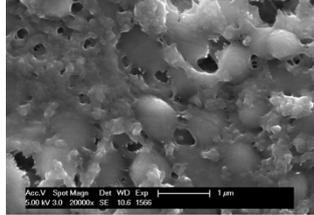
<p><b>Proband 1</b></p> <p><b>Dentin</b></p>			
<p><b>Kontrolle Aqua dest.</b></p>			
<p><b>Experimentelles Hopfenextrakt</b></p>			
<p><b>Ölsäure</b></p>			

Die in dieser Übersicht (Tab.16) gezeigten REM- Bilder der Prüfkörper nach Ölsäurespülung unterliegen verarbeitungstechnisch induzierten Artefakten, die keine Auswertung der Proben erlauben.

**Tabelle 17: Übersicht rasterelektronenmikroskopischer Bilder des Biofilms nach 48 h Tragezeit und jeweils alle 6 h für 30 Sekunden Spülung mit den Testsubstanzen, Proband 2, Dentin (5000-, 10000- und 20000-fache Vergrößerung)**

<p><b>Proband 2</b></p> <p><b>Dentin</b></p>			
<p><b>Kontrolle Aqua dest.</b></p>			
<p><b>Experimentelles Hopfenextrakt</b></p>			
<p><b>Ölsäure</b></p>			
<p><b>Lysozym 1,4 mg/ml</b></p>			

**Tabelle 18: Übersicht rasterelektronenmikroskopischer Bilder des Biofilms nach 48 h Tragezeit und jeweils alle 6 h für 30 Sekunden Spülung mit den Testsubstanzen, Proband 3, Dentin (5000-, 10000- und 20000-fache Vergrößerung)**

<p><b>Proband 3</b></p> <p><b>Dentin</b></p>			
<p><b>Kontrolle Aqua dest.</b></p>			
<p><b>Experimentelles Hopfenextrakt</b></p>			
<p><b>Ölsäure</b></p>			
<p><b>Lysozym 1,4 mg/ml</b></p>			

### 5.2.5 Auswertung Biofilmbildung auf Schmelz und Dentin

Die Score-Werte der REM-Bilder-Analyse sind im Folgenden in tabellarischer Form zur besseren Übersicht dargestellt (Tab. 19,20)

**Tabelle 19: Auswertung der Biofilmformation auf den Schmelzprüfkörpern nach Feng et al. [27]**

<b>REM-Analyse: Scoring, Auswertung der Biofilmformation</b>				
<u>Schmelz</u>				
Proband	WASSER	LYSOZYM	ÖLSÄURE	HOPFENEXTRAKT
	Score	Score	Score	Score
1	6	6	6	6
2	4	6	4	1
3	6	6	6	1

**Tabelle 20: Auswertung der Biofilmformation auf den Dentinprüfkörpern nach Feng et al. [27]**

<b>REM-Auswertung Scoring, Auswertung der Biofilmformation</b>				
<u>Dentin</u>				
Proband	WASSER	LYSOZYM	ÖLSÄURE	HOPFENEXTRAKT
	Score	Score	Score	Score
1	6	6	nicht auswertbar	1
2	6	4	6	6
3	6	6	6	5

## 5.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

### Lysozym

Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder der Prüfkörper, welche nach Lysozypspülung aufgenommen wurden, zeigen ein ähnliches Bild verglichen mit den Prüfkörpern der Kontrolle. Es befindet sich meist ein Multilayer- Biofilm auf den Prüfkörpern, der mehr als 50 % der Oberfläche bedeckt. Somit lässt sich kein vermindertes Ausmaß bakterieller Besiedlung der Probekörper und auch keine ersichtliche Hemmung der Biofilmreifung erkennen.

### Ölsäure

Ein ähnliches Bild zeigen auch die Probekörper nach Ölsäurespülung. Auf den ausgewerteten Flächen finden man zumeist einen Multilayer-Biofilm, welcher den größten Teil der Gesamtfläche des Prüfkörpers bedeckt. Auch hier lässt sich also keine Verminderung der Biofilmausdehnung erkennen. Die Dentinprüfkörper eines Probanden konnten aufgrund von zu stark ausgeprägten, aus einer fehlerhaften REM- Prüfkörpervorbereitung resultierenden Artefakten nicht ausgewertet werden.

### Experimentelles Hopfenextrakt

Auch hier unterscheiden sich die Ergebnisse nach Hopfenspülung am deutlichsten von denen der Kontrolle. Bei zwei Probanden ist lediglich eine Pellikel mit vereinzelt Mikroorganismen zu erkennen, welche nur einschichtig und verstreut auf dem Prüfkörper anzutreffen sind. Im Bereich des Dentins findet sich bei zwei Probanden ein Biofilm.

Bei den Dentinprüfkörpern zeigt sich bei einem Probanden ein Score 1, welcher lediglich das Vorhandensein einzelner Mikroorganismen beschreibt. Bei Proband Nummer 2 zeigt sich eine Biofilmreduktion, sodass nur weniger als 50% der Prüfkörperoberfläche mit Bakterien besiedelt sind.

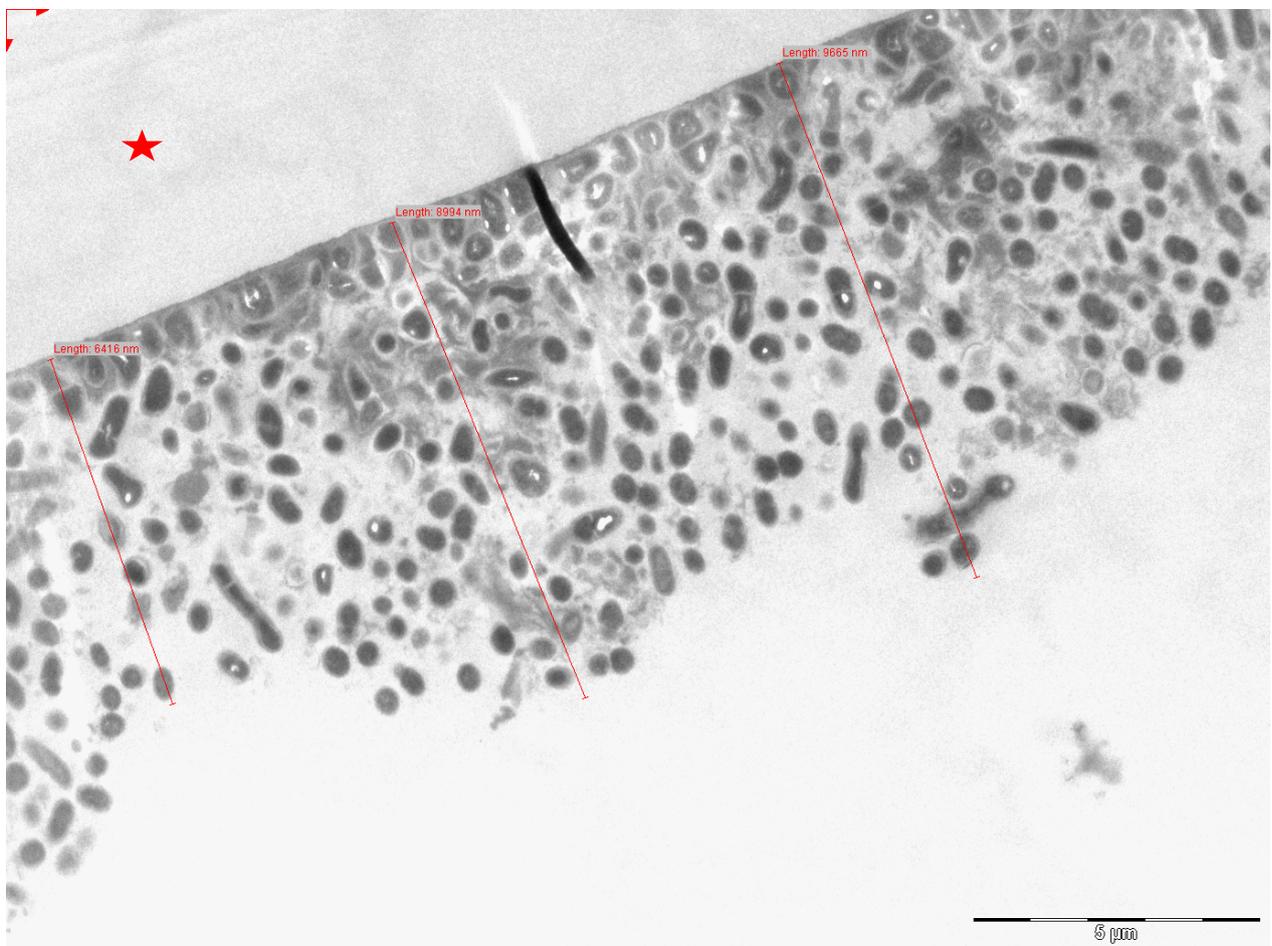
## 5.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Ein weiterer Teil der Proben wurde mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Es werden im Folgenden repräsentative Bilder der Probekörper nach den einzelnen Spürlösungen gezeigt.

### 5.3.1 Biofilmbildung auf Schmelz

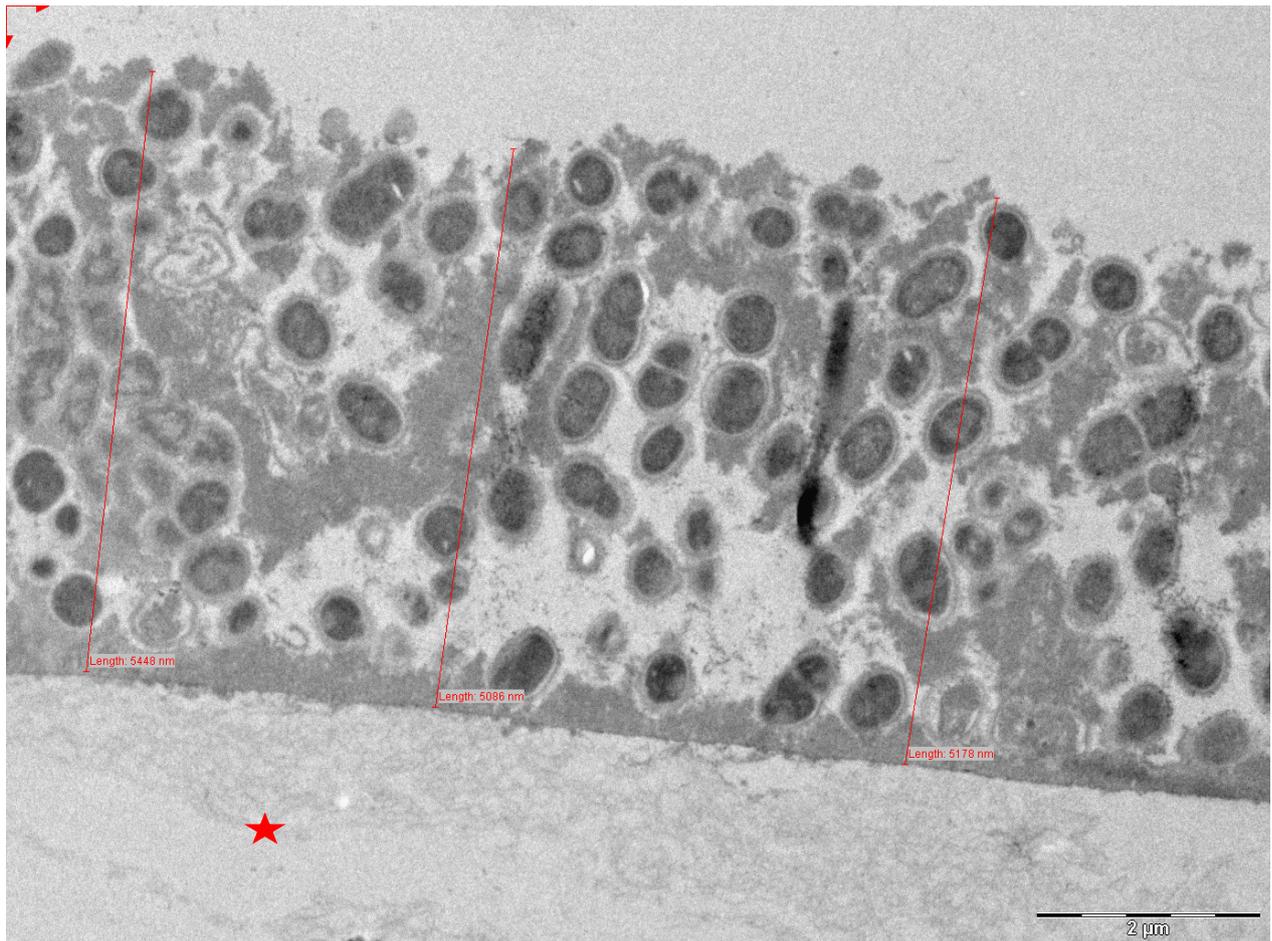
#### Kontrolle (Spülung mit Wasser)

Die Schmelzprüfkörper der Kontrolle zeigen eine intakte Pellikel mit daraufliegendem, ausgeprägten Multilayerbiofilm und morphologisch vielfältigen Bakterien (Abb. 33,34).



**Abb. 33: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Zu sehen ist die Pellikel als eine elektronendichte basale Schicht mit einem darauf liegenden, etablierten, mehrschichtigen Biofilm, welcher Bakterien unterschiedlicher Morphologie beinhaltet. Die Bakterien sind eingebettet in die sie umgebende extrazelluläre Matrix. Der Schmelz ist demineralisiert (gekennzeichnet mit einem Stern).**

**Kontrollprüfkörper, Schmelz bei 4800-facher Vergrößerung**

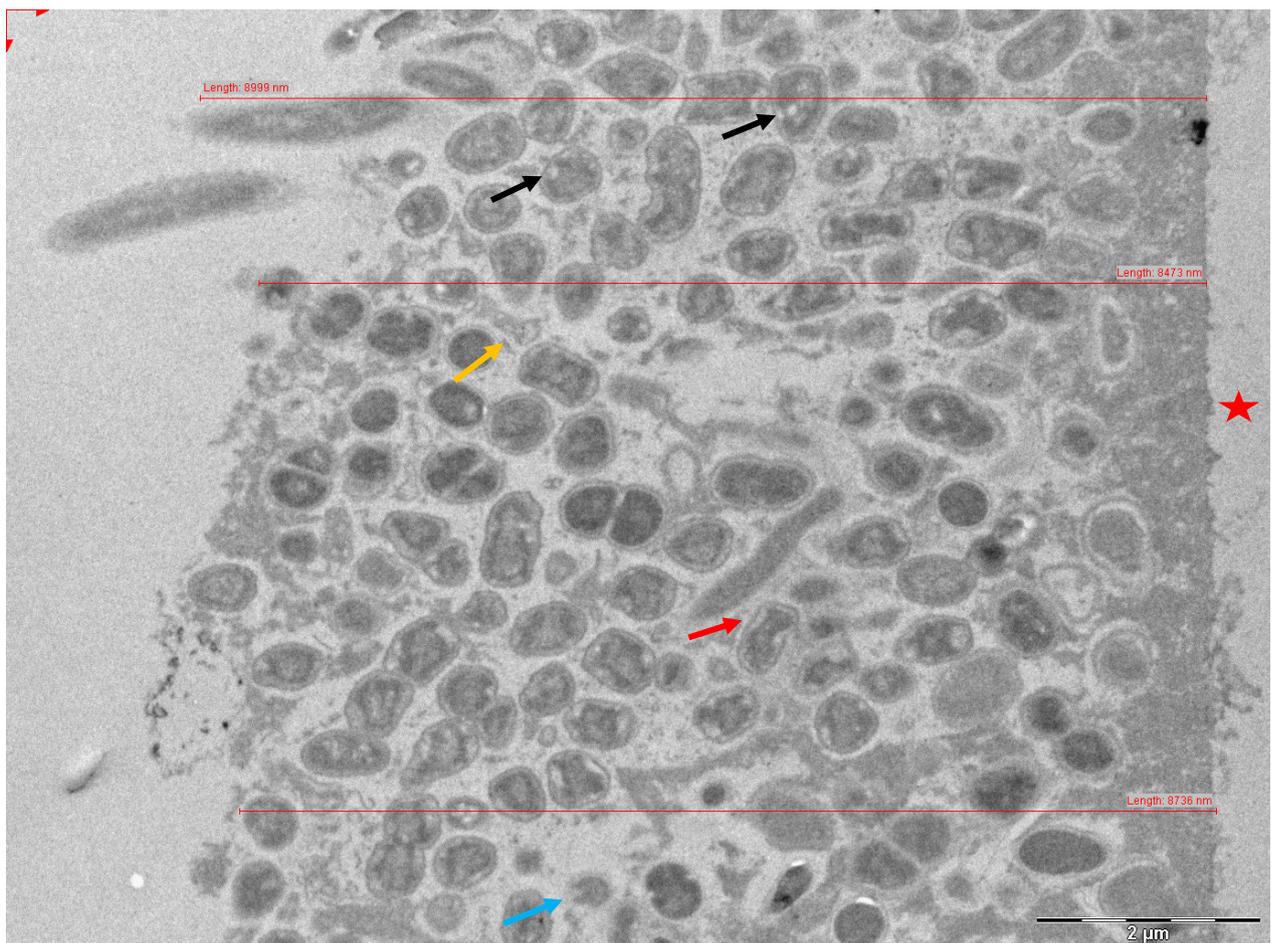


**Abb. 34: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Zu sehen ist die Pellikel als eine elektronendichte basale Schicht mit einem daraufliegenden, etablierten, mehrschichtigen Biofilm, welcher Bakterien unterschiedlicher Morphologie beinhaltet. Die Bakterien sind eingebettet in die sie umgebende extrazelluläre Matrix und der Schmelz wurde im Rahmen der Probenaufbereitung demineralisiert (Stern).**

**Kontrollprüfkörper, Schmelz bei 9300-facher Vergrößerung**

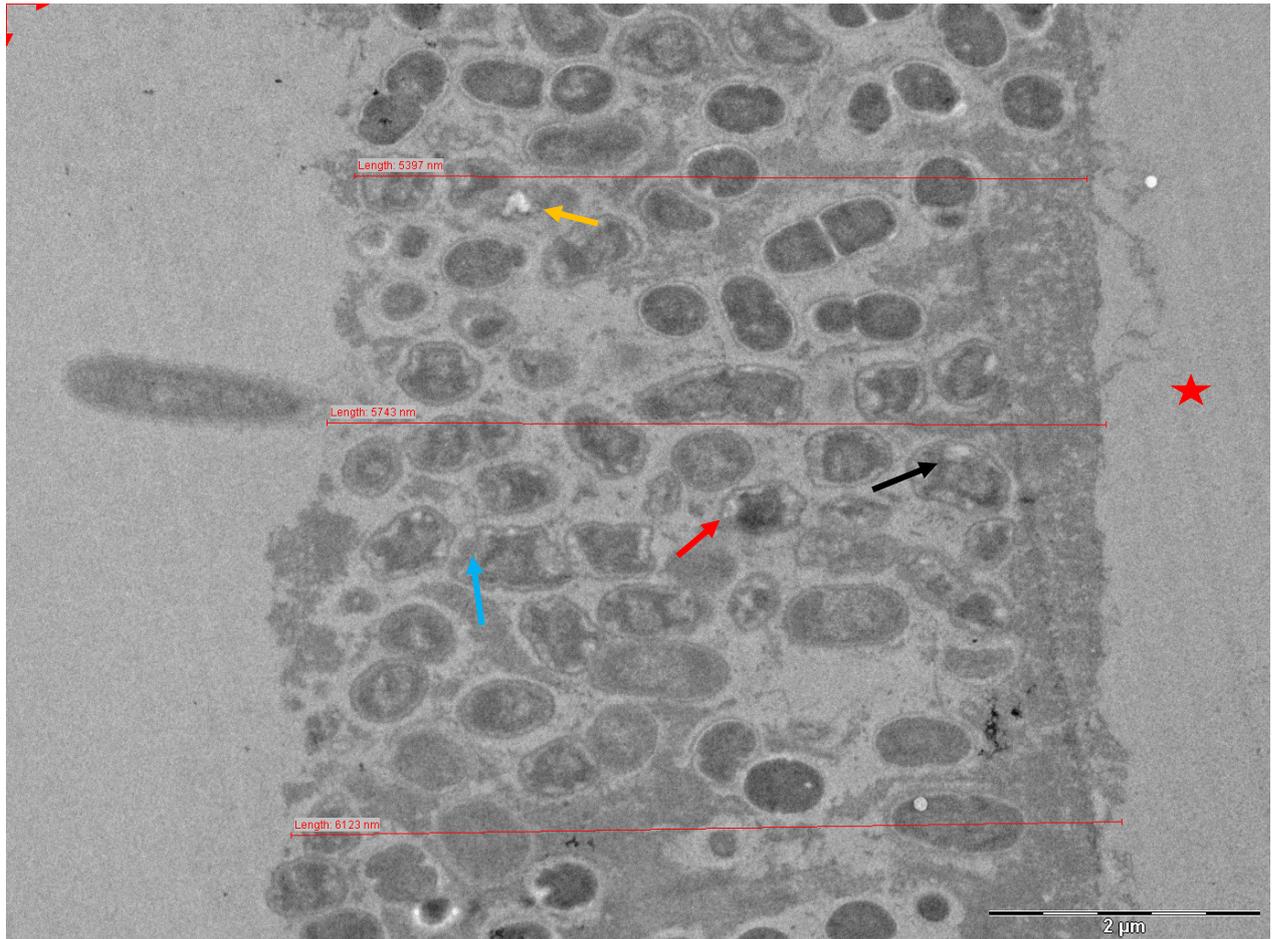
## Spülung mit Ölsäure

Auch die Proben nach regelmäßiger Ölsäurespülung zeigen eine vorhandene, intakte Pellikel mit daraufliegendem ausgeprägtem mehrschichtigem Biofilm, welcher diverse bakterielle Phänotypen beinhaltet (Abb.35-38). Die Bakterien unterliegen jedoch, verglichen mit den Bakterien der Kontrollprobekörper, deutlichen Veränderungen, die auf einen Verlust der strukturellen Integrität schließen lassen.



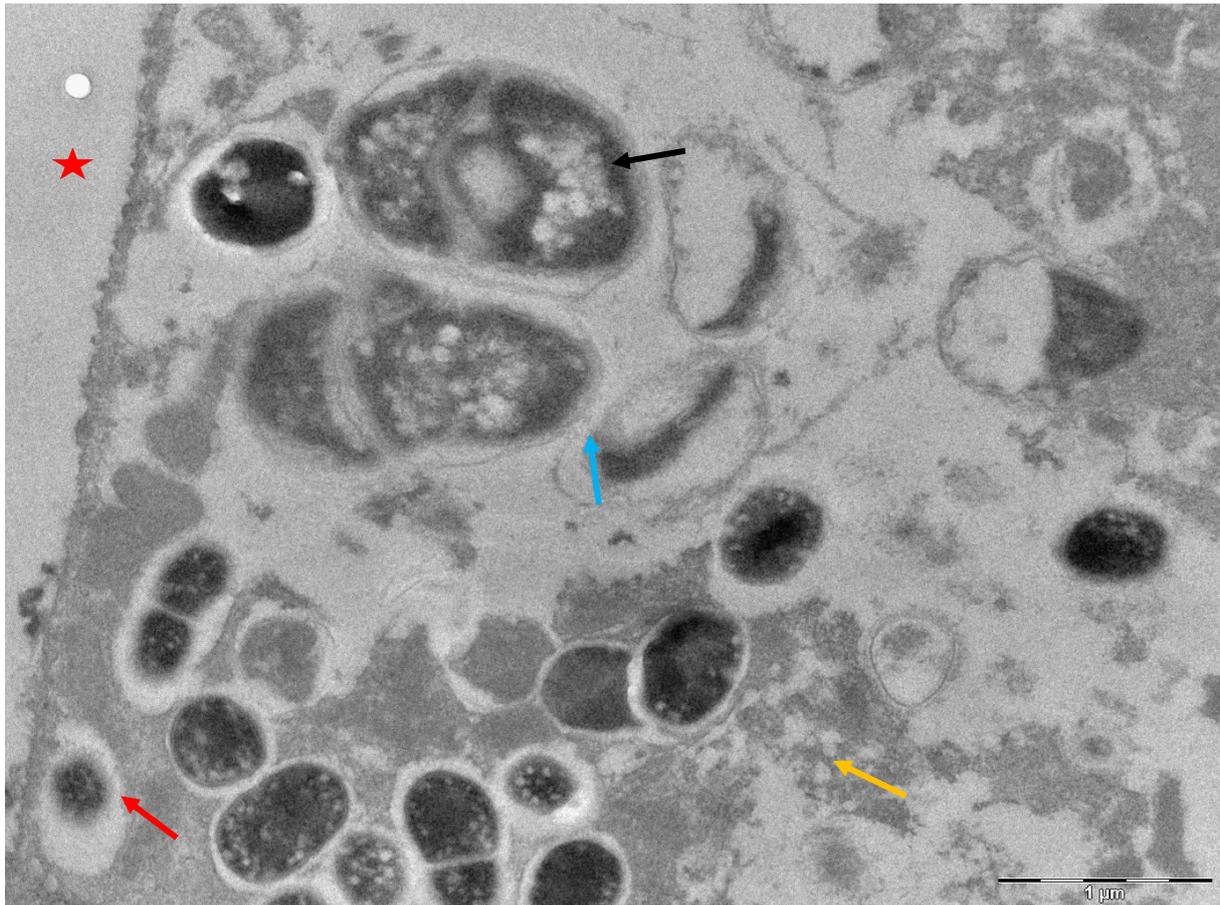
**Abb. 35: TEM-Bild des 48 h-Biofilms:** Zu sehen ist ein etablierter mehrschichtiger Biofilm mit morphologisch veränderten, atypischen Bakterien und die sie umgebende Matrix, welche ebenfalls Veränderungen aufweist. Die Zellinhalte erscheinen geschrumpft (roter Pfeil), die Zellmembranen lytisch (blauer Pfeil) und es lassen sich kreisrunde, in die Zelle eingelagerte Öltröpfchen erkennen (schwarze Pfeile). Auch im Bereich der extrazellulären Matrix lassen sich kreisrunde Einlagerungen erkennen (gelber Pfeil). Die Seite des im Rahmen der Probenaufbereitungen demineralisierten Schmelzes ist mit einem Stern gekennzeichnet.

Prüfkörper nach Ölsäurespülung, Schmelz bei 9300-facher Vergrößerung



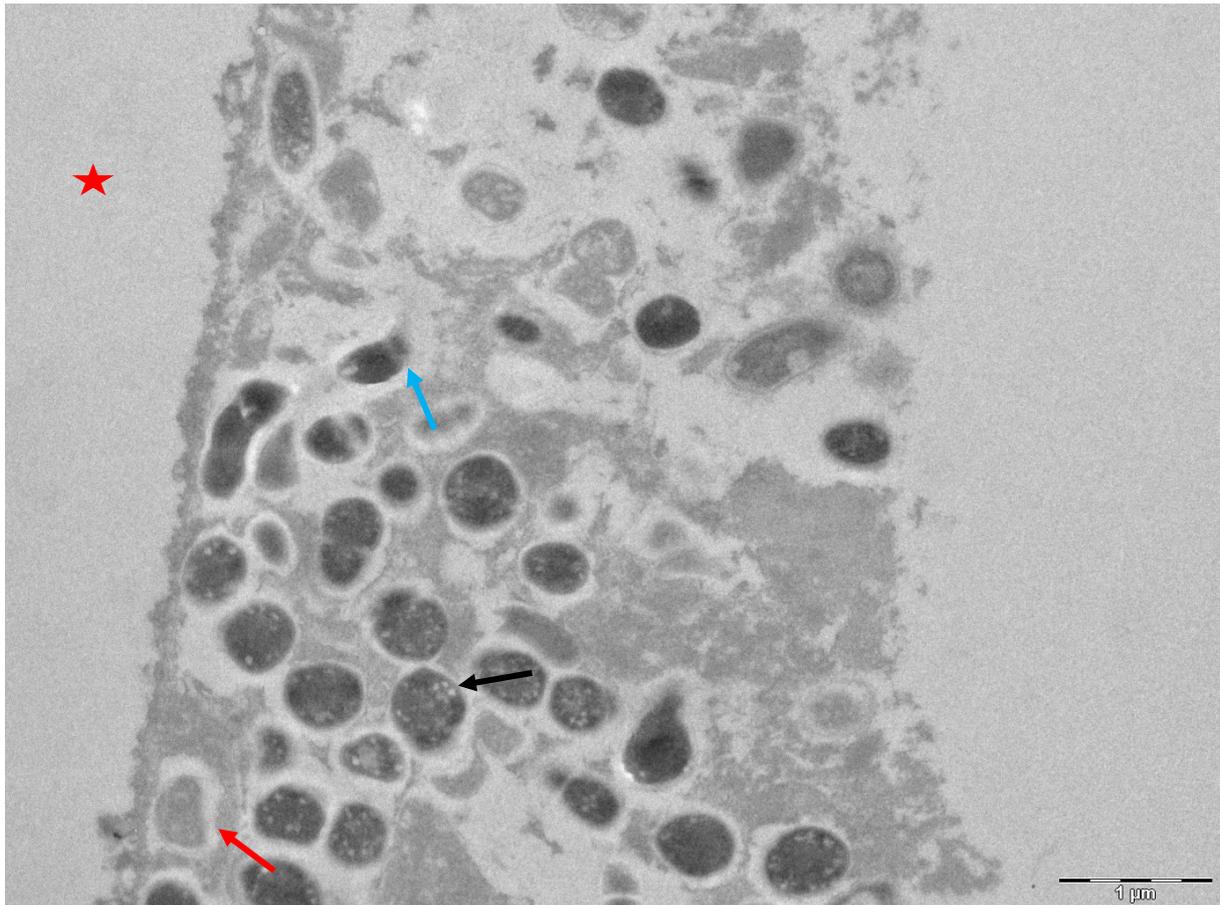
**Abb. 36: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Auch hier lassen sich die in Abb. 36 beschriebenen Veränderungen erkennen. Die Zellinhalte erscheinen geschrumpft (roter Pfeil), die Zellwände lytisch (blauer Pfeil) und es befinden sich Einlagerungen innerhalb der Zelle (schwarzer Pfeil) und der extrazellulären Matrix (gelber Pfeil). Die Seite des im Rahmen der Probenaufbereitungen demineralisierten Schmelzes ist mit einem Stern gekennzeichnet.**

**Prüfkörper nach Ölsäurespülung, Schmelz bei 11 000-facher Vergrößerung**



**Abb. 37: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Auch bei größerer Vergrößerung lassen sich die degenerativen Prozesse inner- und außerhalb der Zellen deutlich erkennen. Lytische Zellmembranen (blauer Pfeil), kreisrunde (Öl-)Einlagerungen innerhalb (schwarzer Pfeil) und außerhalb (gelber Pfeil) der Zellen, sowie geschrumpfte Zellinhalte (roter Pfeil) prägen das Bild des Biofilms. Der Bereich des demineralisierten Schmelzes ist mit einem Stern gekennzeichnet.**

**Prüfkörper nach Ölsäurespülung, Schmelz bei 18500-facher Vergrößerung**

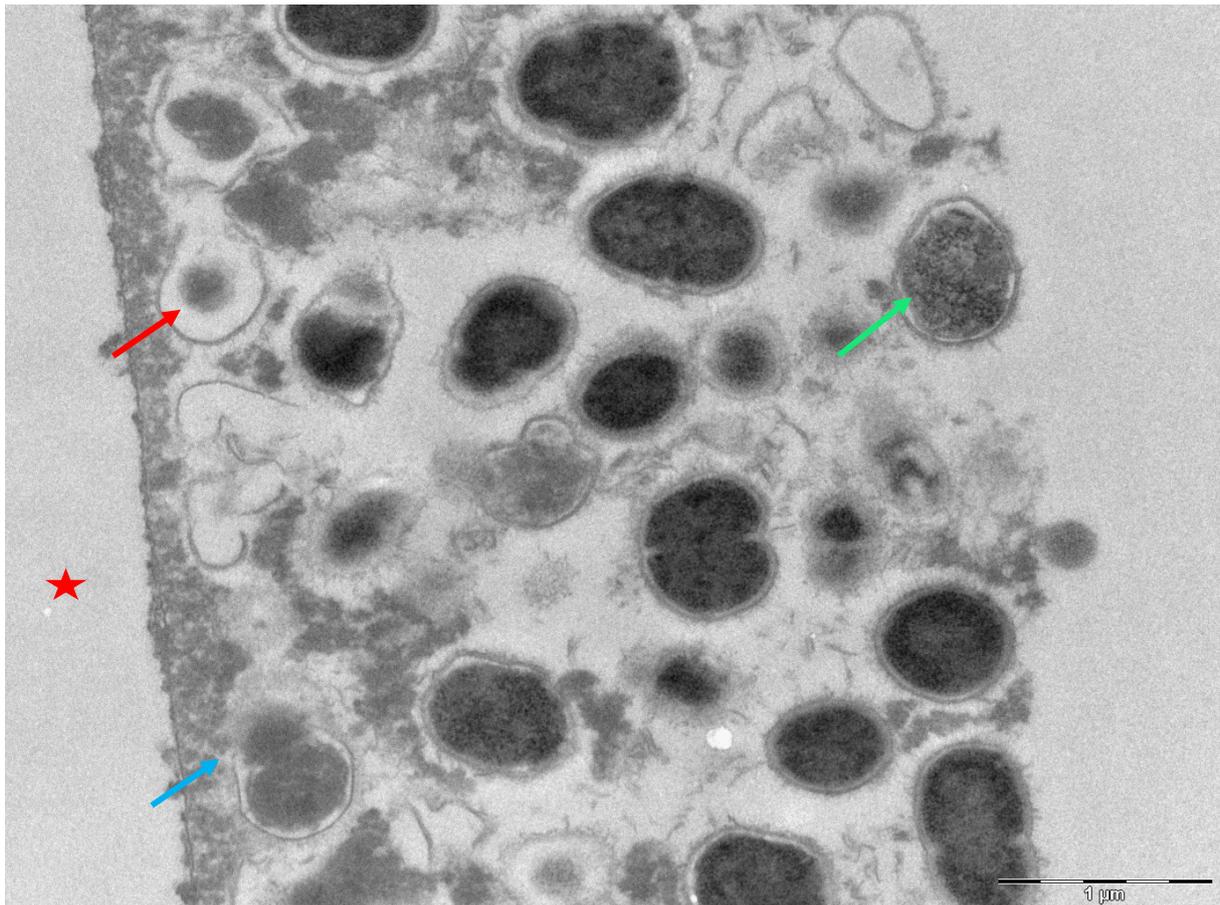


**Abb. 38: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Auch in diesem Bild lassen sich die degenerativen Prozesse inner- und außerhalb der Zellen deutlich erkennen. Lytische Zellmembranen (blauer Pfeil) mit nach außen gestülpten Zellinhalten, kreisrunde (Öl-)Einlagerungen innerhalb (schwarzer Pfeil) der Zellen, sowie geschrumpfte Zellinhalte (roter Pfeil) prägen das Bild des Biofilms. Die Seite des im Rahmen der Probenaufbereitungen demineralisierten Schmelzes ist mit einem Stern gekennzeichnet.**

**Prüfkörper nach Ölsäurespülung, Schmelz bei 13000-facher Vergrößerung**

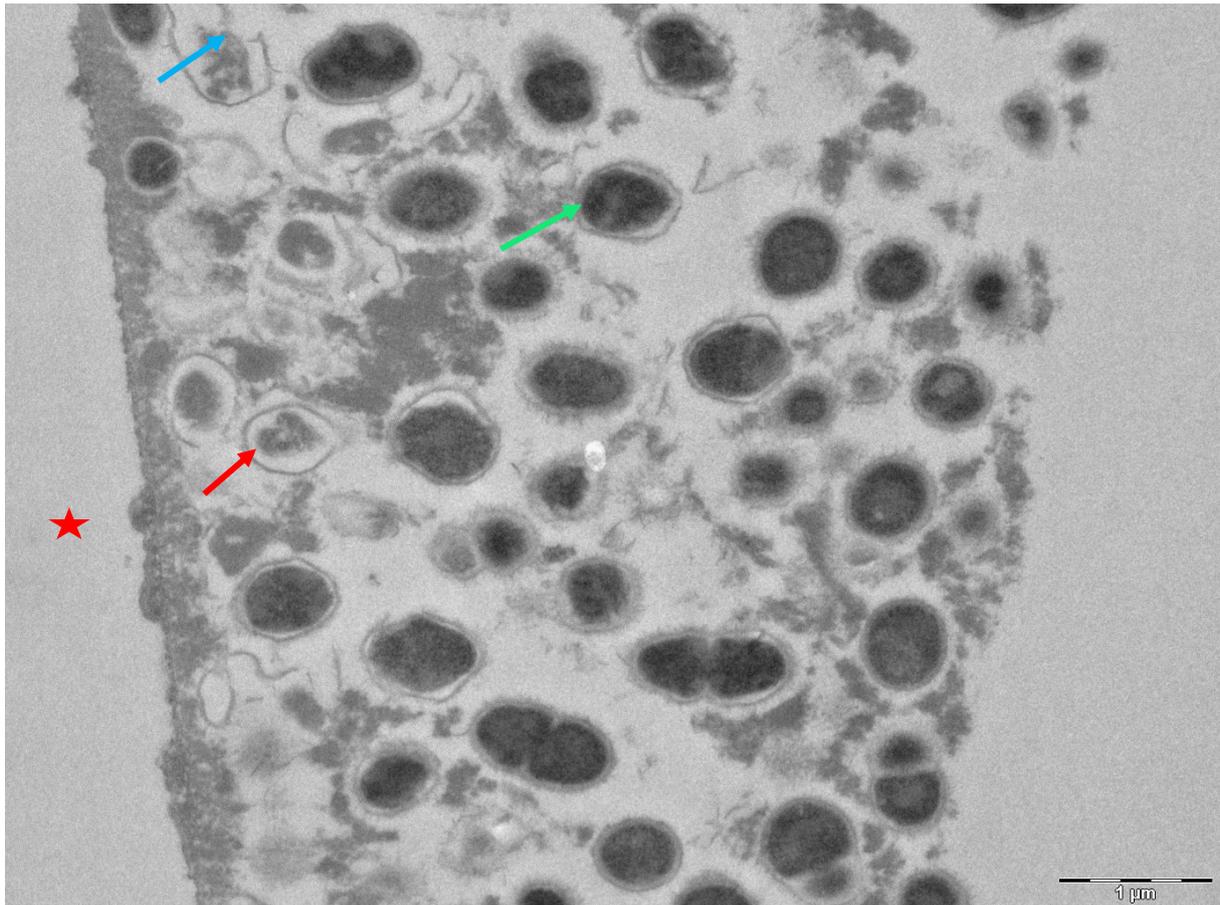
### Spülung mit Lysozym

Die Schmelzprüfkörper nach wiederholter Lysozymspülung zeigen ebenfalls Bakterien mit atypischen Veränderungen (Abb. 39,40). Zu sehen ist ein mehrschichtiger Biofilm, der bezogen auf die morphologische Diversität der vorhandenen Bakterien die typische Ausprägung eines 48 Stunden alten Biofilms zeigt. Jedoch weisen die dargestellten Zellen atypische Merkmale auf, welche auf degenerative Prozesse schließen lassen.



**Abb. 39: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Zu sehen ist ein etablierter mehrschichtiger Biofilm mit atypisch veränderten Bakterien unterschiedlicher Morphologie und die sie umgebende Matrix, welche aufgelockert erscheint. Die Zellinhalte erscheinen nicht elektronendicht und inhomogen (grüner Pfeil), die Zellinhalte geschrumpft (roter Pfeil), die Zellmembranen teilweise lytisch, sodass der Zellinhalt teilweise sogar nach außen gestülpt erscheint (blauer Pfeil). Der Bereich des demineralisierten Schmelzes ist mit einem Stern gekennzeichnet.**

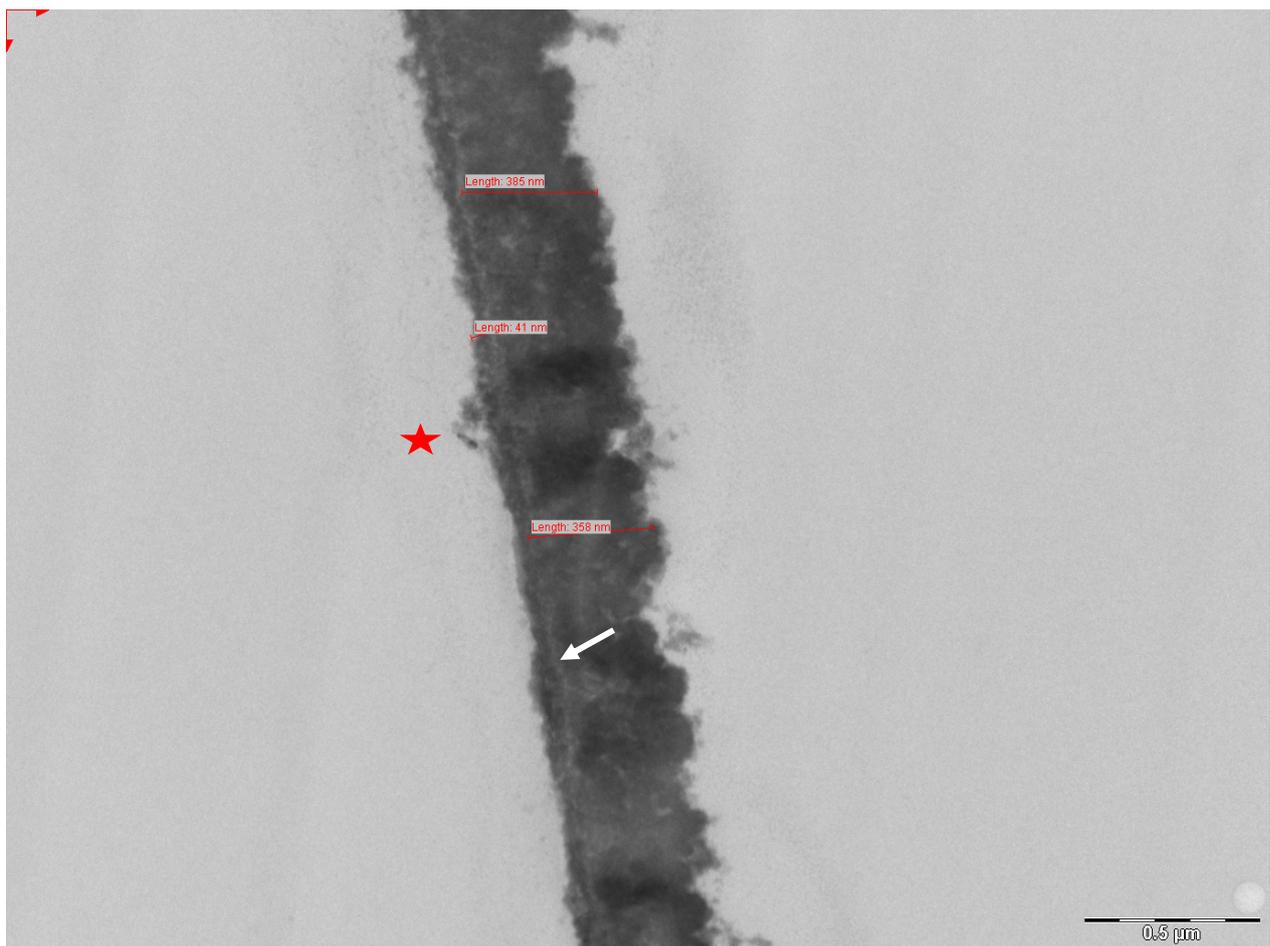
**Prüfkörper nach Lysozymspülung, Schmelz bei 18500-facher Vergrößerung**



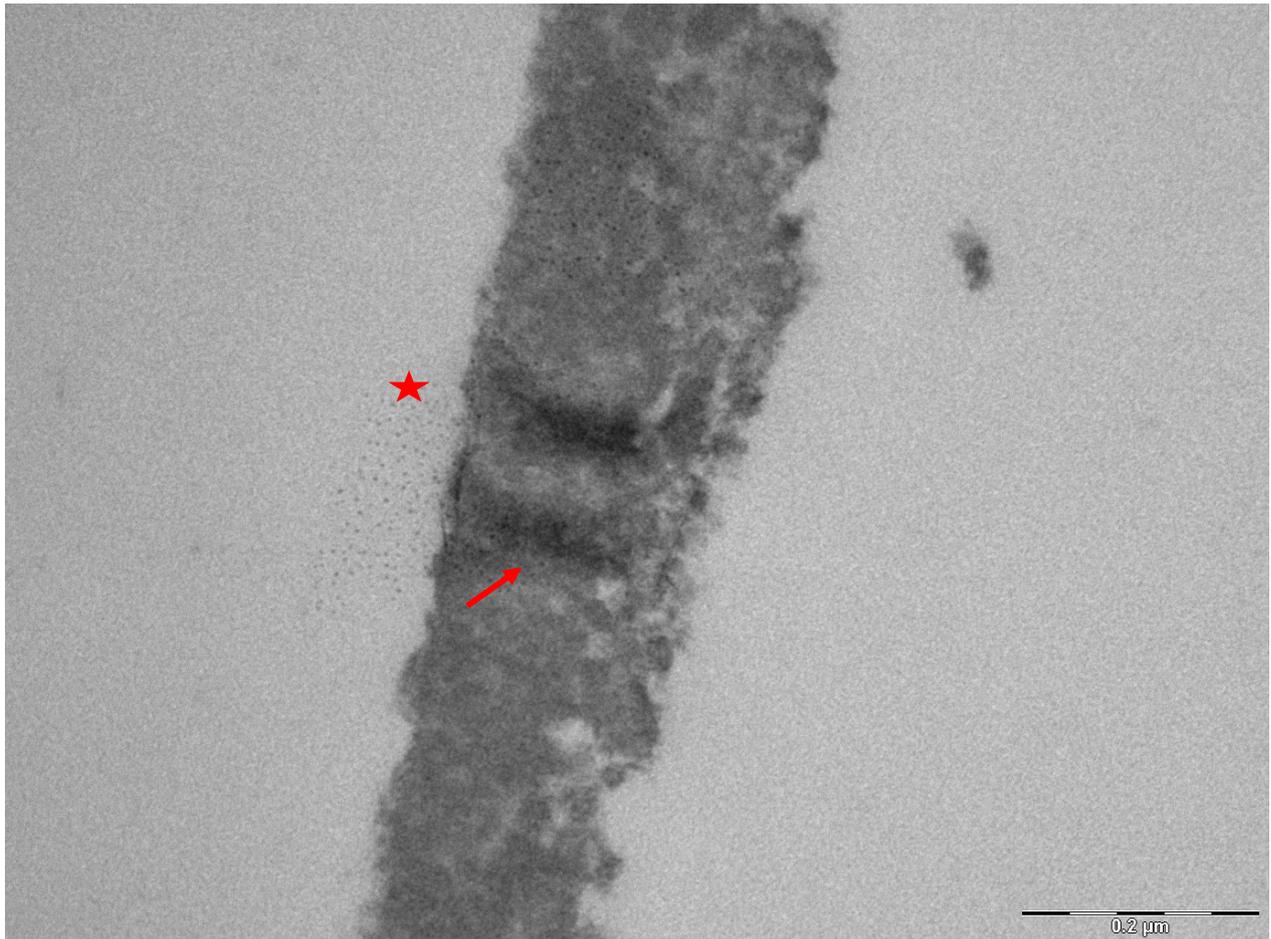
**Abb. 40: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Zu sehen ist auch hier ein etablierter mehrschichtiger Biofilm mit atypisch veränderten Bakterien unterschiedlicher Morphologie und die sie umgebende Matrix, welche aufgelockert erscheint. Die Zellinhalte erscheinen nicht elektronendicht und inhomogen (grüner Pfeil), die Zellinhalte geschrumpft (roter Pfeil) die Zellmembranen teilweise lytisch (blauer Pfeil). Der Bereich des demineralisierten Schmelzes ist mit einem Stern gekennzeichnet. Prüfkörper nach Lysozymspülung, Schmelz bei 13000-facher Vergrößerung**

### Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt

Auch hier zeigen die Prüfkörper nach Hopfenspülung deutliche Ergebnisse (Abb. 41-45). Während die bereits gezeigten Prüfkörper nach Durchführung der anderen Spülprotokolle durchweg bakterieller Besiedlung ausgesetzt sind, findet sich auf den Schmelzprüfkörpern nach repetitiver Hopfenspülung lediglich eine elektronendichte, amorphe Pellikelschicht ohne erkennbare bakterielle Strukturen.

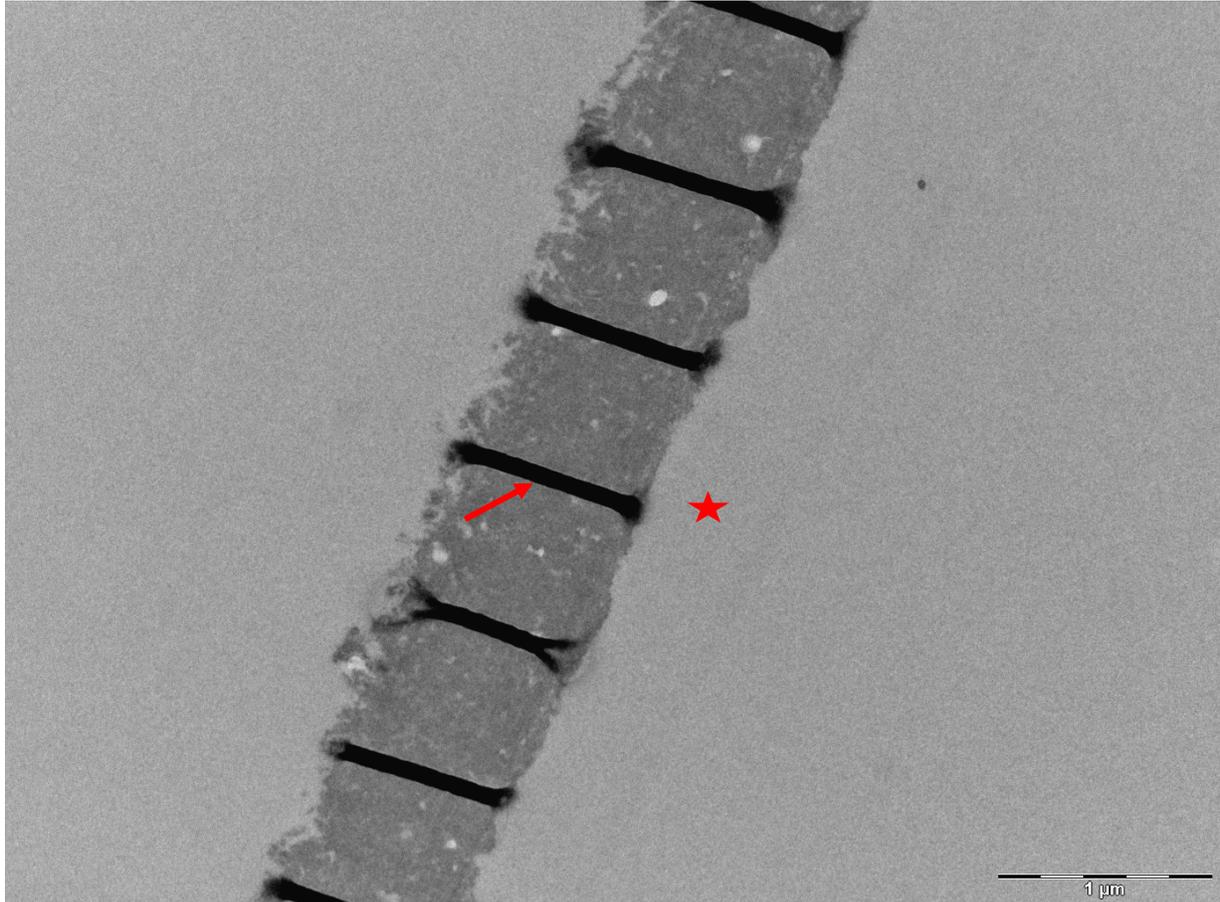


**Abb. 41: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Zu sehen ist eine elektronendichte basale Struktur (weißer Pfeil) mit aufgelagerter Bande amorpher Substanz, in der keine bakteriellen Zellkörper erkennbar sind. Der Bereich des demineralisierten Schmelzes ist mit einem Stern gekennzeichnet. Prüfkörper nach Hopfenspülung, Schmelz bei 30 000-facher Vergrößerung**



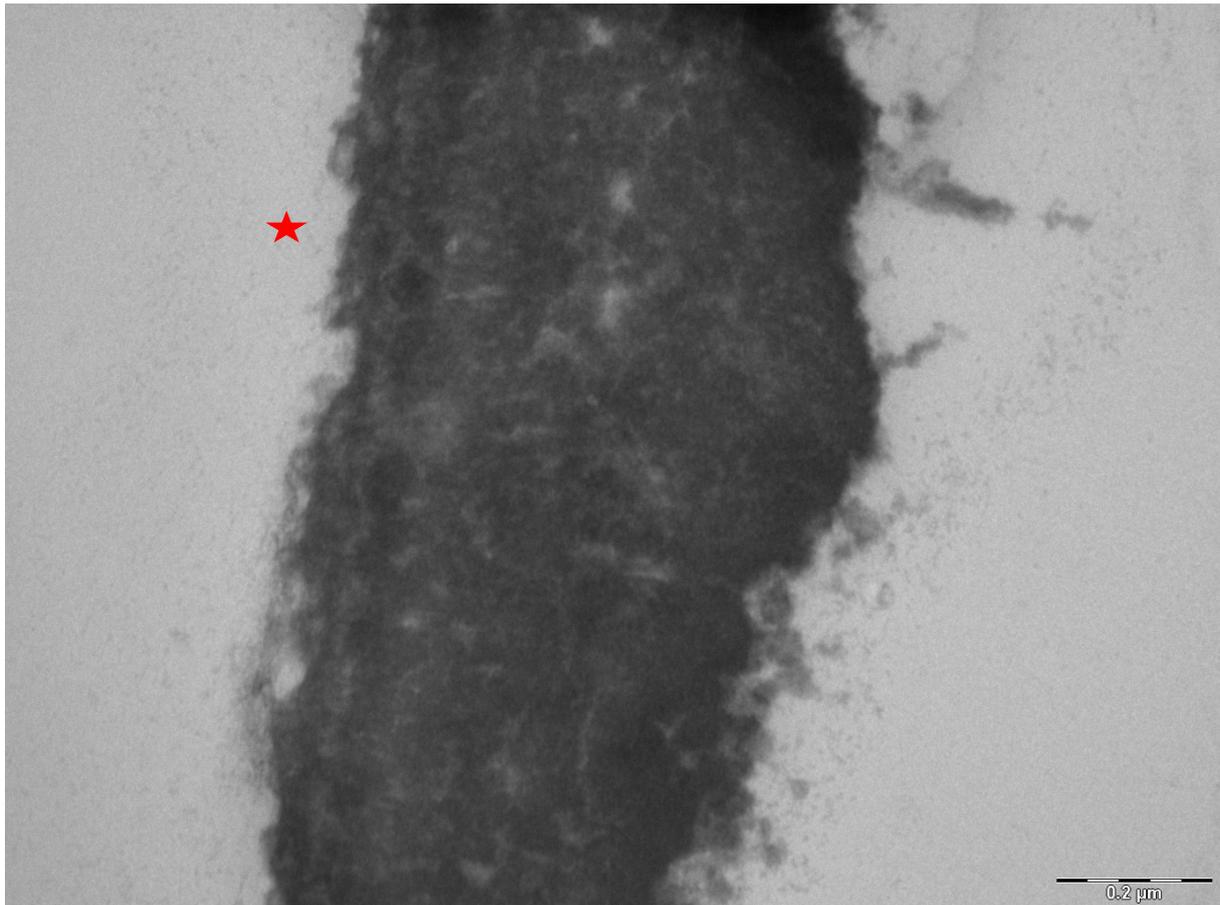
**Abb. 42: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Zu sehen ist eine elektronendichte, weitgehend amorphe Pellikelschicht; es sind keine Mikroorganismen erkennbar. Es lassen sich hyperdense Bereiche erkennen, welche Präparationsartefakte widerspiegeln (roter Pfeil). Der Bereich des demineralisierten Schmelzes ist mit einem Stern gekennzeichnet.**

**Prüfkörper nach Hopfenspülung, Schmelz bei 98000-facher Vergrößerung**



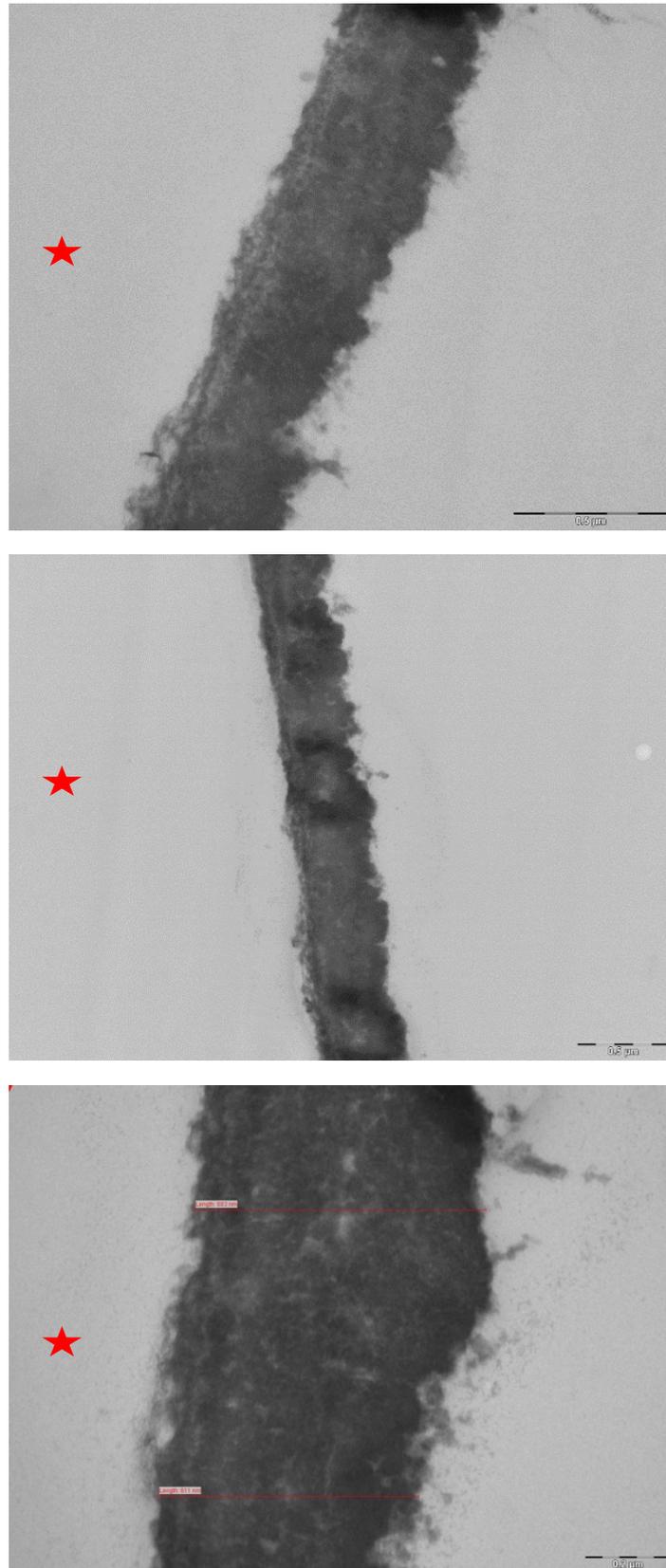
**Abb. 43: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Zu sehen ist eine Bande amorpher Substanz im Sinne einer verdickten Pellicel; es sind keine Mikroorganismen erkennbar; es lassen sich auch hier schwarze, scharf abgegrenzte hyperdense Bereiche erkennen, die vermutlich auf Stauchungsartefakte im Rahmen der Präparation zurück zu führen sind (roter Pfeil). Der Bereich des demineralisierten Schmelzes ist mit einem Stern gekennzeichnet.**

**Prüfkörper nach Hopfenspülung, Schmelz bei 18500-facher Vergrößerung**



**Abb. 44: TEM-Bild des 48 h-Biofilms, zu sehen ist eine elektronendichte, weitgehend amorphe Pellicelschicht; es sind keine Mikroorganismen erkennbar. Der Bereich des demineralisierten Schmelzes ist mit einem Stern gekennzeichnet.**

**Prüfkörper nach Hopfenspülung, Schmelz bei 68000-facher Vergrößerung**



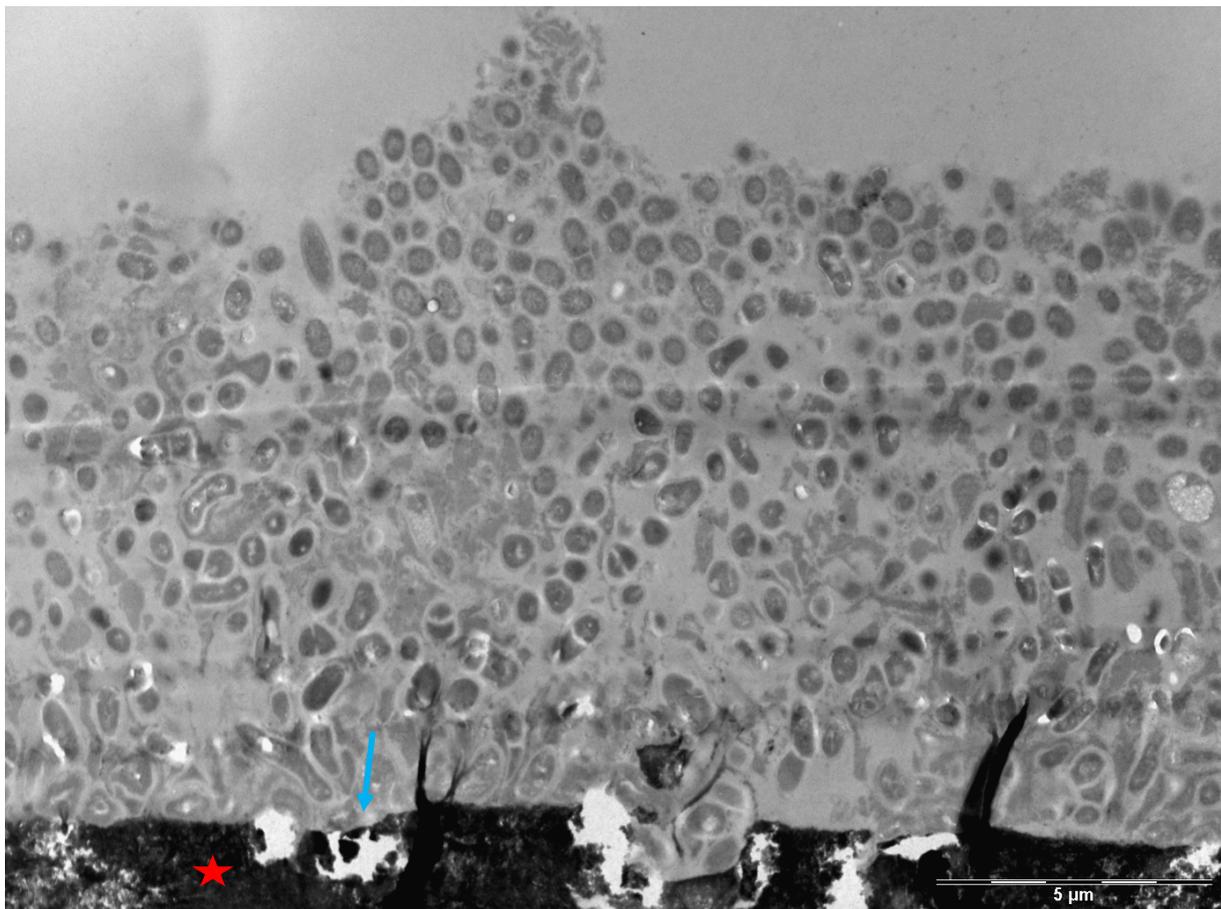
**Abb. 45: Weitere Beispiele (TEM) eines 48 h-Biofilms auf Schmelzprüfkörpern nach wiederholter Hopfenspülung; zu sehen ist eine amorphe Substanz, ohne erkennbare mikrobielle Strukturen. Der Bereich des demineralisierten Schmelzes ist jeweils mit einem Stern gekennzeichnet.**

**Schmelzprüfkörper bei 4900-, 30 000- und 68000-facher Vergrößerung (v.o.n.u.)**

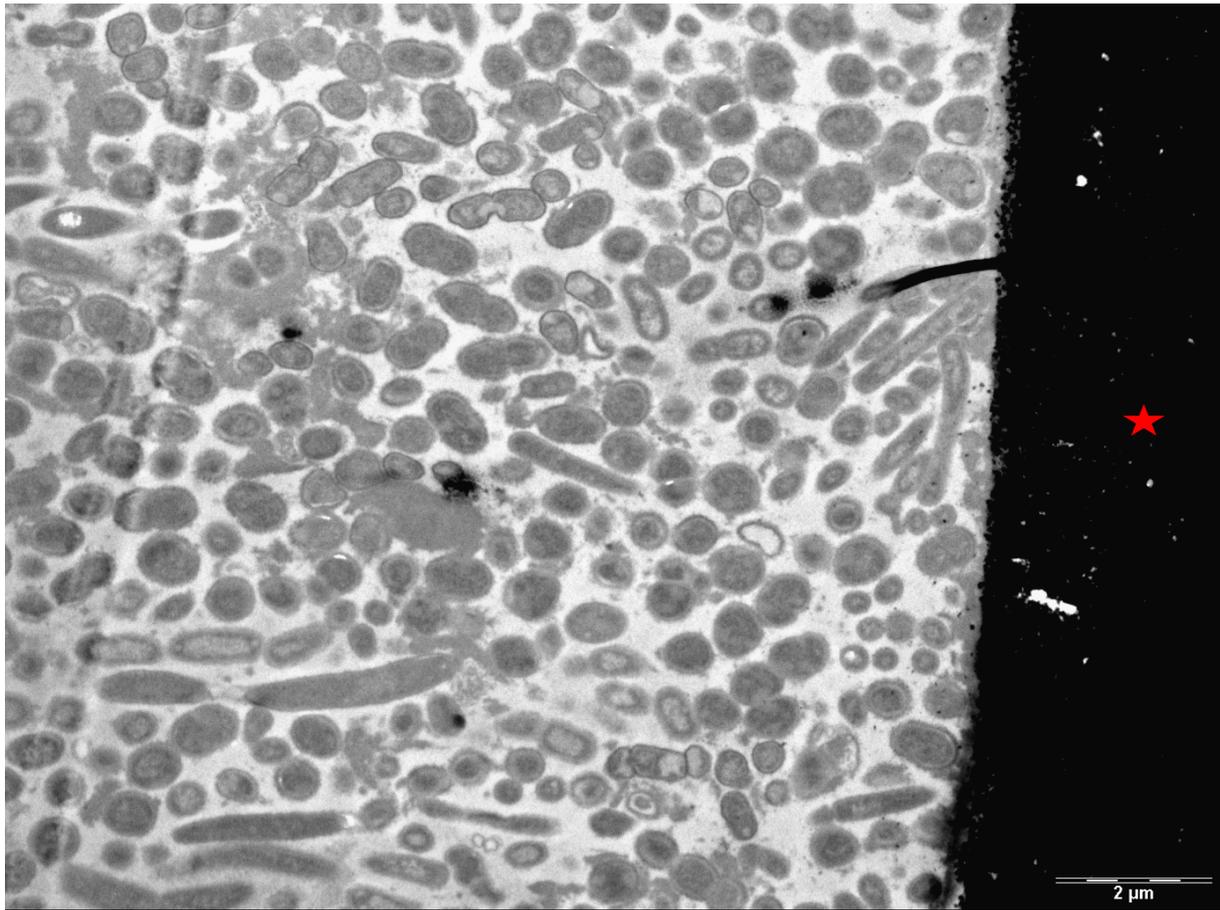
### 5.3.2 Biofilmbildung auf Dentin

Die Kontrollprüfkörper des Dentins zeigen eine intakte Pellikel und einen ausgeprägten Multilayerbiofilm mit morphologisch vielfältigen Bakterien (Abb.46-48). Im Bereich des Dentins lassen sich in manchen Präparaten angeschnittene Tubuli erkennen, welche teilweise auch mit Biofilm besiedelt sind. Die Bakterienzellen weisen die ultrastrukturellen Merkmale eines intakten, etablierten Biofilms auf.

#### Kontrolle (Spülung mit Wasser)

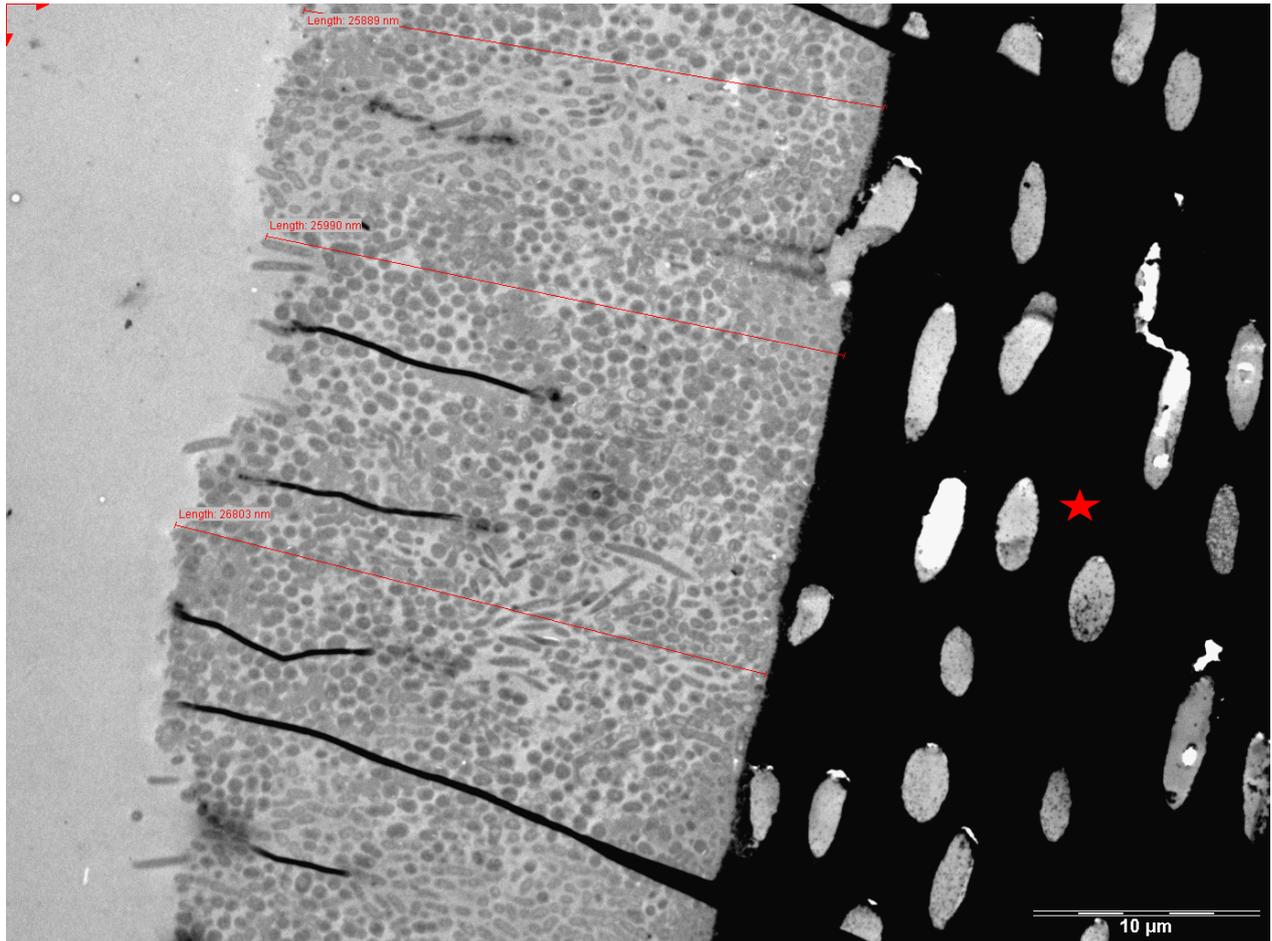


**Abb. 46: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Zu sehen ist ein etablierter mehrschichtiger Biofilm mit Bakterien unterschiedlicher Morphologie und die sie umgebende Matrix; am unteren Bildrande sind quer angeschnittenen Dentintubuli erkennbar (blauer Pfeil). Das Dentin ist mit einem Stern gekennzeichnet. Kontrollprüfkörper, Dentin bei 4800-facher Vergrößerung**



**Abb. 47: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Zu sehen ist ein etablierter mehrschichtiger Biofilm mit Bakterien unterschiedlicher Morphologie und die sie umgebende Matrix; neben kokkoiden Bakterien lassen sich auch stäbchenförmige Bakterien erkennen. Das Dentin ist mit einem Stern gekennzeichnet. Kontrollprüfkörper, Dentin bei 6800-facher Vergrößerung**

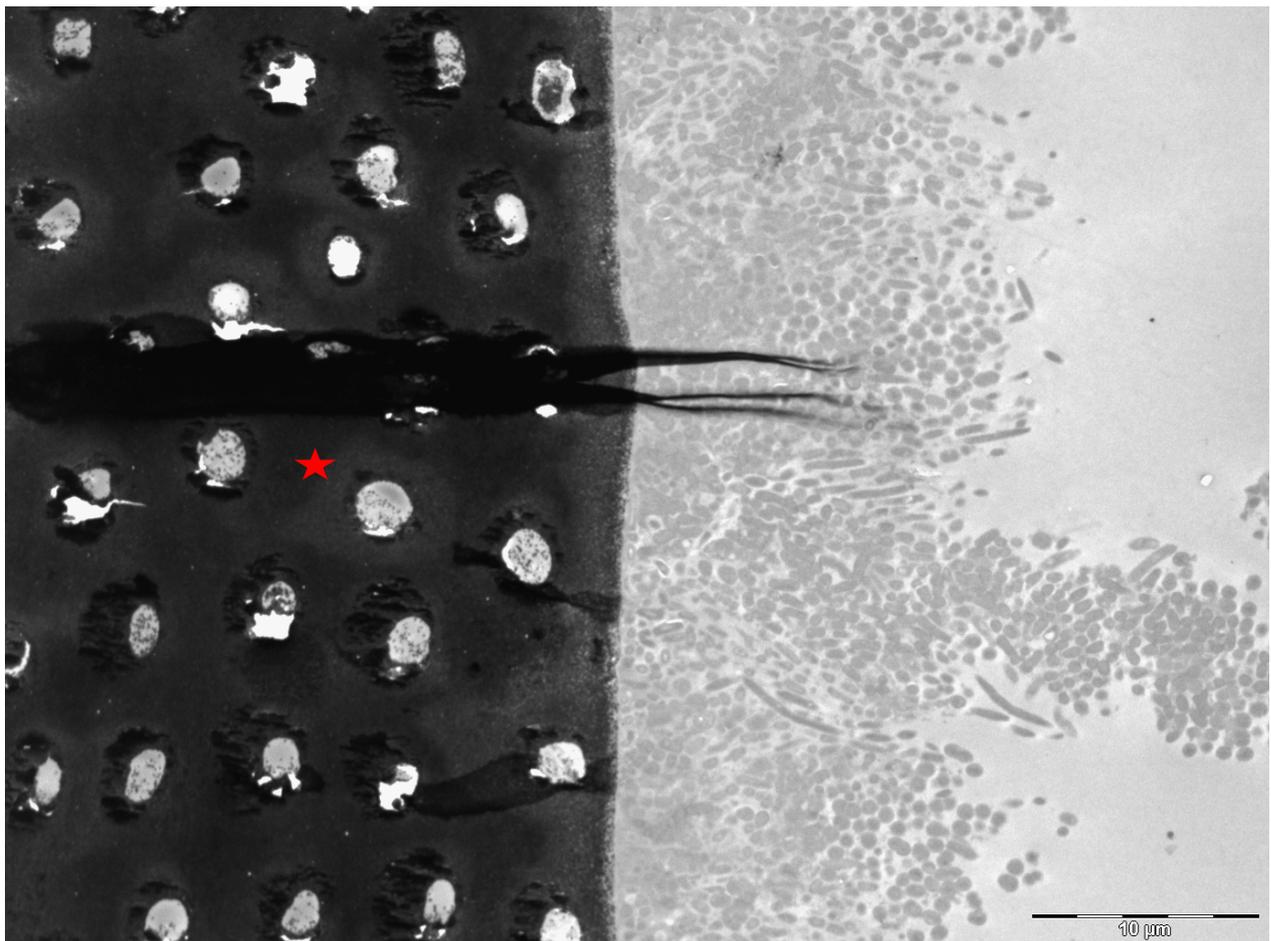
Die Kontrollprüfkörper nach protokollgerechter Spülung mit Aqua dest. zeigen einen erwartungsgemäß gleichmäßig aufgebauten, etablierten Multilayer- Biofilm mit Bakterien unterschiedlicher Morphologie. Die Zellinhalte sind homogen, die Zellwände intakt. Die Bakterien bilden, eingebettet in ihre Matrix, einen Bakterienverbund. Es lassen sich keine Hinweise auf Zelllysen oder Beschädigungen der Zellwände erkennen, die Rückschlüsse auf die effektive antibakterielle Wirkung einer Substanz geben könnten.



**Abb. 48: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Zu sehen ist ein etablierter mehrschichtiger Biofilm mit Bakterien unterschiedlicher Morphologie und die sie umgebende Matrix; auf der rechten Bildseite sind die Öffnungen der Dentintubuli erkennbar. Die Seite des Dentins ist mit einem Stern gekennzeichnet. Kontrollprüfkörper, Dentin bei 1900-facher Vergrößerung**

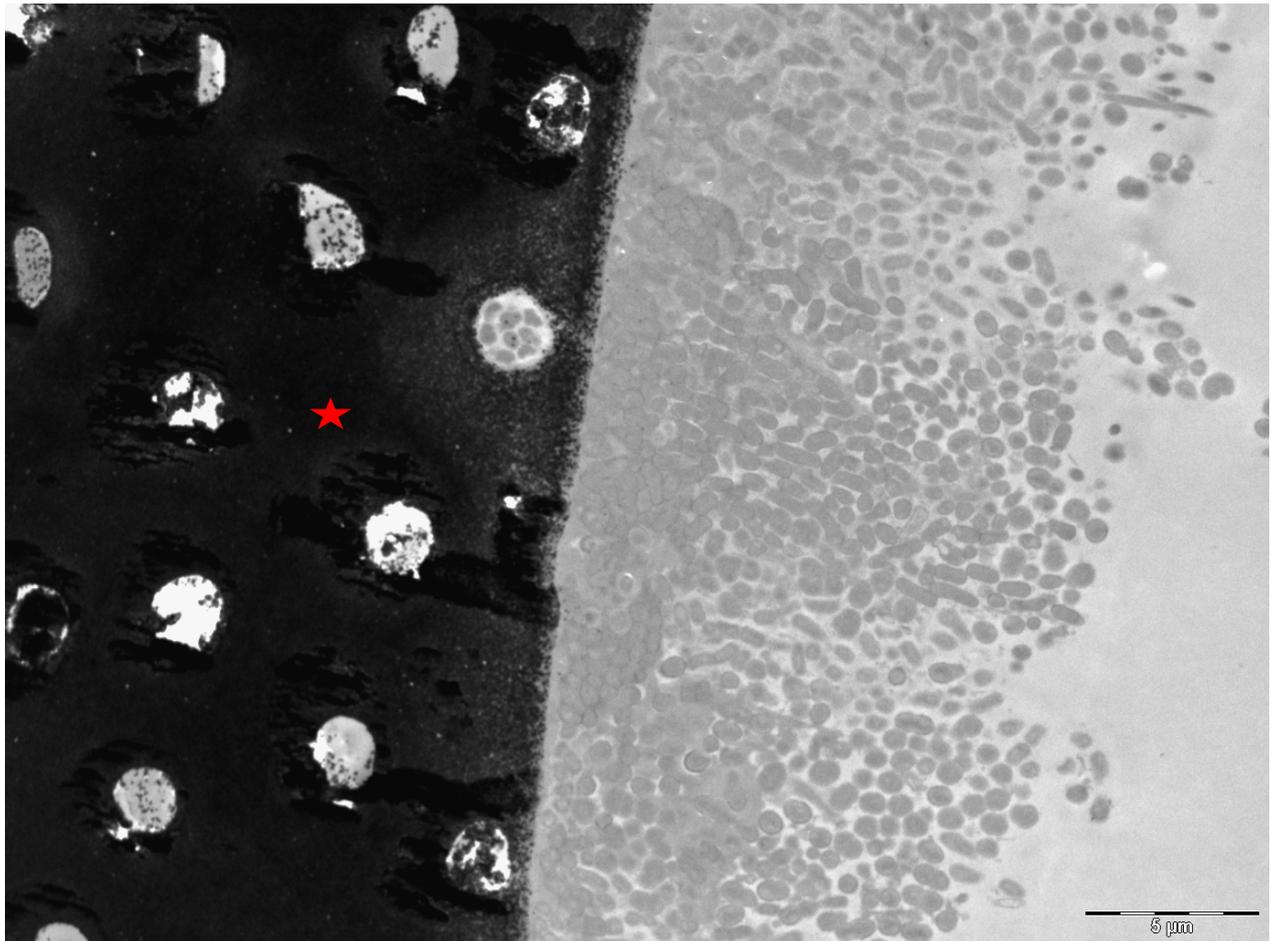
### Spülung mit Ölsäure

Auch nach Ölsäurespülung findet sich auf den Prüfkörpern eine Pellikel mit aufgelagertem etabliertem Biofilm, welcher multiple bakterielle Phänotypen beinhaltet (Abb. 49-51). Kugelförmige und stäbchenförmige Bakterien bilden, umgeben von ihrer extrazellulären Matrix, einen mehrschichtigen Bakterienrasen, der den Prüfkörper bedeckt. Bei näherer Vergrößerung kann man auch hier Einschlüsse der Spüllösung im Biofilm erkennen.



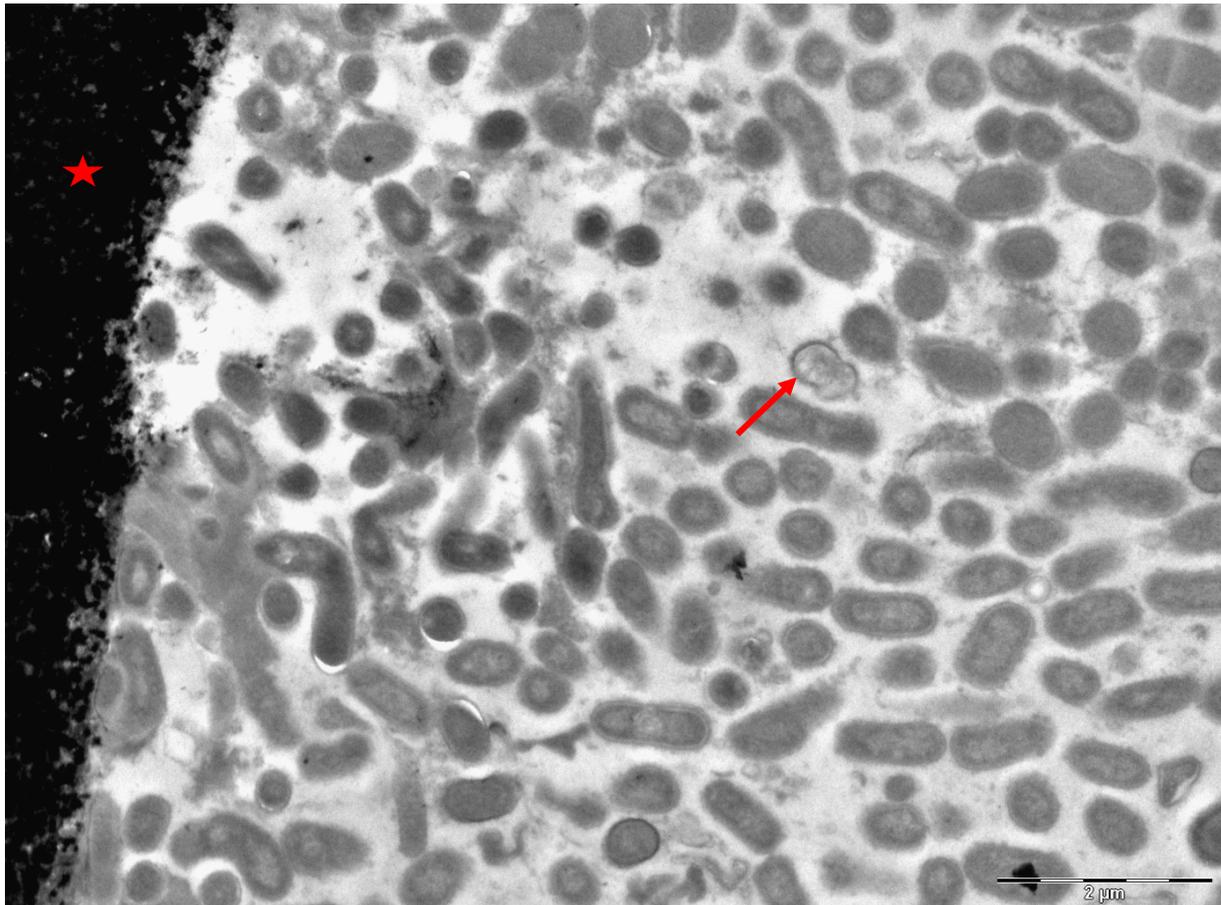
**Abb. 49: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Zu sehen ist ein etablierter mehrschichtiger Biofilm mit Bakterien unterschiedlicher Morphologie und die sie umgebende Matrix; auf der linken Bildseite sind die Öffnungen der Dentintubuli erkennbar, auch dort befinden sich Mikroorganismen. Die Seite des Dentins ist mit einem Stern gekennzeichnet.**

**Prüfkörper nach Ölsäurespülung, Dentin bei 1900-facher Vergrößerung**



**Abb. 50: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Zu sehen ist ein etablierter mehrschichtiger Biofilm mit Bakterien unterschiedlicher Morphologie und die sie umgebende Matrix; auf der linken Bildseite sind die Öffnungen der Dentintubuli erkennbar, auch dort befinden sich Mikroorganismen. Die Seite des Dentins ist mit einem Stern gekennzeichnet.**

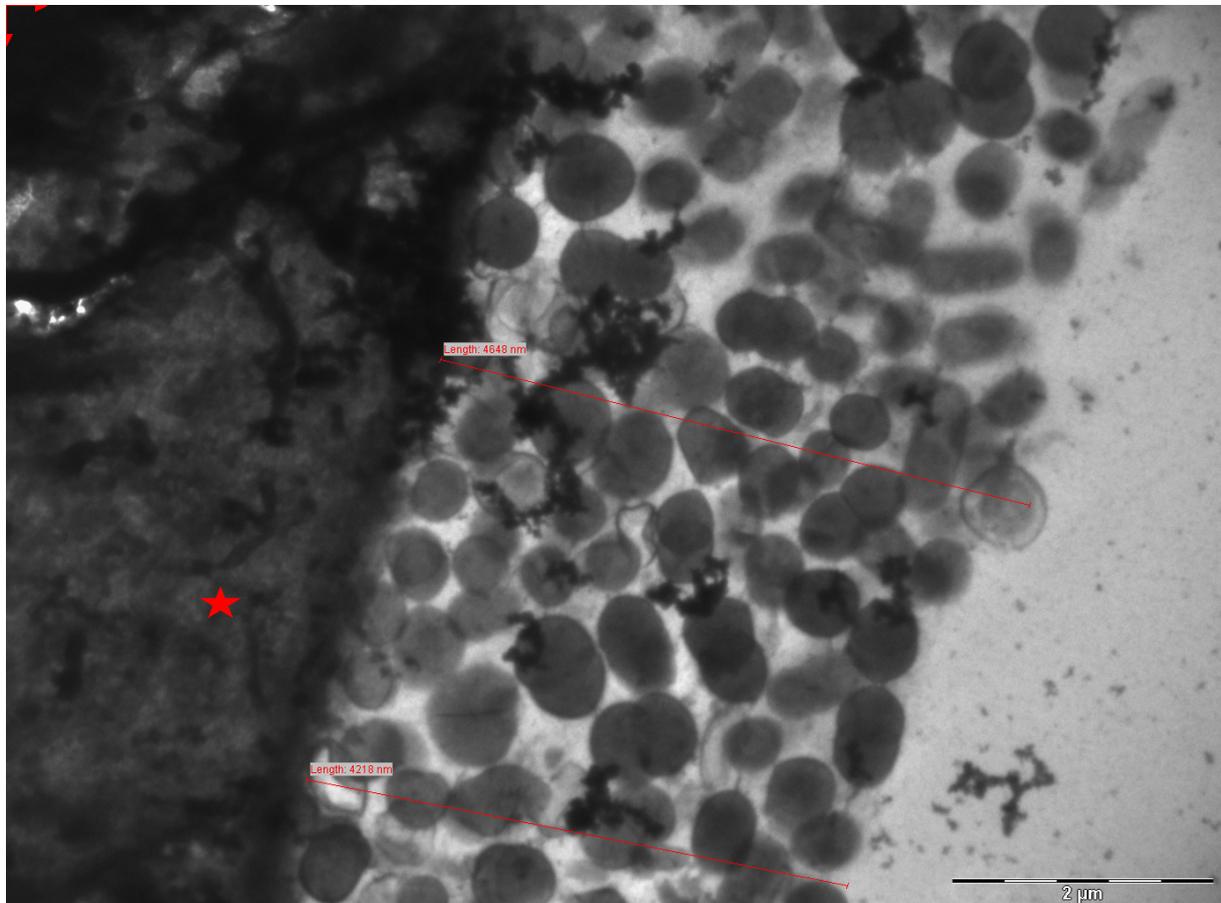
**Prüfkörper nach Ölsäurespülung, Dentin bei 2900-facher Vergrößerung**



**Abb. 51: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Zu sehen ist ein etablierter mehrschichtiger Biofilm mit Bakterien unterschiedlicher Morphologie und die sie umgebende Matrix, es lassen sich auch hier Einschlüsse der Spüllösung erkennen (Pfeil). Die Seite des Dentins ist mit einem Stern gekennzeichnet. Prüfkörper nach Ölsäurespülung, Dentin bei 9300-facher Vergrößerung**

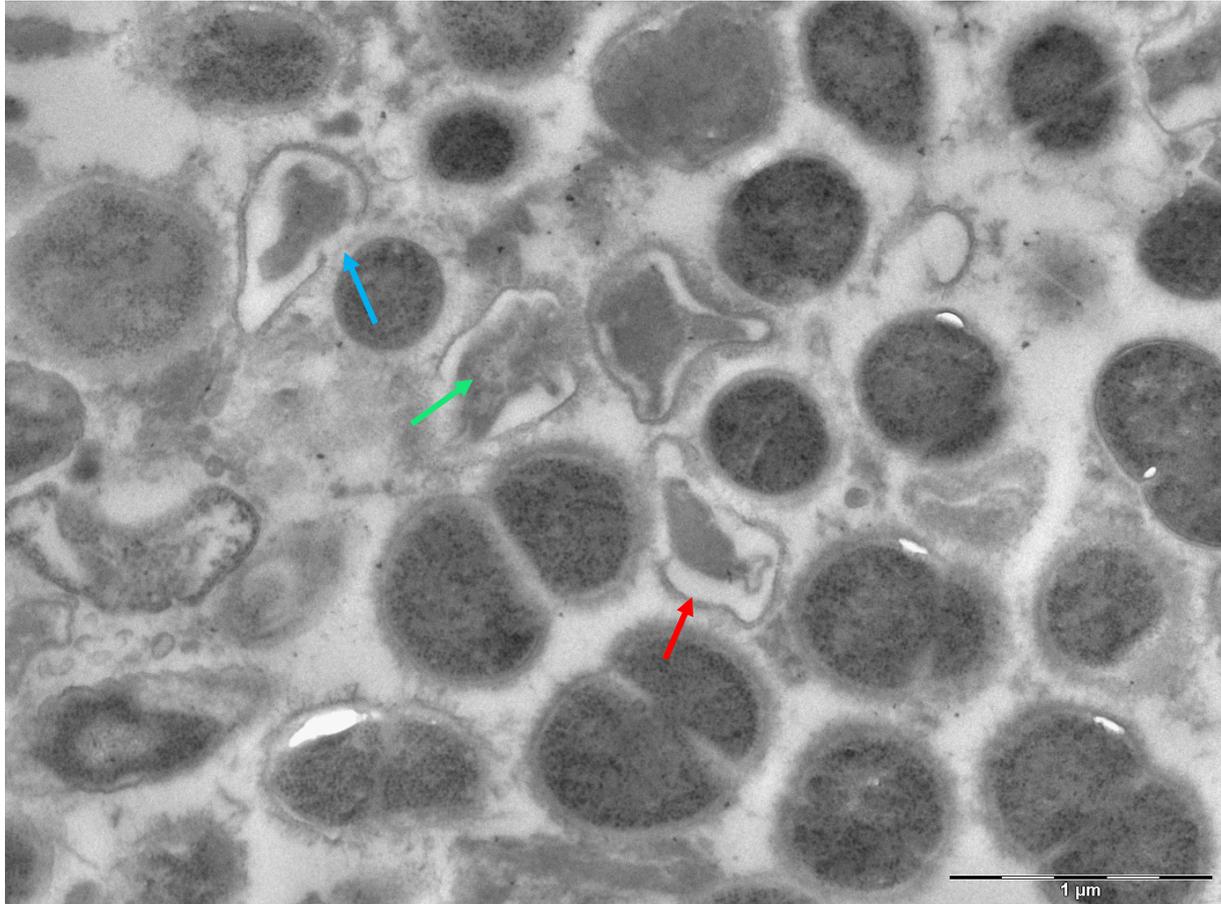
### Spülung mit Lysozym

Auch die Transmissionselektronenmikroskopiebilder des Dentins nach regelmäßiger Lysozymspülung zeigen Veränderungen auf Zellebene, verglichen mit den Bildern der Kontrolle (Abb. 52,53).



**Abb. 52: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Zu sehen sind intensiv kontrastierte Mikroorganismen, die dem im linken Bildrand zu sehendem Dentin aufsitzen (Stern).**

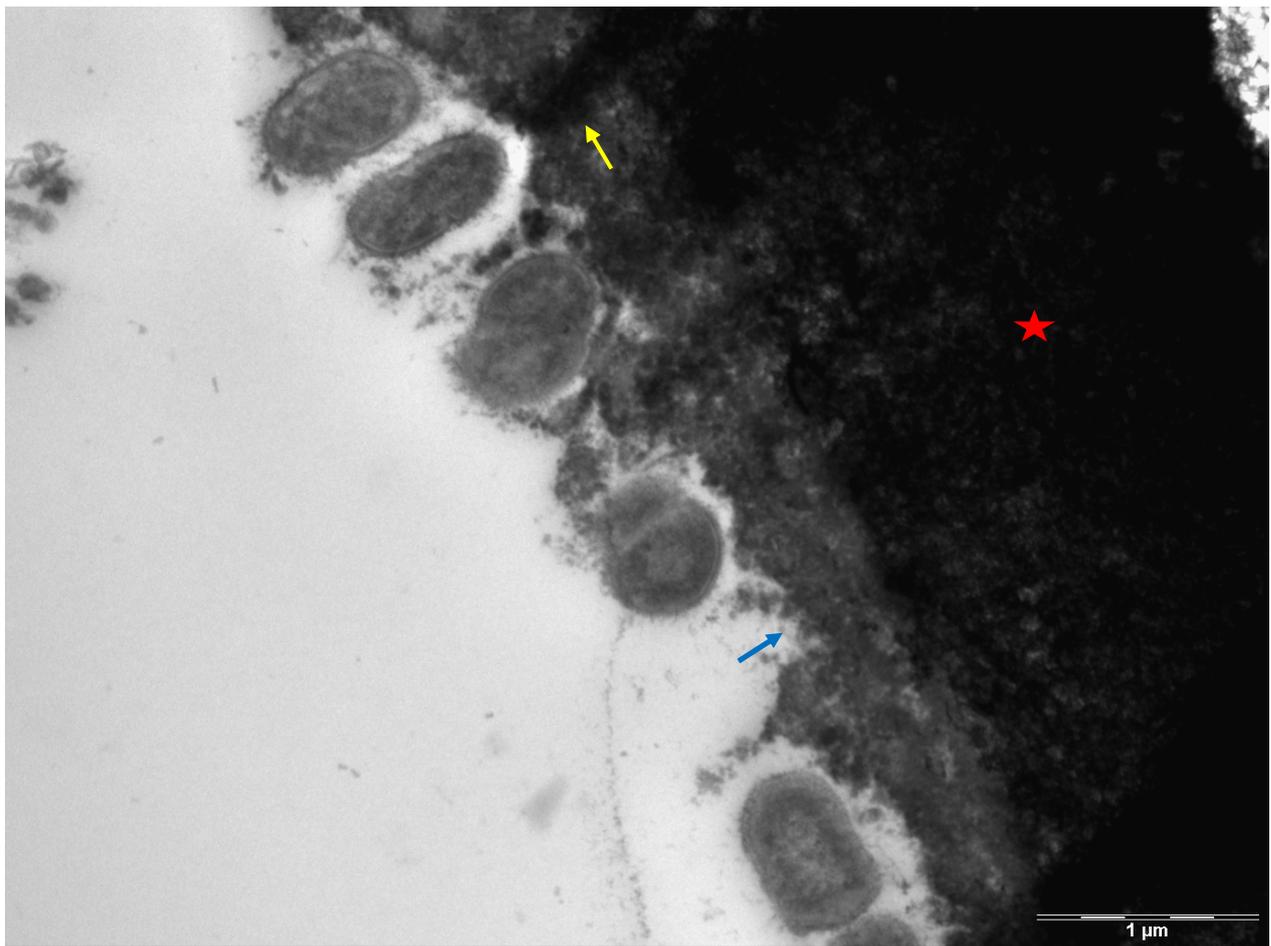
**Prüfkörper nach Lysozymspülung, Dentin bei 11 000-facher Vergrößerung**



**Abb. 53: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Zu sehen sind Mikroorganismen, welche atypische Veränderungen aufweisen. Die Zellinhalte sind geschrumpft (roter Pfeil), erscheinen nicht elektronendicht (grüner Pfeil) und die Zellwände lytisch (blauer Pfeil).  
Prüfkörper nach Lysozymbpülung Dentin bei 23000-facher Vergrößerung**

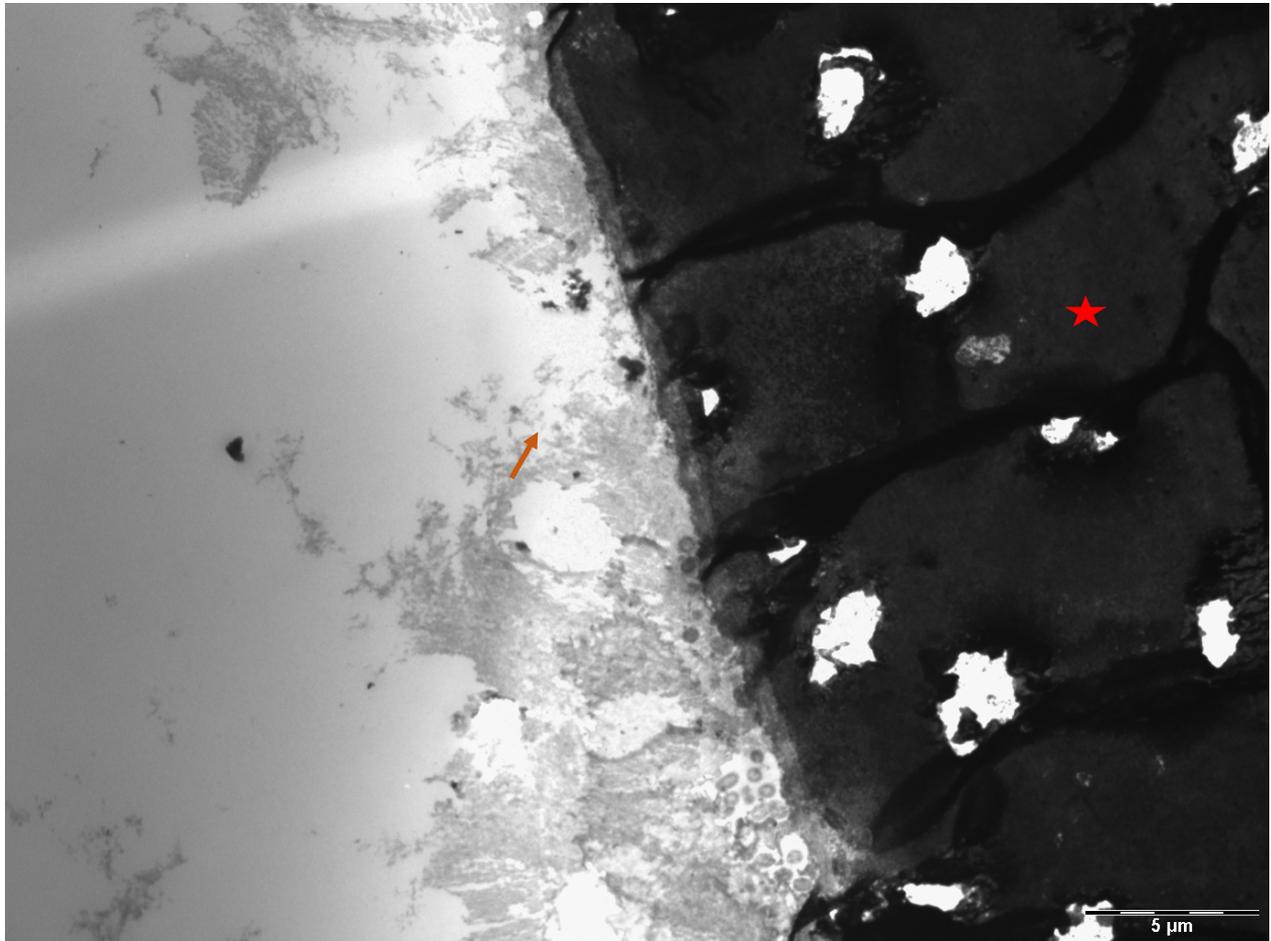
### **Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt**

Die Ultradünnschnitte der Prüfkörper, welche regelmäßiger Hopfenspülung ausgesetzt waren, zeigen erneut Unterschiede zu den Kontrollprüfkörpern (Abb. 54-59). Einer amorphen Struktur aufsitzend, welche als verdickte Pellikel erscheint, lassen sich in vielen Bereichen nur wenige Bakterien in einem lockeren Verbund erkennen. Es lässt sich keine vorangegangene Biofilmreifung erkennen, da sich nur ein einreihiger, diskontinuierlicher Bakterienrasen erkennen lässt.



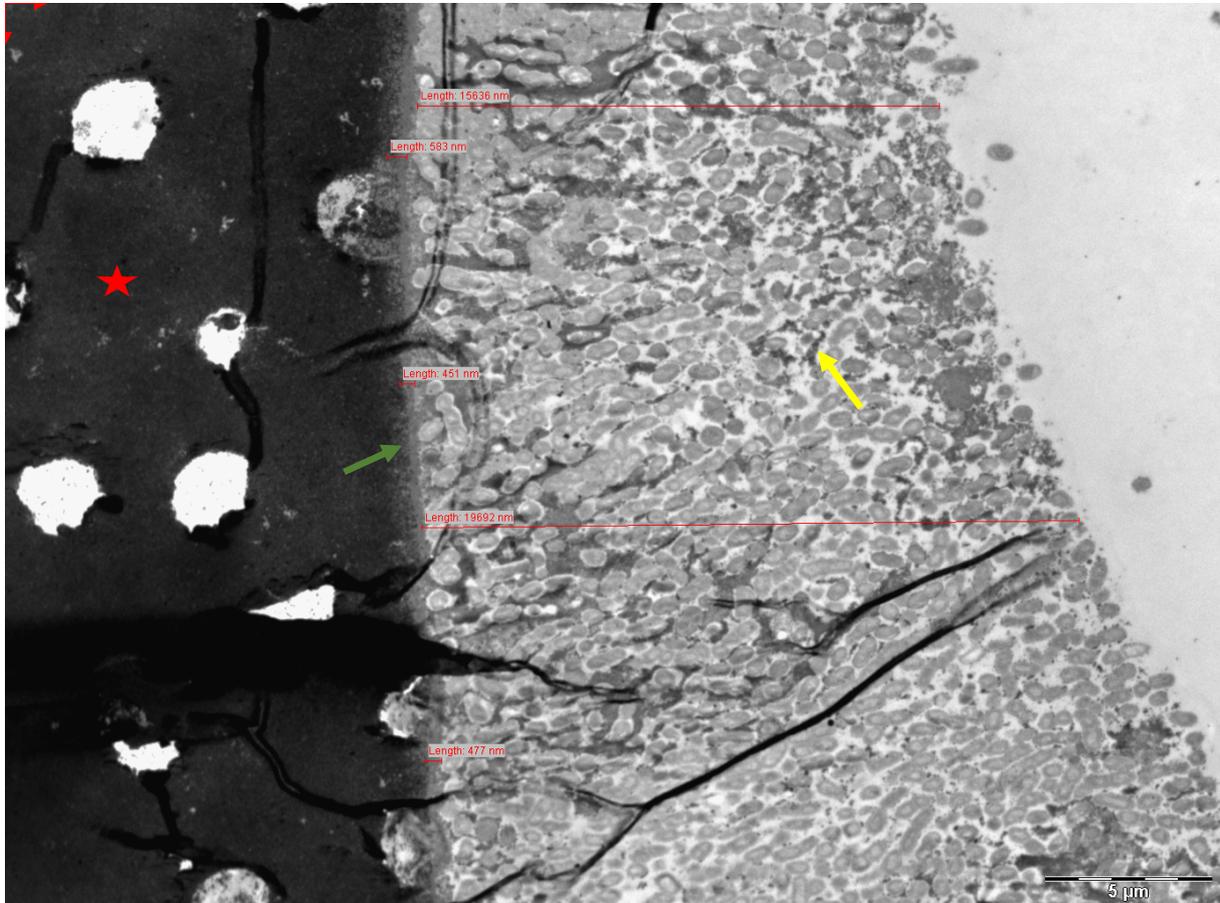
**Abb. 54: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Es lassen sich lediglich einzelne Monolayer- Bakterien erkennen, die von einer amorphen Substanz umgeben sind und der Pellikel aufsitzen, welche als hyperdense basale Schicht, an das Dentin grenzend zu erkennen ist (blauer Pfeil), innerhalb dieser Pellikelschicht lassen sich inhomogene Bereiche erkennen (gelber Pfeil). Die Seite des Dentins ist mit einem Stern gekennzeichnet. Prüfkörper nach Hopfenspülung, Dentin bei 18500-facher Vergrößerung**

In Abb. 55 findet man oberhalb der deutlich zu erkennenden Dentintubuli des Prüfkörpers lediglich einzeln angesiedelte Bakterienhäufungen, denen eine amorphe Substanz locker aufsitzt. Der Biofilm mit seiner extrazellulären Matrix erscheint inhomogen und zerklüftet.



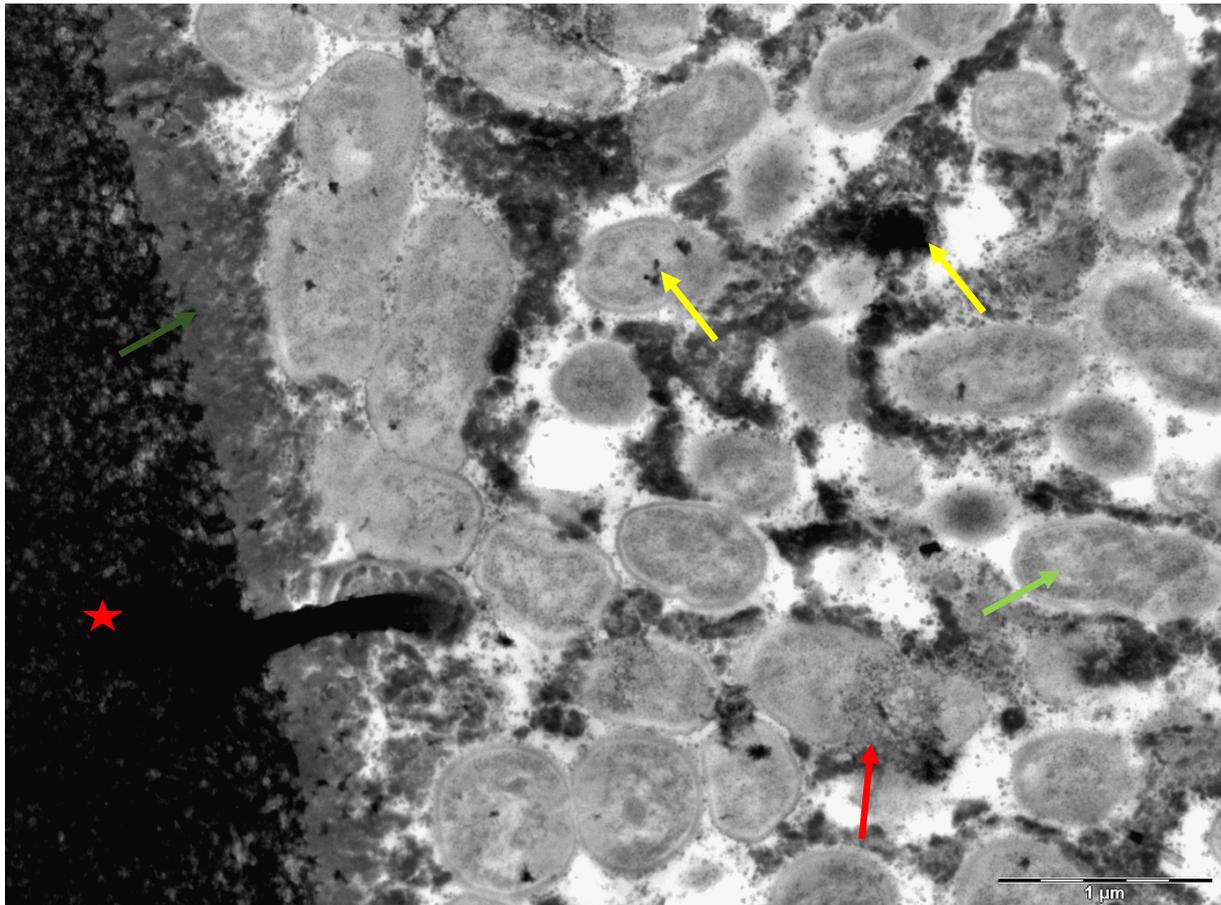
**Abb. 55: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Es lässt sich ein unstrukturierter, veränderter Biofilm erkennen, der eine verringerte Anzahl von Mikroorganismen aufweist und in einer zerklüfteten extrazellulären Matrix eingebettet ist (brauner Pfeil). Im rechten Bereich des Bildes lassen sich die quer angeschnittenen Dentintubuli erkennen. Die Seite des Dentins ist mit einem Stern gekennzeichnet. Prüfkörper nach Hopfenspülung, Dentin bei 2900-facher Vergrößerung**

In einigen Bereichen der Abb. 56 lassen sich auch Areale finden, in denen es zu einer Biofilmbildung gekommen ist. Die Zellen weisen Kennzeichen stattgefundener Denaturierungsprozesse auf.



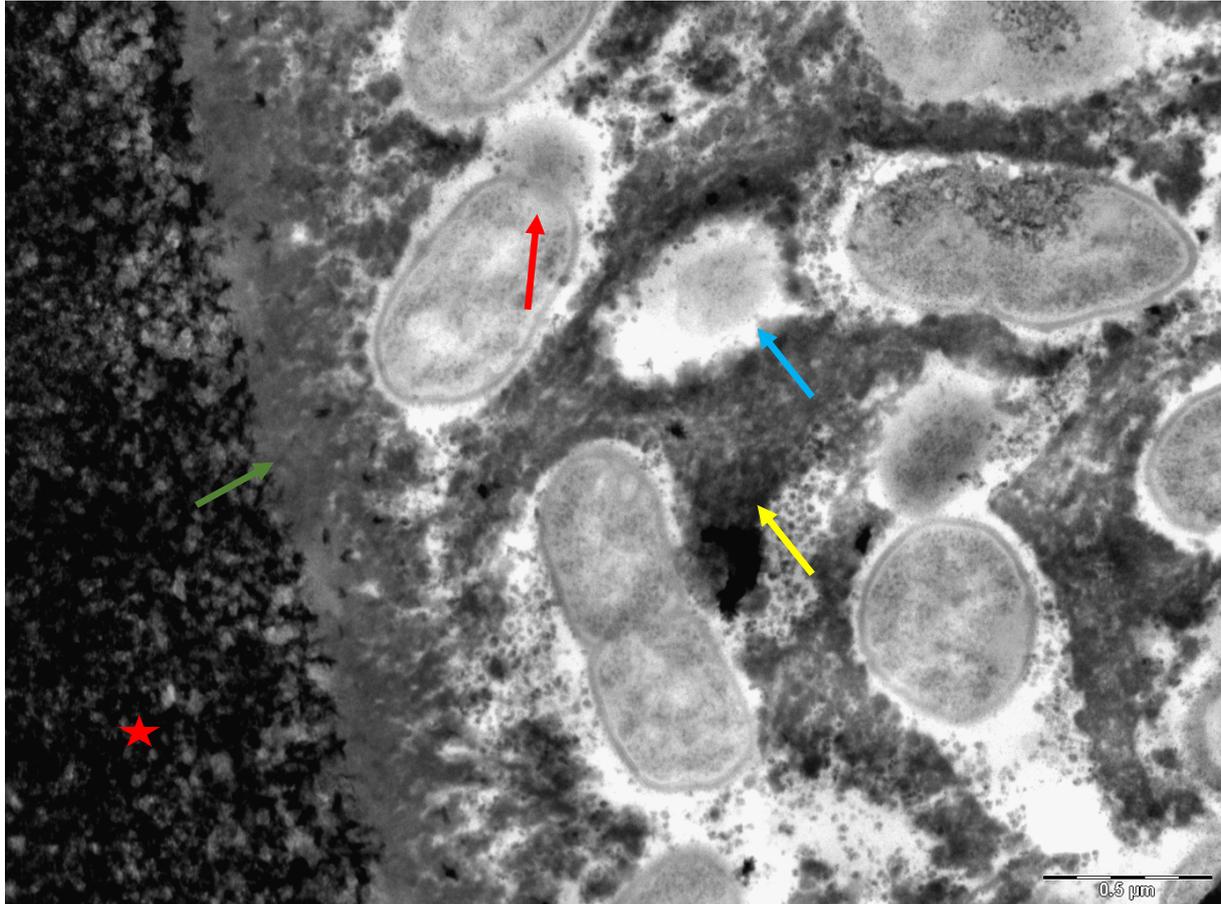
**Abb. 56: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Zu sehen ist ein mehrschichtiger Biofilm, der einer basalen Pellikelschicht aufliegt (grüner Pfeil), innerhalb der extrazellulären Substanz, die die Mikroorganismen einbettet, lassen sich hyperdense Einlagerungen erkennen (gelber Pfeil). Die Seite des Dentins ist mit einem Stern gekennzeichnet.**

**Prüfkörper nach Hopfenspülung Dentin bei 2900-facher Vergrößerung**

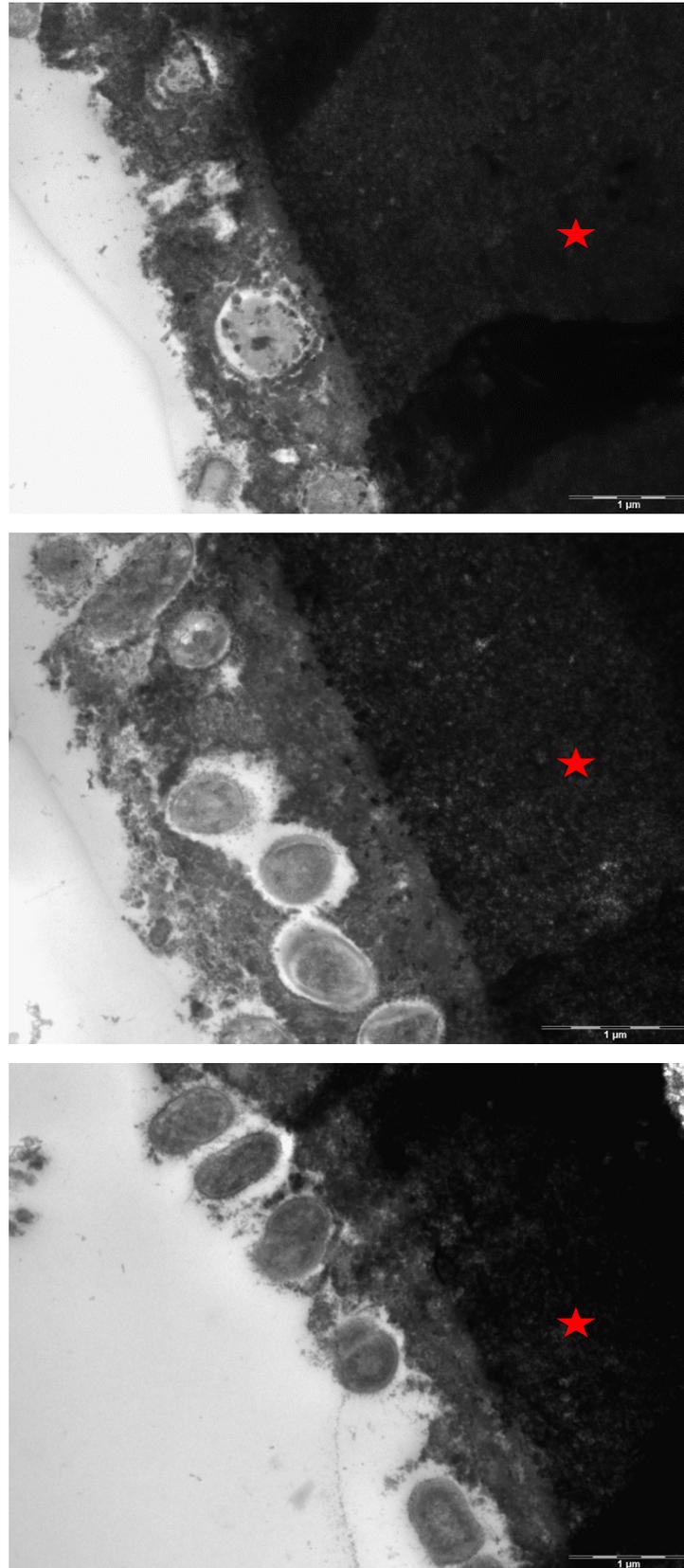


**Abb. 57: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Zu sehen ist ein mehrschichtiger Biofilm, der einer basalen Pellicelschicht aufliegt (dunkelgrüner Pfeil), innerhalb der extrazellulären Substanz, die die Mikroorganismen einbettet, lassen sich hyperdense Einlagerungen, teilweise auch innerhalb der Zellen erkennen (gelbe Pfeile), die Zellen erscheinen teilweise aufgeplatzt und der Zellinhalt nach extrazellulär verlagert (roter Pfeil), die Zellinhalte sind inhomogen (hellgrüner Pfeil). Die Seite des Dentins ist mit einem Stern gekennzeichnet.**

**Prüfkörper nach Hopfenspülung Dentin bei 18500-facher Vergrößerung**



**Abb. 58: TEM-Bild des 48 h-Biofilms: Zu sehen ist ein mehrschichtiger Biofilm, der einer basalen Pellicelschicht aufliegt (grüner Pfeil), innerhalb der extrazellulären Substanz, die die Mikroorganismen einbettet, lassen hyperdense Einlagerungen erkennen (gelber Pfeil), die Zellen erscheinen teilweise aufgeplatzt und der Zellinhalt nach extrazellulär verlagert (roter Pfeil); die Zellinhalte erscheinen teilweise geschrumpft (blauer Pfeil). Die Seite des Dentins ist mit einem Stern gekennzeichnet. Prüfkörper nach Hopfenspülung Dentin bei 30000-facher Vergrößerung**



**Abb. 59: Weitere Beispiele (TEM) eines 48 h-Biofilms auf Dentinprüfkörpern nach wiederholter Hopfen-spülung; zu sehen ist eine amorphe Substanz, mit nur wenig eingelagerten Mikroorganismen, welche atypische Veränderungen aufweisen. Die Seite des Dentins ist jeweils mit einem Stern gekennzeichnet. Dentinprüfkörper bei bei 18500-, 23000- und 18500-facher Vergrößerung (v.o.n.u.)**

## 6 Diskussion

Im Folgenden werden die Materialien, die Methodik, die Fragestellung und die gewonnenen Ergebnisse im Kontext aktueller, wissenschaftlicher Literatur beleuchtet und diskutiert.

### 6.1 Diskussion Material und Methode

#### 6.1.1 Studiendesign und Fragestellung

In den letzten Jahrzehnten wurde eine ganze Reihe wissenschaftlicher Arbeiten hinsichtlich der Weiterentwicklung von Phytopharmaka veröffentlicht. Karies resultiert vornehmlich aus der Verschiebung des oralen, physiologisch- mikrobiellen Ökosystems hin zur Dominanz pathogener (kariogener), residenter Mikroorganismen. Denn unter physiologischen Bedingungen herrscht innerhalb des oralen Mikrobioms eine symbiotische Beziehung mit dem Wirt, welche durch Kommensalismus und Mutualismus gekennzeichnet ist [5,80,86]. Erst eine Störung dieser Symbiose, beispielsweise ausgelöst durch die hochfrequente Zufuhr niedermolekularer Kohlenhydrate, kann eine Verschiebung des Mikrobioms hin zu azidogenen/ aziduren Mikroorganismen zur Folge haben, da diese einen ökologischen Vorteil in saurem Milieu besitzen [80,86]. Dieser Prozess stört das homöostatische Gleichgewicht des Biofilms und führt letztlich zur oralen Pathogenese. Aus diesem Grund ist es bei der Bekämpfung dieser mikrobiell bedingten Infektionen wichtig, die positiven Funktionen des residenten Mikrobioms nicht zu stören, indem man es beispielsweise durch Breitbandantibiotika zerstört [81,86]. Naturprodukte haben in der Vergangenheit das Potential gezeigt, eben dieses empfindliche biologische Gleichgewicht im Kampf gegen biofilmassoziierte Erkrankungen aufrechtzuerhalten [86]. Auch andere negative Effekte, die bei der Nutzung chemisch basierter Agenzien auftreten können, wie etwa Geschmacksirritationen, Schleimhautreizungen und Zahnverfärbungen, könnten bei der Nutzung naturbasierter Produkte minimiert werden [32,86]. Häufig wurden wissenschaftliche Untersuchungen zu diesem Thema jedoch im Rahmen von in-vitro-Studien durchgeführt, welche die physiologische Situation nicht exakt widerspiegeln können.

Die dort häufig ermittelten MIC (minimale Hemmkonzentration) und MBC (minimale bakterizide Konzentration) -Werte einiger Wirkstoffe resultieren aus Versuchen an planktonischen Zellen, bei denen die Wirkstoffe über längere Zeiträume (24-28 Stunden oder mehr) mit einer Reinkultur des Organismus in Kontakt gebracht wurden [81]. Da diese planktonischen Zellen jedoch, wie bereits im Vorfeld erwähnt, eine deutlich größere Empfindlichkeit gegenüber antibakteriellen Wirkstoffen zeigen [80,115,116], liegt die Vermutung nahe, dass die MIC- und MBC- Werte auf Bakterien in einem etablierten Biofilm höher sein könnten. Daher sollte in dieser Studie die Wirkweise antibakterieller natürlicher Agenzien auf einen reifen, etablierten Biofilm betrachtet werden. Aber auch Versuche an in-vitro entstandenen etablierten Biofilmen können die reale Situation in-vivo nicht vollständig widerspiegeln, worauf im nachfolgenden Unterpunkt (6.1.2) noch näher eingegangen wird.

Übersichtsarbeiten einiger Arbeitsgruppen kamen letztlich zu dem Schluss, dass die Aussagefähigkeit der in-vitro erlangten Kenntnisse über die antikariogene Wirkung verschiedener Naturextrakte in Zukunft durch weitere klinische in-situ- und in-vivo- Studien untermauert werden sollten. Beispielhaft zu nennen wären hierbei die Übersichtsarbeiten von Ferrazzano et al. und Slobodníková et al., die sich mit den antikariogenen bzw. antibiofilm- Eigenschaften pflanzlicher Polyphenole beschäftigten, sowie das systematische Review von Freires et al., in dem die antibakterielle Aktivität von ätherischen Ölen gegen kariogene Bakterien beleuchtet wurde [28,32,100].

### 6.1.2 Biofilmgewinnung und Spüllösungen

Grundsätzlich unterscheidet man im Bereich der wissenschaftlichen Biofilmforschung zwischen in-vitro und in-vivo gewonnenen Biofilmen.

Definitionsgemäß bezeichnet „in-vitro“ allgemein organische Vorgänge, die außerhalb eines lebenden Organismus stattfinden. Der Vorteil von in-vitro gewonnenen Biofilmen liegt in deren Reproduzierbarkeit und der Unabhängigkeit von individuellen Einflussfaktoren, wie beispielsweise der Ernährungs- und Putzeigenschaften der einzelnen Probanden. So ergeben sich strikt kontrollierbare Versuchsbedingungen, die sowohl gut reproduziert als auch miteinander verglichen werden können [78].

Außerdem ist es möglich, den außerhalb eines lebenden Organismus entstandenen Biofilm je nach Anforderungen in Hinblick auf die vorliegende Studie zu modifizieren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es nach wie vor klare Unterschiede hinsichtlich der Bioadhäsion in-vitro und in-vivo gibt [39,103]. Mehr als 50 % der oralen Bakterienflora sind nicht kultivierbar [1,103]. Nachteilig anzusehen sind außerdem die fehlenden Scherkräfte, die durch Mund- und Wangenbewegungen unter physiologischen Umständen entstehen und den Biofilm in seiner Entstehung und Struktur verändern können. Auch vom Körper intrinsisch hergestellte, antibakterielle Agenzien des Immunsystems wie das oben erwähnte Lysozym haben in in-vitro-Studien (ohne äußerliche Zufuhr) keinen Einfluss auf den Biofilm, was ebenfalls die exakte Wiedergabe natürlicher Gegebenheiten einschränkt [78,115].

Im Gegensatz hierzu steht die Biofilmgewinnung im Rahmen von in-vivo-Versuchen. Die Biofilme entstehen hierbei direkt im lebenden Organismus und unter natürlichen, physiologischen Bedingungen. Die Komplexität der Mundhöhle gewährleistet ein Zusammenspiel aller relevanten Einflussfaktoren, wie Nahrungsaufnahme, kinetische Kräfte, hormonelle und immunologische Komponenten und Mundhygiene. Es hat jedoch auch zur Folge, dass ein bedingungsloser Vergleich zwischen einzelnen Probanden nicht möglich ist. Auch die immunologischen Reaktionen der Probanden können beispielsweise die Objektivität der in-vivo-Studien erhaltenen Ergebnisse verringern.

Mit Hilfe spezieller Trägermaterialien ist es möglich, entstandenen Biofilm aus der Mundhöhle zu gewinnen. Die Verwendung von auf Miniplastschienen fixierten Prüfkörpern ist ein kostengünstiges, einfaches und schnell verfügbares Mittel, um die Probekörper dem intraoralen Milieu auszusetzen [45,107]. Durch die intraorale Ausdehnung der Schiene, welche sich auf die Zähne und einen geringen Teil des Proceccus alveolaris beschränkt, konnte eine physiologische Speichelsekretion gewährleistet werden, was für die regelrechte Biofilmbildung eine unerlässliche Voraussetzung darstellt. Durch das Design der Schiene und die stabile Positionierung der Probekörper im Zentrum der Vestibulärfläche konnte eine Entnahme der Schiene problemlos durch Unterhaken an den Rändern gewährleistet werden, ohne die bereits gebildeten Biofilme der Gefahr einer Kontamination oder mechanischen Zerstörung auszusetzen. Hierdurch war es den Probanden möglich, die Schiene für die Zeit der Nahrungsaufnahme zu entfernen und sie anschließend problemlos wieder zu repositionieren.

Einen weiteren Vorteil bietet die Wiederverwendbarkeit der Schienen während der verschiedenen Versuchsreihen, was einer Reproduzierbarkeit zuträglich ist. Eine gewisse Reproduzierbarkeit wurde ebenfalls durch eine gleichbleibende Positionierung der Prüfkörper auf den Schienen angestrebt. Diese erfolgte im Oberkiefer vestibulär im Bereich der Prämolaren beginnend mit einem Abstand von etwa 1-2 mm zwischen den Prüfkörpern. Durch diese reproduzierbare Positionierung war es möglich, Speichelfluss, Scherkräfte der benachbarten Weichgewebe und die Speichelzusammensetzung, die auf die Prüfkörper einwirkten, weitestgehend konstant zu halten [46]. Um einen Einfluss der sich möglicherweise aus dem Silikon nach Abbinden lösenden Partikel auf die Prüfkörperoberflächen zu verhindern, wurden die Schienen nach abgeschlossener Prüfkörpermontage für mindestens 12 h unter Kühlung in aqua dest. gelagert.

Die Spüllösungen wurden in lichtgeschützten Gefäßen zu je 10 ml vorportioniert, sodass die Probanden eine exakt vordefinierte Menge zur Spülung zur Verfügung hatten. In einigen vorangegangenen Studien wurden hydrophobe, natürliche Testsubstanzen, wie etwa die hier verwendete Ölsäure, in hochprozentigem Alkohol gelöst. So lösten Watanabe et al. 2019 die verschiedenen Fettsäuren in Ethanol, bevor sie das Gemisch auf die kultivierten *S. aureus*- und *S. epidermis*-Stämme gaben [110]. Zwar schlossen sie durch vorangegangene Tests die eigenständige antibakterielle Wirkung des mit geringen Restgewichtsprozents vorhandenen Ethanol aus, dennoch kann es als Vorteil gesehen werden, dass die im vorliegenden Versuchsaufbau getesteten hydrophoben Substanzen ohne alkoholhaltige Lösungsmittel auskommen. So ist ein singulärer Blick auf die antibakterielle Wirkweise der Fettsäuren, ohne aufwendige Referenzversuche möglich gewesen.

### 6.1.3 Prüfkörperherstellung und Prüfkörperbearbeitung

Um eine möglichst genaue und realistische Darstellung des physiologischen Biofilms zu erhalten, wurden in der vorliegenden Studie bovine Schmelz- und Dentinprüfkörper angewendet, die intraoral positioniert wurden. Die Wahl boviner Probekörper wurde aufgrund der strukturellen und biologischen Ähnlichkeit zum menschlichen Zahn getroffen. Die anatomischen Strukturen sowohl als auch die histologische Mikrostruktur von Rinderzähnen sind denen menschlicher Zähne ähnlich [61,66,105,118]. Die Vorteile der Nutzung boviner Zähne zu Versuchszwecken liegt vor allem in der weitaus größeren Verfügbarkeit. Zusätzlich zu der besseren Verfügbarkeit tierischer extrahierter Zähne stellt die Kariesfreiheit und Homogenität der Zähne einen weiteren Vorteil dar. Aufgrund der weitestgehend identischen Ernährung und des ähnlichen Alters zur Zeit der Schlachtung der Rinder kann man von einer guten Vergleichbarkeit der Proben ausgehen. Durch die einheitliche Dimensionierung der Probeplättchen und die einheitliche Politur konnte eine annähernd konforme und glatte Oberfläche gestaltet werden, die die Pellikel- und Biofilmentstehung in ihrer Homogenität begünstigt. Auch durch die natürliche Größe der Rinderfrontzähne war es möglich Probeplättchen herzustellen, die eine ausreichend große Oberfläche boten, um sicher auf den Miniplastschienen montiert werden zu können. Es wurde für alle in die Untersuchung einfließenden Probekörper ein identisches Reinigungs- und Vorbereitungsprotokoll angewandt.

#### 6.1.4 Auswahl der Probanden/ Versuchsbedingungen

Die Intention der Studie war es, den Effekt natürlicher Agenzien auf den physiologischen Biofilm zu untersuchen. Um die Pellikelbildung und Biofilmformation nicht in ihrer regelhaften und physiologischen Entstehung zur beeinflussen, wurden jene Probanden ausgewählt, deren intraorale Inspektion weder aktive Kariesläsionen noch akute oder chronische parodontale Entzündungen aufweist.

Ebenso wurden den Speichelfluss oder die Speichelzusammensetzung verändernde Medikamente und Vorerkrankungen ausgeschlossen. Denn in Studien konnte gezeigt werden, dass Medikamente und systemische Erkrankungen einen negativen Einfluss auf Speichelflussrate und Pufferkapazität haben können [74,117]. Vorangegangene Bestrahlungen (Radiatio) im Bereich des Kopfes wurden beispielsweise als Ausschlusskriterium gewertet. Zum einen ist die Quantität des Speichels post radiationem erniedrigt (Xerostomie), zum anderen konnten Hannig et al. feststellen, dass bei bestrahlten Tumorpatienten auch der Anteil prolinreicher Proteine, welche einer protektiven Aufgabe im Speichel nachkommen, sank [47]. Alle Probanden durften ihren bestehenden Essgewohnheiten nachgehen, sollten in der Phase der Versuchsdauer jedoch auf potentiell oder erwiesenermaßen antibakterielle Lebensmittel verzichten (alkoholische Getränke, koffeinhaltige Getränke etc.).

Um sinnvolle Vergleiche zwischen den Proben anstellen zu können war es wichtig, sowohl innerhalb der verschiedenen Versuchsreihen eines Probanden als auch innerhalb der verschiedenen Versuchsreihen der Probanden untereinander möglichst einheitliche Voraussetzungen und Bedingungen zu schaffen. Aus diesem Grund erfolgte der Beginn der Versuchsreihe, also die Insertion der Schienen, stets zwischen 8 Uhr und 9 Uhr am Morgen. So sollten die zirkadialen Schwankungen der Speichelzusammensetzung berücksichtigt werden [46,84]. Auch die postprandiale Verschiebung des pH- Wertes sollte Berücksichtigung finden. Stephan veröffentlichte hierzu 1944 die sogenannte Stephankurve, die den Verlauf des pH-Wert-Abfalls nach der Substratzufuhr und der darauffolgenden Normalisierung des pH-Wertes verdeutlicht [104]. Um die Biofilmbildung nicht in azidem Mileu zu halten, wurden die Probanden aus diesem Grund angewiesen die Schiene erst 30 min nach Beendigung der Nahrungsaufnahme zu repositionieren.

### 6.1.5 Biofilmuntersuchung

Die Untersuchung des Biofilms erfolgte unter Zuhilfenahme unterschiedlicher Mikroskopieverfahren.

#### Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Verfahren stellen ein wichtiges und weit verbreitetes Verfahren zur Beurteilung der Wirkung antibakterieller Agenzien auf Bakterien dar. In Kombination mit den im Vorfeld beschriebenen Vitalfärbemethoden ermöglichen sie, zwischen lebenden und toten Bakterien zu unterscheiden. Es ist als ein herausragender Vorteil fluoreszenzmikroskopischer Techniken anzusehen, dass sie häufig an unveränderten Präparaten angewandt werden können, ohne den Biofilm zuvor vom Prüfkörper abtrennen zu müssen und somit die natürliche Struktur zu zerstören [2,115]. Die Prüfkörpervorbereitung ist also verhältnismäßig unkompliziert und birgt keine besonders hohen Verarbeitungsrisiken. Außerdem spiegelt die unmittelbare fluoreszenzmikroskopische Visualisierung in-vivo entstandenen Biofilms die volle Breite bakterieller Varianz in oralen Biofilmen dar [103]. Obwohl Lichtmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie die Visualisierung von Bakterien ermöglichen, sind Techniken mit einer höheren Auflösung notwendig, um detailliertere Einblicke in die Ultrastruktur der Mikroorganismen und die sie umgebende Matrix zu erhalten [40,115]. Eine morphologische Unterscheidung kann im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie nur zwischen Kokken und Stäbchen getroffen werden. Eine exakte Klassifizierung der Bakterienspezies lässt sich nicht treffen. Ein weiterer Parameter, der mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops nicht detektiert werden kann, ist die Unterscheidung zwischen tiefer gelegenen und oberflächlichen Bakterien-schichten [115]. Dies ist vor allem deswegen problematisch, weil eine Abhängigkeit des physiologischen Zustandes und auch die Vulnerabilität gegenüber antibakterieller Wirkstoffe von der Lage der Bakterienzelle innerhalb des Biofilms abhängt [2,3]. Daher ist die Fluoreszenzmikroskopie auch lediglich als zusätzliche, richtungsweisende Informationsquelle über den Vitalitätszustand der in den oberen Flächen befindlichen Mikroorganismen sinnvoll. Mehrlagige Biofilme sind nur bedingt auswertbar.

Zur Analyse der fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurde das in Java geschriebene, frei zugängliche (open source-) Programm ImageJ verwendet, das über die Betriebssysteme Windows, Mac oder Linux genutzt werden kann. Dieser, aus der freien Zugänglichkeit entstehende kollaborative Charakter macht das Programm im Allgemeinen und in der Biofilmanalyse im Besonderen so nützlich [113]. Das Programm ist außerdem in der Lage eine Vielzahl an Bildformaten zu erkennen und zu lesen, wie beispielsweise JPEG, TIFF, GIF, DICOM etc. [113]. ImageJ wurde entwickelt, um in Laborsituationen Bilder zu interpretieren. Hierbei geht es um die informationstechnische Verarbeitung von Bildsignalen, die Bilddaten werden vermessen und analysiert. Das Programm ist in der Lage die Farbintensität der Bilder zu erkennen und zu messen. Die durch die live/ dead staining- Lösung angefärbten Bakterien können so in Bezug auf die Gesamtoberfläche des Prüfkörpers gezählt werden. Ebenfalls kann durch die Analyse der einzelnen Fluoreszenzbereiche (grüner oder roter Kanal) eine Aussage über den Anteil vitaler und toter Bakterien getroffen werden.

Die Wirkung der Staining Solution basiert auf der Interaktion fluoreszierender Reaktionsfarbstoffe. Syto9 ist ein Nukleinsäure-Farbstoff, der innerhalb der Zelle verstoffwechselt wird und vitale sowie avitale Zellen anfärbt, während das Propidiumiodid nur mit den Aminenzestörten Zellen agiert. Also ist es Propidiumiodid lediglich möglich, Zellen mit zerstörter Cytoplasmamembran zu penetrieren. Dort kann es die Wirkung des ebenfalls fluoreszierenden Syto9 aufheben bzw. überlagern. Vitale Bakterien fluoreszieren grün (Excitation 485 nm, Emission 498 nm), während die zerstörten Bakterien mit durchlässiger Membran rot fluoreszieren (Excitation 535 nm, Emission 617 nm). Auf diesem Wege ist eine Differenzierung der Bakterien in lebendig und tot möglich. Diese Differenzierung, welche auf der unterschiedlichen Permeabilität der Zellwände basiert, eröffnet die Möglichkeit, die prozentualen Anteile toter und lebendiger Bakterien vor, während und nach der Applikation antibakterieller Substanzen miteinander zu vergleichen [103]. Direkt nach Beendigung des Versuches und der Entnahme der Prüfkörper aus der Mundhöhle mussten diese umgehend der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung unterzogen werden, da sich Trockenheit und Licht negativ auf den Biofilm auswirken und das Testergebnis verfälschen können. Aus diesem Grund waren ein rasches Demontieren sowie eine zügige und behutsame Reinigung der Prüfkörper mit sterilem und pyrogenfreiem Wasser von Nöten, um die Prüfkörper für die weitere Untersuchung vorzubereiten. Auch in diesem Fall wurden die Prüfkörper sofort in einem Hygrophor und unter lichtgeschützten Bedingungen gelagert, um eine Verschiebung des Testergebnisses hin zu toten Bakterien zu verhindern.

Nachdem das Präparat zunächst bei kleiner Vergrößerung in Gänze betrachtet wurde, war es nun möglich in die eigentliche Untersuchungsvergrößerung zu wechseln. Vor Aktivierung des Objektivrevolvers auf das Objektiv 100x (1000-fache Vergrößerung) musste zunächst noch eine Immersionsflüssigkeit aufgebracht werden (Immersionsöl Immersol 518 F halogenfrei Zeiss, Deutschland). Diese Flüssigkeit stellt ein hochauflösendes Immersionsöl dar, das abgesehen von der positiven Beeinflussung der Auflösung auch zur Unterdrückung von kontrast-senkenden Reflexionen dient. Diese Artefakte könnten durch Brechungsindexungenauigkeiten aufgrund der unterschiedlichen Brechungsindices von Luft und Prüfkörper entstehen und würden die Qualität der Bilder erheblich zum Negativen beeinflussen.

### Rasterelektronenmikroskopie

Nachdem ein Festkörper mit hinreichend großer Energie bestrahlt wurde, findet infolgedessen eine ganze Reihe von Wechselwirkungsprozessen statt, die mit geeigneten Detektionssystem registriert und nach elektronischer Weiterverarbeitung zur Bilderzeugung genutzt werden können. Diese Art der Signalentstehung, durch einen beschleunigten Elektronenstrahl, wird im Rahmen der Elektronenmikroskopie genutzt und sie ermöglicht es, submikroskopische Strukturen mit einer 10- 500 000-fachen Vergrößerung zu charakterisieren. Die Darstellung bakterieller Biofilme kann durch elektronenmikroskopische Aufnahmen in Bezug auf ihre Morphologie sinnvoll ergänzt werden. Diese Aufnahmen ermöglichen eine detaillierte Ansicht der Ultrastruktur der Bakterien und deren Umfeld [1,40,113]. Das REM zeichnet sich durch eine hohe Auflösung und eine ausgeprägte Tiefenschärfe aus [10,78].

Jedoch ist die Quantifizierung adhärenen Biofilms mit dieser Methode schwierig. Rasterelektronenmikroskopie erlaubt also eine dreidimensionale Darstellung von Oberflächenstrukturen in unterschiedlichen Auflösungen. Angesichts der Tatsache, dass die für das Rasterelektronenmikroskop vorgesehenen Proben aufwändig und sorgfältig vorbereitet werden müssen (Fixierung, Dehydratation und Beschichtung) ist es eine relativ zeitaufwendige Methode der Mikroskopie. Außerdem birgt die Dehydratation aufgrund des hohen Wasseranteils von Biofilmen die Gefahr, dass die Proben beschädigt werden [78,113]. Die Untersuchung an lebenden Zellen ist ebenfalls nicht möglich, da die Proben in einem Hochvakuum bestrahlt werden.

Als alleinige Auswertungsmethode ist bei dieser Methode als nachteilig anzusehen, dass es häufig außerdem nicht möglich ist, verschiedene Bakterienspezies exakt zu evaluieren und somit die Differenzierung zwischen Kokken, Stäbchen und Filamenten schwierig ist [40].

### Transmissionselektronenmikroskopie

Die Standardmethode der Elektronenmikroskopie, die genutzt wird, um ultradünne Bereiche zu untersuchen, ist die Transmissionselektronenmikroskopie. Der große Vorteil ist die hohe Auflösung bis in den Subnanometerbereich und die ausgeprägte Tiefenschärfe [40,114]. Seit den ersten Nutzungen des TEM in den frühen 1940er Jahren hat es sich bei der Analyse nahezu aller zellulärer Komponenten einschließlich des Zytoskeletts, der Membransysteme, Organellen, Mikrovilli etc. bewährt und ist ein unverzichtbares Hilfsmittel, die Komplexität von Zellen und Zellstrukturen zu visualisieren [114]. Es eignet sich sowohl hervorragend zur Darstellung von Bakterien und der sie umgebenden extrazellulären Matrix [66,78] als auch für die Darstellung der Pellikel [1,40]. Trotz dieser enormen Leistungsfähigkeit weist auch die Verwendung des TEM Einschränkungen auf. Es erlaubt lediglich die Betrachtung eines sehr kleinen Bereichs des Probekörpers. Außerdem erfordert die Fixierung der Proben zur Vorbereitung eine sehr komplexe, zeitintensive und sensitive, also fehleranfällige Technik. Hierbei kommt es oft zu Färbe- und Fixierungsartefakten, welche jedoch in der Vergangenheit bereits als solche erkannt und katalogisiert wurden [114]. Generell muss im Rahmen transmissionselektronenmikroskopischer Untersuchungsverfahren wie bereits erwähnt bedacht werden, dass die einzelnen Bilder angesichts der Tatsache, dass es sich um ein Mikroskopieverfahren handelt, welches es ermöglicht eine Sicht auf den Querschnitt der Probe zu erhalten (Ultradünnschnittmikroskopie), lediglich einen extrem kleinen Bereich des Prüfkörpers widerspiegeln. So ist eine repräsentative Darstellung der Ausdehnung bakterieller Besiedlung nur zu erlangen, indem eine extrem hohe Anzahl an mikroskopierten Bildern ausgewertet wird. Daher empfiehlt es sich, die Mikroskopie-Methoden miteinander zu kombinieren. So lässt sich anhand der REM-Bilder ein guter Überblick über das Ausmaß bakteriellen Befalls gewinnen, während die TEM-Bilder diesen Eindruck um die Dimension der vertikalen Ausdehnung und detaillierte Zytoskelettstrukturen vorhandener Bakterienagglomerationen ergänzen.

### Fazit

Die Kombination der Fluoreszenzmikroskopie, welche einen Einblick in die bakterielle Kolonisation und das Vitalitätsmuster der Bakterien gibt, und den beiden elektronenmikroskopischen Mikroskopiermethoden, welche es ermöglichen einen Eindruck der dreidimensionalen Struktur des oralen Biofilms zu gewinnen, eignet sich gut, um den Effekt von Mundspüllösungen auf die Qualität und Quantität des Biofilms zu ermitteln.

## 6.2 Diskussion der Ergebnisse

### 6.2.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung dient wie bereits im vorherigen Text erwähnt der Betrachtung zweierlei Parameter. Zum einen sollte die flächenhafte Bedeckung des Prüfkörpers durch mikrobiellen Biofilm (Oberflächenbedeckung) betrachtet werden, zum anderen soll der Zustand des vorhandenen Biofilms in Bezug auf den Lebendzellanteil (Vitalität) eingeschätzt werden. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Vitalität des Biofilms im Oberkiefer, ohne Zuhilfenahme antibakterieller Agenzien, nach 48 h in der Regel zwischen 64,4 % und 75,7% beträgt [3]. Der prozentuale Anteil vitaler Mikroorganismen des oralen Biofilms unterliegt starken inter-individuellen Schwankungen [3,120]. Eine Studie von Karygianni et al. 2012, mit ähnlichem Versuchsaufbau wie der vorliegenden, konnte zeigen, dass nach Nutzung einer spezifischen Fluoreszenz in-situ- Hybridisierung (FISH für Eubakterien, *Streptococcus* spp. und *Fusobacterium nucleatum*) und anschließender Konfokal-Laser Scanning Mikroskopie, nach 3 Tagen etwa 47,26 % und nach 5 Tagen fast die komplette Schmelz- Prüfkörperoberfläche (84,45%) mit Biofilm bedeckt war [66]. Die inter- und intraindividuellen Unterschiede der Biofilmdicke, der Biofilmverteilung und der Vitalität der Mikroorganismen, die mit allen Untersuchungsmethoden ermittelt werden konnten, können auf verschiedene individuelle Faktoren zurückgeführt werden, wie etwa Speichelflussrate, oral wirksame Scherkräfte, mastikatorische Funktion, Weichgewebsdruck, Zusammensetzung von Speichel- und Sulkusflüssigkeit und Ernährungsgewohnheiten [115].

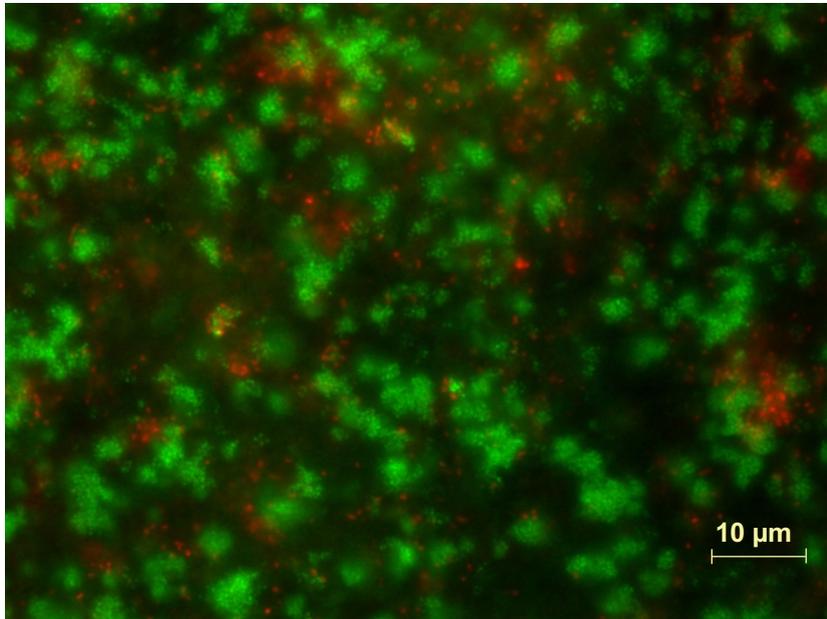
Die in dieser Studie vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die flächenhafte Bedeckung der Prüfkörperoberfläche der Kontrolle im Schmelz durchschnittlich 70% beträgt, während die Kontrolldentinprüfkörper durchschnittlich sogar zu 86% mit Biofilm bedeckt sind. Eine 2007 durchgeführte Studie von Jung et al. konnte zeigen, dass die bakterielle Adhärenz an Dentinoberflächen größer ist als die an Schmelzoberflächen [61]. Diese höheren Werte lassen sich unter anderem durch die größere Rauheit der Dentinflächen erklären, welche eine Biofilmbesiedlung begünstigt [39,48]. Durch die quer angeschnittenen Dentintubuli im Rahmen der Prüfkörpervorbereitung entsteht ein Mikroretentionsrelief, das die Adhärenz der Mikroorganismen begünstigt, welche bevorzugt im Bereich der Dentintubuliöffnungen beobachtet werden können [61,77]. Außerdem können Bakterien mit den organischen Strukturen der Kollagenmatrix des Dentins interagieren [61,76]. Da es sich hierbei jedoch um Dentin extrahierter Zähne handelt, das zuvor einem chemischen Reinigungsprozess unterzogen wurde, ist es fraglich, ob die Bindung der Bakterien an kollagene Strukturen eine große Rolle spielt. Es konnte gezeigt werden, dass Natriumhypochlorit, welches im Rahmen dieser Studie zur Reinigung der Probekörper verwendet wurde, auf organisches Gewebe wie etwa das Kollagen des (bovinen) Dentins auflösend wirkt [68,102]. Ein weiterer Unterschied in der mikrobiellen Besiedlung von in-situ exponierten Schmelz- und Dentinprüfkörpern ist der zeitliche Verlauf der bakteriellen Besiedlung. Während die Menge adhärenter Bakterien auf den Dentinproben sich mit der Dauer der oraler Exposition signifikant erhöht, bleibt sie auf den Schmelzproben weitestgehend konstant [61]. Es lassen sich mikroskopisch hauptsächlich Streptokokken erkennen. Diese Beobachtung deckt sich mit vorangegangenen in-vivo- und in-situ-Studien, die nach oraler Exposition einen Streptokokkenanteil der initialen bakteriellen Kolonisation zwischen 4 und 48 h, von 61 %- 78 % beobachten konnten [22,61]. Dies lässt sich auf der einen Seite mit der kurzen Verdopplungszeit von Streptokokken im Vergleich zu anderen Bakterienspezies erklären [1,7,66] und zum anderen mit der Tatsache, dass viele Komponenten der Pellikel, wie etwa Amylase und prolinreiche Proteine, als spezifische Bindungsproteine für Streptokokken agieren [1,34,61,66]. Betrachtet man die Oberflächenbedeckung der Prüfkörper nach Anwendung der experimentellen Hopfenmundspülung, lässt sich eine deutliche Reduktion des Bakterienrasens erkennen. Im Bereich der Schmelzprüfkörper beträgt der prozentuelle Wert der Prüfkörperbedeckung im Durchschnitt nur noch 26 %. Mit 28 % lässt sich auch auf den Dentinprüfkörpern eine deutliche Minderung bakterieller Besiedlung feststellen, sodass sich die Vermutung anstellen lässt, dass Hopfen nicht nur auf den vorhandenen Biofilm verändernd wirkt, sondern auch die Entstehung des initialen Biofilms hemmt.

Diese antiadhärenten und Antibiofilm-Eigenschaften des Hopfens wurden bereits 2013 von Rozalski et al. im Rahmen einer in-vitro-Studie beschrieben [91]. Weitere Reviews beschreiben ebenfalls die Inhibition der bakteriellen Adhärenz durch pflanzliche sekundäre Metabolite, wie etwa Polyphenole oder ätherischen Öle [28,32,100].

Deutliche Unterschiede im Hinblick auf die Beeinflussung der Biofilmbildung konnten im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nach der Spülung mit der experimentellen Hopfenspülung im Vergleich zur Ölsäure festgestellt werden. Während sich hier die Veränderung lediglich auf der Ebene der Zellvitalität vorhandener Bakterien abspielt, zeigt das Prüfkörperbedeckung keine deutlichen Unterschiede. So beträgt der Wert der Prüfkörperbedeckung auf den Schmelzoberflächen nach Ölsäurespülung im Durchschnitt 82 % und auf den Dentinoberflächen 75 %. Das Gleiche gilt für die Prüfkörperbedeckung unter Lysozymspülung. Mit 85 % (Schmelz) und 83 % (Dentin) ähneln die Durchschnittswerte denen der Kontrollkörper. Die Vitalität der nach Ölsäurespülung auf den Probekörpern vorhandenen Bakterien beträgt auf Schmelz lediglich 43 %, auf Dentin nur 42%, was bedeutet, dass Ölsäure zwar nicht dazu führt, dass eine Verminderung des bakteriellen Rasens zu erkennen ist, aber dass sie in der Lage ist bestehende Bakterien anzugreifen und zu zerstören. Bei Lysozym findet sich im Gegensatz hierzu keine Verschiebung hin zu toten Bakterien. Die Lysozymproben ähneln also hinsichtlich beider Parameter denen der Kontrolle.

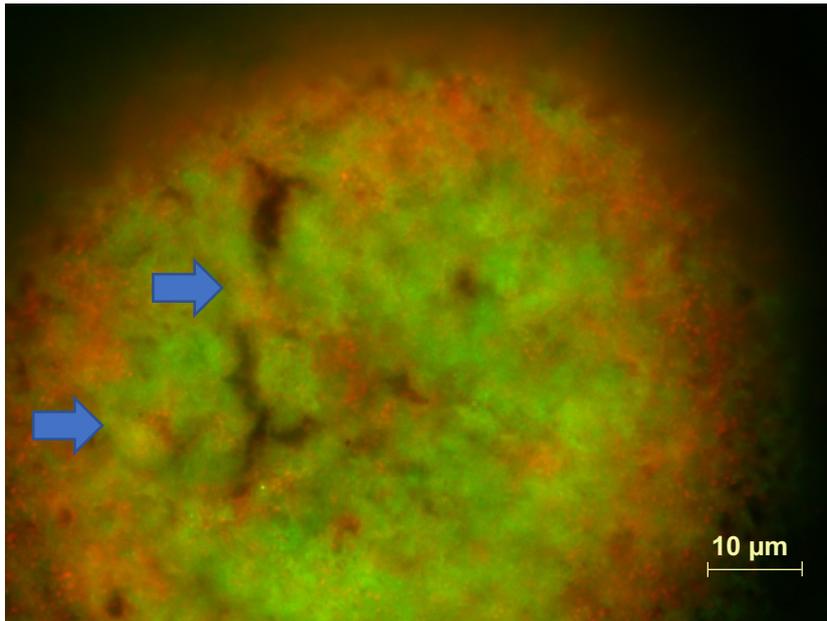
Grundsätzlich lassen sich auch Unterschiede bezüglich der Positionierung der Prüfkörper auf den Schienen feststellen. Karygianni et al. haben gezeigt, dass Prüfkörper, welche auf der Vestibulärseite der Schienen im Oberkiefer angebracht wurden, unterschiedlich stark von Biofilmbesiedlung befallen sind. So zeigten (nach Befestigung von sechs Prüfkörpern im Bereich zwischen Prämolaren und Molaren) die in der Mitte befindlichen Prüfkörper mit 25,55 %- Prüfkörperbedeckung merklich weniger Biofilmbesiedlung als jene mesial (53,04 %) und distal davon (63,15 %) [66]. Dieses Phänomen kann neben der inter-individuellen Varianz der Biofilmbildung als mögliche Ursache für die unterschiedlichen Werte herangezogen werden. Betrachtet man die Auswertung der Prüfkörper bezogen auf die Vitalität der Bakterien fällt auf, dass es zu Diskrepanzen zwischen der subjektiven, visuellen Einschätzung der Bakterienvitalität und der Auszählung durch das Programm ImageJ kommen kann. Dies soll am Beispiel eines Probekörpers nach Hopfenspülung gezeigt werden.

Betrachtet man zunächst ein fluoreszenzmikroskopisches Bild der Kontroll-Reihe (Abb.60) von Proband 3 (Schmelz), erkennt man eine deutliche Färbung der Bakterien in grüner oder roter Farbe.



**Abb. 60: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Biofilms auf Schmelz nach 48 h und regelmäßiger (alle 6 h) Wasserspülung (Kontrolle) bei 1000-facher Vergrößerung (Live/ Dead Färbung); tote Bakterien stellen sich rot, lebende grün dar; es lassen sich stäbchenförmige und kokkoide Bakterien erkennen, die den Prüfkörperabschnitt vollständig bedecken, es zeigt sich eine ausgeprägte Dominanz grün eingefärbter Zellen**

Die Bakterien scheinen scharf voneinander abgegrenzt und kontrastreich eingefärbt. Auf molekularer Ebene bedeutet dies, dass sich die lebenden Bakterien (grün) ausschließlich mit dem Nukleinsäurefarbstoff Syto9 angefärbt haben. Dieser penetriert sowohl lebende als auch abgestorbene Bakterien. Der rote Farbstoff Propidiumiodid ist jedoch nur in der Lage zerstörte Zellmembranen zu durchdringen. Befinden sich schließlich beide Farbstoffe im Zellkern einer abgestorbenen Zelle, reduziert das Propidiumiodid die Grünfärbung des Syto-9, überlagert diese schließlich und die Zelle erscheint unter Fluoreszenz rot. Betrachtet man im Gegensatz hierzu ein Bild nach Anwendung des experimentellen Hopfenextraktes (Abb.61, ebenfalls ein Schmelzprüfkörper von Proband 3), lässt sich in einigen Bereichen eine eher gelbliche Verfärbung der Bakterien beobachten.



**Abb. 61:** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Biofilms auf Schmelz nach 48 h und regelmäßiger-Hopfenspülung (alle 6 h) bei 1000-facher Vergrößerung (Live/ Dead Färbung); tote Bakterien stellen sich rot, lebende grün dar; es lassen sich stäbchenförmige und kokkoide Bakterien erkennen, die blauen Pfeile markieren die Stellen „gelb fluoreszierender“ Bakterien

Diese Gelbfärbung lässt sich also anhand der Wirkweise der Nukleinsäurefarbstoffe erklären. Es liegt die Vermutung nahe, dass, nachdem sich im Inneren zerstörter Bakterien beide Farbstoffe angereichert haben, das Propidiumiodid nicht in der Lage war die Fluoreszenz des Syto9 gänzlich zu überdecken. Wertet man die Prüfkörper nun jedoch mit einem semiquantitativen Programm aus, wie in diesem Fall ImageJ, ist es notwendig beide Farben eindeutig voneinander zu trennen. Eben diese Farbdiskriminierung ist mit Hilfe des Programms nicht eindeutig möglich. Die „Mischfarbe“ gelb wird dem grünen Kanal zugeordnet, obwohl die simultane Einfärbung der Bakterien für eine Zerstörung der Zellmembran und somit für eine Beschädigung der Zelle spricht. Aus diesem Umstand resultiert ein verfälschter Vitalitätswert, der eine nicht der Realität entsprechende Verschiebung hin zu lebenden Organismen suggeriert.

Für das oben gezeigte Bild des Schmelzes nach Hopfenspülung wurde durch das Programm ein Vitalitätswert von 42 % ermittelt. Eine optische Einschätzung würde in Einbeziehung der oben genannten Gesichtspunkte einen geringeren Wert ergeben. Diese Problematik „gelb eingefärbter Bakterien“ im Rahmen der LIVE/DEAD™ BacLight™ - Methode wurde in der Vergangenheit bereits in Studien thematisiert [101,120].

Eine weitere Problematik beschreiben Berney et al. 2007 in der Arbeit „Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry“ [11]. Während es zulässig erscheint, dass Zellen deren Membran verletzt wurden, als tote Bakterien gewertet werden, ist der Umkehrschluss (dass intakte Zellen aktive Zellen sind) nicht zwingend korrekt. Die mikroskopischen Bewertungen erfolgen häufig vereinfacht in eine Aufteilung in Rot (tot) oder Grün (lebend). Die Erfahrungen einiger Arbeitsgruppen aber zeigen, dass bei Versetzung von Bakterienzellen mit dieser Farbstoffkombination und anschließender Untersuchung durchaus Zwischenstadien beobachtet werden können [11,120]. Das Vermögen der Fluoreszenzfarbstoffe Bakterien einzufärben korreliert mit dem physiologischen Zustand der betreffenden Zellen: Mikroorganismen mit aktivem Metabolismus und hoher Wachstumsrate fluoreszieren deutlicher als jene mit verminderter zellulärer Aktivität [11,103]. Dies kann zu Problemen und Schwierigkeiten führen, insbesondere bei der Interpretation von Ergebnissen, die eine Aussage über die Effektivität desinfizierender, antibakterieller Methoden geben sollen. Bisher konnte das Wissen über diese Zwischenzustände jedoch noch nicht vollständig erschlossen werden. Bei der Betrachtung der Vitalität des vorhandenen Biofilms sollte ebenfalls die Tatsache beachtet werden, dass gezeigt werden konnte, dass sich der Effekt antimikrobieller Stoffe in etablierten Biofilmen auf die oberflächlichen Schichten begrenzt [5,120].

Ein weiterer zu diskutierender Punkt wäre die fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesene antibakterielle Wirkung der Ölsäure. Die folgende Tabelle (Tab. 21) ist aus dem Analysenzertifikat des Herstellers der von uns verwendeten Ölsäure entnommen.

**Tabelle 21: Auszug aus dem Analysenzertifikat der Ölsäurespüllösung**

Parameter	Spezifikation	Resultat
Säurezahl	198 --> 240	200
Iodzahl	92 --> 100	94
Linolsäure (C18:2)	Max. 18 %	11 %
Ölsäure (C18:1)	Min. 72 %	81 %
Palmitinsäure	Max. 8 %	3 %
Palmitoleinsäure	Max. 1 %	Max. 1 %
Stearinsäure	Max. 4 %	2 %

Darin ist ersichtlich, dass es sich bei dem verwendeten Produkt nicht um reine Ölsäure handelt. Zwar stellt sie mit 81 % den Hauptbestandteil des Gemischs dar, dennoch befinden sich ebenfalls 11 % Linolsäure (C18:2) in der Mischung. So lässt sich einem Review von Desbois et al. entnehmen, dass Linolsäure eigene antibakterielle Fähigkeiten besitzt [21]. Auch andere Studien belegen eine eigenständige, antibakterielle Wirkung der Linolsäure [8,15,102]. Also muss in der Interpretation der Ergebnisse die eigenständige Wirkung der Linolsäure auf die Vitalität der Bakterien miteinbezogen werden. Gleiches gilt für Stearinsäure (C18:0) und Palmitinsäure (C16:0), welche jedoch vermutlich aufgrund des geringen Anteils (2 % und 3 %) in der Gesamtbetrachtung vernachlässigt werden können.

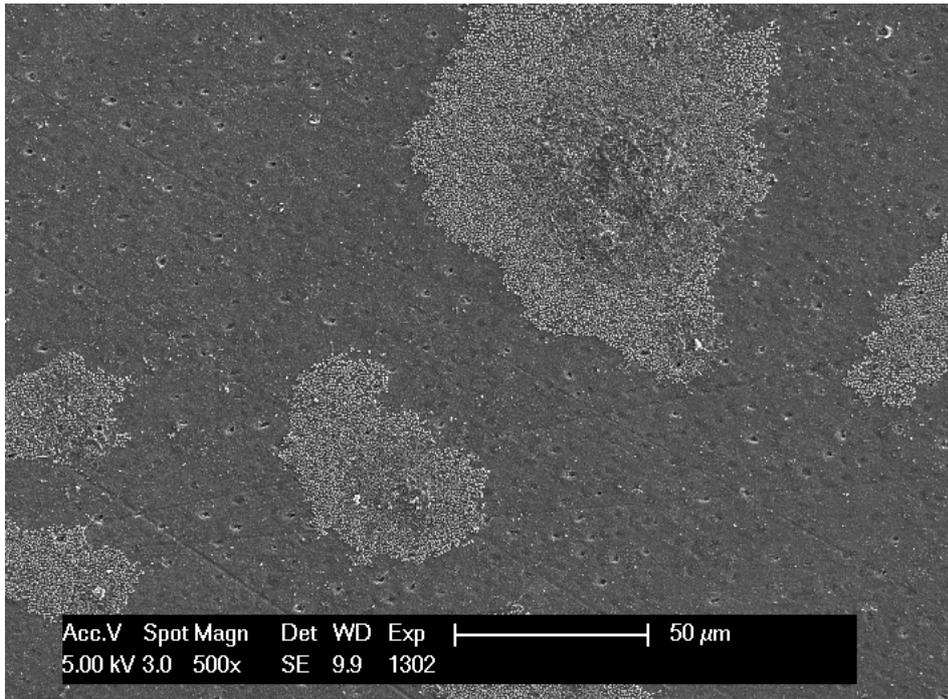
### 6.2.2 Rasterelektronenmikroskopie

Auch bei der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung finden sich die deutlichsten Effekte nach Spülung mit dem experimentellen Hopfenextrakt.

Zunächst betrachtet man die Scores der Kontrollprüfkörper nach Spülung mit Wasser. Hier haben alle Probanden sowohl im Schmelz als auch im Dentin i.d.R. einen Score 6. Dies bedeutet, dass sich auf den Prüfkörpern ein etablierter, vielschichtiger Biofilm mit einer Vielzahl verschiedener bakterieller Morphotypen befindet, der mehr als 50% der Fläche des Probekörpers bedeckt.

Sowohl für Lysozym als auch für Ölsäure gilt mit jeweils einer Ausnahme bei Proband 2 das Gleiche. Proband 2 hat nach Spülung mit Ölsäure im Schmelz und nach Spülung mit Lysozym im Dentin jeweils einen Score 4. Dieser besagt, dass sich multiple bakterielle Aggregationen auf dem Prüfkörper oder ein Monolayer-Biofilm auf dem Prüfkörper befinden.

Diese individuellen Unterschiede können vielerlei Gründe haben. Zum einen können die Probekörper intraoral topographisch so positioniert gewesen sein, dass eine mechanische Irritation durch die Wangenmuskulatur die Biofilmentstehung gehemmt hat. Ein weiterer denkbarer Grund wäre, dass die fehlerhafte Verarbeitung der Prüfkörper nach Entnahme selbiger aus der Mundhöhle den vorhandenen Biofilm verletzt hat. Dagegen spricht jedoch die homogene und physiologisch anmutende Verteilung und Aggregation des bakteriellen Monolayers auf der Oberfläche des Prüfkörpers, die keine „iatrogene“ Ursache vermuten lässt (Abb.62).



**Abb. 62:** Rasterelektronenmikroskopbild bei 500-facher Vergrößerung, es lassen sich scharf abgegrenzte Areale mit Biofilm erkennen, aerifizierende Dentintubuli sind ebenfalls erkennbar

Wie bereits erwähnt, spiegelt sich auch insbesondere bei den Ergebnissen des Rasterelektronenmikroskops die antibakterielle Effektivität des Hopfens wider. Auf zwei der drei Schmelz-Probekörper findet man eine Situation, die anlehnd an das Auswertungssystem einen Score 1 widerspiegelt. Dies bedeutet, dass sich auf diesen Proben lediglich eine deutliche Pellikel mit nur einzeln verteilten oder gar keinen Bakterien findet. Diese Ergebnisse könnten ein Indiz dafür sein, dass Hopfen in der Lage ist die Pellikel dahingehend zu verändern, dass eine regelmäßige Ausbildung des Biofilms ausbleibt. Untersuchungen, inwiefern es möglich ist, die Pellikel zu modulieren und somit der bakteriellen Besiedlung entgegenzusteuern sind Gegenstand der Forschung im Biofilmmangement. Im Bereich des Dentins finden wir ebenfalls Veränderungen. Einmal ist die bakterielle Besiedlung des Prüfkörpers minimiert (Score 5, < als 50 % der Prüfkörperoberfläche sind befallen) und bei Proband 1 findet sich hier ebenfalls ein Score 1.

### 6.2.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Die transmissionselektronenmikroskopischen Bilder lassen eine detaillierte Darstellung sowohl der Pellikel als auch des Zytoskeletts der Mikroorganismen und der sie umgebenden Matrix zu. So lassen sich nach Verwendung der Spüllösungen Veränderungen auf zellulärer Ebene beobachten.

Auch im Rahmen der Transmissionselektronenmikroskopie konnten nach Hopfenapplikation die deutlichsten Veränderungen registriert werden. Die Schmelzprüfkörper aller drei Probanden zeigen die gleichen Veränderungen. Auf jedem der Prüfkörper konnte lediglich eine amorphe, verdickte Pellikelschicht nachgewiesen werden, die mit keinen oder nur sehr stark vereinzelt Mikroorganismen besetzt war. Dies deckt sich mit den, mit Hilfe der anderen Mikroskopiemethoden gewonnenen Ergebnissen. Im Bereich des Dentins konnte eine starke Dezimierung des vorhandenen, etablierten Biofilms erfasst werden, während diese Bereiche Bakterien zeigten, die stark alteriert und desintegriert erschienen. Auch hier befinden sich Zellen deren Zellwandkontinuität durchbrochen ist, deren Zellinhalt das Zytoskelett verlassen hat und auch hier lassen sich vereinzelt Rückstände der Agenzien im Präparat detektieren. Die teilweise geschrumpften Zellinhalte erscheinen inhomogen und die extrazelluläre Matrix zerklüftet und aufgelockert. Die Tatsache, dass die Schmelzprüfkörper lediglich eine verdickte Pellikel und keinen ausgebildeten Biofilm aufweisen, lässt eine Korrelation des Hopfenpräparats mit Bestandteilen der Pellikel vermuten.

Die Pellikel, als sich kontinuierlich durch chemische und enzymatische Modifikation der absorbierten Speichelproteinaggregate, sogenannte Mizellenartige globuläre Strukturen und heterotype Komplexe, remodelierende Schicht, stellt die Basis der Ausbildung eines Biofilms dar. Als Andockstelle für die adhärenen Mikroorganismen bildet sie die Grundlage der Biofilmgenerierung, da sie als Mediator aller molekularen und mikrobiellen Interaktionen zwischen Zahnoberfläche und oraler Kavität agiert. Einige vorangegangene in-situ-Studien konnten zeigen, dass Naturprodukte, welche Polyphenole enthalten, als antibakterielle Agenzien in Mundspüllösungen in der Lage sind die Ultrastruktur der Pellikel zu verändern [51,52,69,90,112]. Es konnte gezeigt werden, dass sekundäre Pflanzenstoffe in der Lage sind die protektiven Eigenschaften der Pellikel zu verstärken [46,51,112].

Nach regelmäßiger Spülung mit verschiedenen phenolhaltigen Substanzen zeigten die elektronenmikroskopischen Bilder eine verdickte und elektronendichtere Pellikel. Dieses Phänomen konnten Weber et al. 2015, Hertel et al. 2017 und Kirsch et al. 2020 ebenfalls beobachten [52,69,112]. Es konnte auch gezeigt werden, dass die beschriebene Verdickung der Pellikel anhaltend war [52,69]. Dass mit dieser Verdickung eine erhöhte Widerstandsfähigkeit der Pellikel gegenüber erosiver Säureangriffe [67,112] und sogar eine gehemmte Initialkolonisation der Bakterien einhergehen kann, wird in einigen Studien beschrieben [51,52,67,69]. Dies kann bedeuten, dass Polyphenole einen langanhaltenden modulierenden Effekt auf die Ultrastruktur der Pellikel und auf die Entstehung des Biofilms haben. Kenschke et al. konnten 2017 in einer in-situ-Studie zeigen, dass es möglich war eine Inkorporation biologischer Substanzen, die in Form von Mundspüllösungen verwendet wurden, in die Pellikel zu bewirken und durch diese Modifikation eine Anhaftung kariogener Mikroorganismen zu behindern oder zu vermeiden [67]. Sowohl einige in-vitro- als auch in-situ- Studien zeigen, dass sekundäre Pflanzenstoffe in die Struktur der Pellikel adsorbiert werden können und zu einer Denaturierung von Pellikelproteinen führen, was einen Einfluss auf die Interaktion mit den Rezeptoren der Bakterien zur Folge hat [57,58,69,90]. Hannig et al. konnten zeigen, dass die intraorale Applikation von Polyphenolen in Form von Mundspüllösungen zu einer Inhibition von Proteinen in der Pellikel führen kann [37]. Es wird vermutet, dass der erste Schritt der Polyphenol-Protein-Interaktion an dem dynamischen Teil der Pellikel beginnt, welche Proteine mit der höchsten Phenolbindungsaffinität aufweist. Dies sind Proteine wie etwa prolinreiche Proteine, die eine hohe Anzahl an Prolinresten in ihrer Proteinsequenz aufweisen [6,58]. Weitere, gegenüber Polyphenolen bindungsaffine Proteine sind Amylasen und Histatine, welche eine protektive Aufgabe in der Pellikel wahrnehmen [69]. Prolinreiche Proteine sind außerdem mit speziellen Rezeptoren ausgestattet, die die bakterielle Adhärenz gewährleisten [1]. Der zweite Schritt könnte auf Interaktionen der Phenole mit der bereits adsorbierten Glykoproteinschicht beruhen. Diese rezeptorgesteuerte Interaktion führen wiederum letztlich zu einem antiadherenten und antibakteriellen Effekt. Die genaue Wirkweise der Polyphenole auf die Pellikel ist bisher nur wenig erforscht. Es gibt jedoch eine Reihe von Studien, die beschreiben, dass polyphenolhaltige Substanzen auf verschiedenen Wegen mit den Speichelproteinen interagieren. So wurde beobachtet, dass einige Polyphenole in der Lage sind Speichelproteine zu binden und somit unlösliche Protein-Polyphenol-Niederschläge zu bilden [6,69].

Daraus folgend lässt sich die Vermutung anstellen, dass dieser Mechanismus auf die Polyphenol-Protein-Interaktion in der Pellikel übertragen werden kann und es sich bei den verdickten Bereichen der Pellikel um eben solche unlöslichen Polyphenol-Protein-Aggregate handelt, die inkorporiert wurden. Studiert man die Literatur, findet man ein von Charlton et al. aufgestelltes Modell zum Ablauf der Interaktion zwischen Polyphenol und Speichelproteinen [16]. In einem ersten Schritt formt sich ein löslicher Komplex, nachdem der hydrophobe Teil des aromatischen Polyphenolrings mit dem Pyrrolidinring des Prolinrestes des Proteins reagiert [6,16,58]. In der zweiten Phase führt das vermehrte Vorhandensein von Polyphenolen zu einer Quervernetzung zweier dieser schwach miteinander verbundenen Peptide, was zur Ausbildung eines größeren, unlöslichen Komplexes führt. Das dritte Stadium wird durch komplexe Aggregate beschrieben, welche sich spontan im Speichel niederschlagen. Somit werden lösliche und unlösliche Aggregate zwischen Polyphenolen und Proteinen detektiert. Da die Bildung der Pellikel wie bereits im Vorfeld beschrieben eine Adsorption von Speichelproteinen und Proteinaggregaten voraussetzt, lässt sich eine Veränderung dieser mit der Veränderung der Pellikelstruktur in Zusammenhang bringen. Die daraus resultierende veränderte Pellikel könnte somit zerstörte oder maskierte funktionale Gruppen von Rezeptorproteinen beinhalten, was zu einer gestörten Interaktion zwischen initialen Kolonisierern und der Pellikel führt und somit die Biofilmbildung hemmt [51,69]. Diese Prozesse könnten also ursächlich für das in dieser Studie beobachtete Fehlen eines ausgebildeten, etablierten Biofilms auf den Schmelzprüfkörpern nach Hopfenspülung sein. Im Gegensatz zu den Schmelzprüfkörpern lassen sich auf Teilen der Dentinprüfkörper Mikroorganismen erkennen. Diese sind jedoch in stark verringerter Zahl vorhanden und weisen atypische, pathologische Veränderungen auf. Die Zellwände beinhalten Diskontinuitäten, die Zellinhalte sind dadurch teilweise nach außen gestülpt, was den Verlust der Zellintegrität und somit einen Verlust der Funktionalität für die Zelle bedeutet. Die in früheren Abschnitten dieser Arbeit beschriebenen Mechanismen antibakterieller Wirkung der Hauptbestandteile des Hopfens, insbesondere der Flavonoide, könnten ursächlich für diese degenerativen Veränderungen der Bakterienzellen sein. Somit kann angenommen werden, dass das experimentelle Hopfenextrakt der Biofilmbildung auf zweierlei Ebene entgegenwirkt. Einerseits scheint es die Pellikelstruktur dahingehend zu modifizieren, dass die Initalkolonisation der Mikroorganismen gehemmt wird, andererseits wirkt es destruktiv auf die Zellstruktur vorhandener Bakterien.

Nach Ölsäurespülung befinden sich innerhalb der Zellen und auch innerhalb der extrazellulären Matrix helle, kugelförmige Einlagerungen, die wohl auf Ölsäureeinlagerungen zurückzuführen sind. In der Vergangenheit gab es viele Ansätze, Oberflächen vor bakteriellem Bewuchs zu schützen, indem man ihre hydrophoben Oberflächeneigenschaften verstärkt, da auf diesen weniger Bakterienadhäsion festgestellt werden konnte. Mehrere Studien legen die Wirksamkeit von Lipiden und Pflanzenölen als antimikrobielle Substanzen nahe [4,62]. Es wurde postuliert, dass Öle oder ölige Gemische der Oberfläche eine Hydrophobie von langer Substantivität verleihen können, welche schließlich zu einer erschwerten Adhäsion bakterieller Erstkolonisierer führt. Die Beobachtung der Ansammlung von vesikelartigen Ablagerungen auf den Präparaten nach in-situ-Testung öliger Agenzien wurde bereits von Hannig et. al 2012 gemacht. Hier wurden nach intraoraler Spülung mit Distelöl ebenfalls Rückstände auf der gebildeten Pellikel der bovinen Prüfkörper gefunden, jedoch nicht innerhalb selbiger [42]. In der genannten Studie wurde der Einfluss der Spülung mit Öl auf eine potentielle Verstärkung protektiver Eigenschaften der Pellikel untersucht, wie diese bei der Applikation von Polyphenolen bekannt ist. Dort konnte zwar eine Modifikation der Ultrastruktur der Pellikel, jedoch keine Verbesserung der protektiven Eigenschaften festgestellt werden, diese waren sogar reduziert [42]. Eine weitere in-situ-Studie von Hannig et al. 2011 befasste sich mit der Frage, ob die intraorale Spülung mit Speiseölen die bakterielle Kolonisation auf (ebenfalls bovinen) Schmelzprüfkörpern reduziert [43]. Auch hier konnte zunächst gezeigt werden, dass die Pellikel strukturell einer Veränderung unterliegt und ihr kleine Ölmizellen aufliegen. Jedoch wurden hier keine signifikanten Auswirkungen auf das Anfangsmuster oder Ausmaß bakterieller Erstbesiedlung gefunden. Dieses Erkenntnis deckt sich mit den Ergebnissen dieser Untersuchung, betrachtet man das Ausmaß und die dreidimensionale Ausdehnung des Biofilms nach Ölsäurespülung. Bei detaillierter Betrachtung der bakteriellen Zellkörper lassen sich jedoch bemerkenswerte Beobachtungen tätigen. Die Zellwände sind in ihrer Kontinuität gestört und die Zellinhalte erscheinen inhomogen und geschrumpft, teilweise aus dem Zellkonstrukt herausgestülpt. Dies lässt sich durch die von Desbois et al. 2010 beschriebene Wirkweise der Fettsäuren erklären, welche innerhalb der bakteriellen Zellwand als Ionophore agieren und dadurch das Konzentrationsgefälle zwischen Zellinnerem und Zelläußeren in einem Maße stören, das schlußendlich zur Lyse der Zellmembran führen kann [21]. All diese Beobachtungen weisen auf vorangegangene, degenerative Prozesse hin.

Diese destruktiven Prozesse finden sich sowohl im Bereich der Schmelz- als auch im Bereich der Dentinprüfkörper. Die Ausbildung des Biofilmes in seiner dreidimensionalen Ausprägung scheint jedoch nicht vermindert.

Die transmissionselektronenmikroskopischen Ergebnisse der Prüfkörper nach Lysozymspülung weichen geringfügig von den Erkenntnissen, die die Auswertung der anderen Mikroskopierarten ergeben haben, ab. Während die Proben im Rahmen fluoreszenzmikroskopischer und rasterelektronenmikroskopischer Betrachtung denen der Kontrolle ähnelten, lassen sich auf Zellebene im Rahmen der Transmissionselektronenmikroskopie Veränderungen erkennen. Die Zellen erscheinen durch den Kontakt mit der Spüllösung angegriffen und pathologischen Prozessen unterlegen. Hinweise auf degenerative Prozesse sind auch hier Diskontinuitäten in den Zellwänden und strukturell aufgelockerte, desintegrierte Zellinhalte. Auch hier decken sich die Beobachtungen mit den in der Literatur beschriebenen Wirkweisen des Lysozyms, welches zu einer Auflösung der Bindung der Zellwandbestandteile untereinander führt [25,56,59]. All dies lässt eine funktionelle Beeinträchtigung und Alteration des Biofilms vermuten.

#### 6.2.4 Schlussfolgerungen

Die Natur bietet ein vielseitiges Repertoire an Wirkstoffen, die bei der Erschließung neuer antibakterieller Phytopharmaka zur Verfügung stehen. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Hopfen eine vielversprechende, natürlich antimikrobielle Substanz darstellt, die, angewendet als Mundspüllösung, sowohl die Entstehung des Biofilms hemmt als auch die Lebensfähigkeit der darin befindlichen Bakterien herabsetzt. Diese Untersuchung kann Grundlage für die Weiterentwicklung natürlicher, ökologisch nachhaltiger Mundpflegeprodukte sein, deren antimikrobielle Wirkung nicht auf chemisch basierten Substanzen beruht. Ölsäure zeigt eine antibakterielle Komponente, konnte aber die Entstehung des Biofilms nicht signifikant herabsetzen, gleiches gilt für das in der vorliegenden Konzentration angewendete Lysozym.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Al-Ahmad A, Follo M, Selzer A-C, 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
2. Anwar H, Strap JL, Costerton JW (1992) Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1347–1351
3. Arweiler NB, Hellwig E, Sculean A, Hein N, Auschill TM (2004) Individual Vitality Pattern of in situ Dental Biofilms at Different Locations in the Oral Cavity. *Caries Res* 38:442–447
4. Asokan S, Rathan J, Muthu MS, Rathna PV, Emmadi P, Raghuraman, Chamundeswari (2008) Effect of oil pulling on *Streptococcus mutans* count in plaque and saliva using Dentocult SM Strip mutans test: A randomized, controlled, triple-blind study. *J Indian Soc of Pedod Prevent Dent* 26:12
5. Baehni PC, Takeuchi Y (2003) Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Dis* 9:23–29
6. Baxter NJ, Lilley TH, Haslam E, Williamson MP (1997) Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein Repeat Result in Complexation and Precipitation. *Biochemistry* 36:5566–5577
7. Beckers HJA, Van der Hoeven JS (1982) Growth Rates of *Actinomyces viscosus* and *Streptococcus mutans* During Early Colonization of Tooth Surfaces in Gnotobiotic Rats. *Infect Immun* 35:583-587
8. Behr J, Vogel RF (2009) Mechanisms of Hop Inhibition: Hop Ionophores. *J Agric Food Chem* 57:6074–6081
9. Benkendorff K, Davis AR, Rogers CN, Bremner JB (2005) Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic molluscs, and their associated antimicrobial properties. *J Exp Mar Biol Ecol* 316:29–44

10. Bergmans L, Moisiadis P, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P (2005) Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM. *Int Endod J* 38:775–788
11. Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann H-U, Egli T (2007) Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry. *Appl Environ Microbiol* 73:3283–3290
12. Borutta A, Wagner M, Kneist S (2010) Bedingungsgefüge der frühkindlichen Karies. *Oralprophylaxe Kinderzahnheilkd* 32:58-63  
Borutta A, Wagner M, Kneist S (2010) Bedingungsgefüge der frühkindlichen Karies. 6
13. Bowen WH, Koo H (2011) Biology of *Streptococcus mutans*-Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. *Caries Res* 45:69–86
14. Brunsch SH (2007) Schmerzmittel im Mittelalter. *Der Schmerz* 21:331–338
15. Callewaert L, Michiels CW (2010) Lysozymes in the animal kingdom. *J Biosci* 35:127–160
16. Charlton AJ, Baxter NJ, Khan ML, Moir AJG, Haslam E, Davies AP, Williamson MP (2002) Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation. *J Agric Food Chem* 50:1593–1601
17. Choi J-S, Park N-H, Hwang S-Y, Sohn JH, Kwak I, Cho KK, Choi IS (2013) The antibacterial activity of various saturated and unsaturated fatty acids against several oral pathogens. *J Environ Biol* 34:673-676
18. Cholmakow-Bodechtel C, Jordan AR, Micheelis W (2016) Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V). Deutscher Ärzte Verlag DÄV, Köln
19. Curtis MA, Zenobia C, Darveau RP (2011) The Relationship of the Oral Microbiota to Periodontal Health and Disease. *Cell Host Microbe* 10:302–306
20. Czaczyk K, Myszka K (2007) Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Pol J Environ Stud* 16:799
21. Desbois AP, Smith VJ (2010) Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1629–1642
22. Dige I, Nilsson H, Kilian M, Nyvad B (2007) In situ identification of streptococci and other bacteria in initial dental biofilm by confocal laser scanning microscopy and fluorescence in situ hybridization. *Eur J Oral Sci* 115:459–467

23. Dold H, Lächele W, Du Hsing D (1936) Über die Eigenschaften, Wirkungsbreite und Wirkungsart der antibakteriellen Hemmungsstoffe (Inhibine) des menschlichen Speichels. *Zeitschr f Hygiene* 118:369–395
24. Drake DR, Brogden KA, Dawson DV, Wertz PW (2008) *Thematic Review Series: Skin Lipids* . Antimicrobial lipids at the skin surface. *J Lipid Res* 49:4–11
25. Ellison RT, III, Giehl TJ (1999) Killing of Gram-negative Bacteria by Lactoferrin and Lysozyme. *J Clin Invest* 88:1080-1091
26. Featherstone JD (1999) Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent and Oral Epidemiol* 27:31–40
27. Feng J, Cheng L, Zhou X, Xu HHK, Weir MD, Meyer M, Maurer H, Li Q, Hannig M, Rupf S (2015) In situ antibiofilm effect of glass-ionomer cement containing dimethylamino-dodecyl methacrylate. *Dent Mater* 31:992–1002
28. Ferrazzano G, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A, Pinto G, Pollio A (2011) Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties: A Review. *Molecules* 16:1486–1507
29. Fleming A (1922) On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. *Proc R Soc London B Biol Sci* 93:306–317
30. Flemming H-C, Neu TR, Wozniak DJ (2007) The EPS Matrix: The „House of Biofilm Cells“. *J Bacteriol* 189:7945–7947
31. Foster JS, Kolenbrander PE (2004) Development of a Multispecies Oral Bacterial Community in a Saliva-Conditioned Flow Cell. *Appl Environ Microbiol* 70:4340–4348
32. Freires I, Denny C, Benso B, de Alencar S, Rosalen P (2015) Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Isolated Constituents against Cariogenic Bacteria: A Systematic Review. *Molecules* 20:7329–7358
33. Grossgebauer K, Langmaack H (1968) Lysozyme Ergebnisse und Probleme. *Klin Wochenschr* 46:1121–1127
34. Gwynn JP, Douglas CWI (1994) Comparison of amylase-binding proteins in oral streptococci. *FEMS Microbiol Lett* 124:373–379
35. Hannig C, Hannig M, Attin T (2005) Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci* 113:2–13
36. Hannig C, Hoch J, Becker K, Hannig M, Attin T (2005) Lysozyme activity in the initially formed in situ pellicle. *Arch oral biol* 50:821–828

37. Hannig C, Spitzmüller B, Al-Ahmad A, Hannig M (2008) Effects of Cistus-tea on bacterial colonization and enzyme activities of the in situ pellicle. *J dent* 36:540–545
38. Hannig C, Spitzmüller B, Hannig M (2009) Characterisation of lysozyme activity in the in situ pellicle using a fluorimetric assay. *Clin Oral Investig* 13:15–21
39. 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
40. Hannig C, Follo M, Hellwig E, Al-Ahmad A (2010) Visualization of adherent microorganisms using different techniques. *J med microbiol* 59:1–77
41. Hannig C, Spitzmüller B, Hoth-Hannig W, Hannig M (2011) Targeted Immobilisation of Lysozyme in the Enamel Pellicle From Different solutions. *Clin Oral Investig* 15:65–73
42. Hannig C, Wagenschwanz C, Pötschke S, Kümmerer K, Kensche A, Hoth-Hannig W, Hannig M (2012) Effect of Safflower Oil on the Protective Properties of the in situ Formed Salivary Pellicle. *Caries Res* 46:496–506
43. Hannig C, Kirsch J, Al-Ahmad A, Kensche A, Hannig M, Kümmerer K (2013) Do edible oils reduce bacterial colonization of enamel in situ? *Clin Oral Invest* 17:649–158
44. Hannig C, Hannig M (2009) Enzyme in der Pellikel – eine Synopsis. *Dtsch Zahnärztl. Z* 64, 533-547
45. Hannig M (1999) Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials in vivo. *Eur J Oral Sci* 107:55–64
46. Hannig M, Joiner A (2006) The Structure, Function and Properties of the Acquired Pellicle. *Monogr Oral Sci* 19:29-64
47. Hannig M, Dounis E, Henning T, Apitz N, Stößer L (2006) Does irradiation affect the protein composition of saliva? *Clin Oral Invest* 10:61–65
48. Hannig M, Hannig C (2007) Der initiale orale Biofilm – pathogen oder protektiv? *Oralprophylaxe* 29:73-82
49. Harbarth S (2007) Einfluss des Antibiotikaverbrauchs auf Resistenzbildung und -selektion. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2:130–135
50. Hemsworth GR, Kochan I (1978) Secretion of Antimycobacterial Fatty Acids by Normal and Activated Macrophages. *Infect Immun* 19:170-177

51. Hertel S, Graffy L, Pötschke S, Basche S, Al-Ahmad A, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C (2016) Effect of *Inula viscosa* on the pellicle's protective properties and initial bio-adhesion in-situ. *Arch Oral Biol* 71:87–96
52. 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
53. Huang CB, George B, Ebersole JL (2010) Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. *Arch Oral Biol* 55:555–560
54. Huang CB, Alimova Y, Myers TM, Ebersole JL (2011) Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Arch Oral Biol* 56:650–6544
55. Iacono VJ, Mackay BJ, DiRienzo S, Pollock JJ (1980) Selective Antibacterial Properties of Lysozyme for Oral Microorganisms. *Infect Immun* 29:623-632
56. Joel TJ, Suguna SS, Steffi SR (2016) Antimicrobial Activity of Lysozyme Against Oral Pathogens. *Asian J. Pharm. Research and Health Care* 8:42–46
57. Joiner A, Muller D, Elofsson U, Malmsten M, Arnebrant T (2003) Adsorption from black tea and red wine onto in vitro salivary pellicles studied by ellipsometry. *Eur J Oral Sci* 111:417–22
58. Joiner A, Muller D, Elofsson U, Arnebrant T (2004) Ellipsometry analysis of the in vitro adsorption of tea polyphenols onto salivary pellicles. *Eur J Oral Sci* 112:510–5
59. Jollès P (1964) Neuere Untersuchungen an Lysozymen. *Angew. Chem.* 76:20–28
60. Jollès P (1969) Lysozyme: Ein Kapitel Molekularbiologie. *Angew. Chem.* 81: 244-256
61. 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
62. Kabara JJ, Swieczkowski DM, Conley AJ, Truant JP (1972) Fatty Acids and Derivatives as Antimicrobial Agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2:23–28
63. Kanai K, Kondo E (1979) Antibacterial and cytotoxic aspects of long-chain fatty acids as cell surface events: selected topics. *Jpn J Med Sci Biol* 32:135-174
64. Karabin M, Hudcova T, Jelinek L, Dostalek P (2015) Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnol Adv* 33:1063–1090

65. Karabín M, Hudcová T, Jelínek L, Dostálek P (2016) Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 15:542–567
66. Karygianni L, Follo M, Hellwig E, Burghardt D, Wolkewitz M, Anderson A, Al-Ahmad A (2012) Microscope-Based Imaging Platform for Large-Scale Analysis of Oral Biofilms. *Appl Environ Microbiol* 78:8703–8711
67. Kensche A, Kirsch J, Mintert S, Enders F, Pötschke S, Basche S, König B, Hannig C, Hannig M (2017) Impact of customary fluoride rinsing solutions on the pellicle's protective properties and bioadhesion in situ. *Sci Rep* 7:16584
68. Khademi A, Usefian E, Feizianfard M (2007) Tissue dissolving ability of several endodontic irrigants on bovine pulp tissue. *Iran Endod J* 2:65.68
69. Kirsch J, Jung A, Hille K, König B, Hannig C, Kölling-Speer I, Speer K, Hannig M (2020) Effect of *fragaria vesca*, *hamamelis* and *tormentil* on the initial bacterial colonization in situ. *Arch Oral Biol* 118:104853
70. Knez Hrnčič M, Španinger E, Košir I, Knez Ž, Bren U (2019) Hop Compounds: Extraction Techniques, Chemical Analyses, Antioxidative, Antimicrobial, and Anticarcinogenic Effects. *Nutrients* 11:257
71. Kresken M, Hafner D, Studiengruppe (2000) Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Chemotherapeutika in Mitteleuropa. *Chemother J* 9:51-86
72. Küpper FC, Gaquerel E, Cosse A, Adas F, Peters AF, Müller DG, Kloareg B, Salaün J-P, Potin P (2009) Free Fatty Acids and Methyl Jasmonate Trigger Defense Reactions in *Laminaria digitata*. *Plant Cell Physiol* 50:789–800
73. Laible NJ, Germaine GR (1985) Bactericidal activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides. *Infect Immun* 48:720–728
74. 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
75. Løe H, Theilade E, Jensen SB (1965) Experimental Gingivitis in Man. *J Periodontol* 36:177–187

76. Love RM (2002) The effect of tissue molecules on bacterial invasion of dentine. *Oral Microbiol Immunol* 17:32–37
77. Love RM (2004) Invasion of dentinal tubules by root canal bacteria. *Endod Topics* 9:52–65
78. Magana M, Sereti C, Ioannidis A, Mitchell CA, Ball AR, Magiorkinis E, Chatzipanagiotou S, Hamblin MR, Hadjifrangiskou M, Tegos GP (2018) Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms. *Clin Microbiol Rev* 31: e00084-16
79. Marsh PD, Bradshaw DJ (1995) Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* 15:169–175
80. Marsh PD (2006) Dental plaque as a biofilm and a microbial community- implications for health and disease. *BMC Oral Health* 6(Suppl.1):14
81. Marsh PD (2010) Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *J Dent* 38:S11–S15
82. McGaw LJ, Jäger AK, van Staden J (2002) Antibacterial effects of fatty acids and related compounds from plants. *S Afr J Bot* 68:417–423
83. Mckenzie HA, White FH (1991) Lysozyme and  $\alpha$ -Lactalbumin: Structure, Function, and Interrelationships. *Adv Protein Chem* 41:173-315
84. Morge S, Adamczak E, Linden LA (1989) Variation in human salivary pellicle formation on biomaterials during the day. *Arch Oral Biol* 34:669-674
85. Nowossadeck S (2013) Demografischer Wandel, Pflegebedürftige und der künftige Bedarf an Pflegekräften: Eine Übersicht. *Bundesgesundheitsblatt* 56:1040–1047
86. Philip N, Leishman S, Walsh L (2019) Potential Role for Natural Products in Dental Caries Control. *Oral Health and Prev Dent* 17:479–485
87. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW (2005) Periodontal diseases. *The Lancet* 366:1809–1820
88. Pleszczyńska M, Wiater A, Bachanek T, Szczodrak J (2017) Enzymes in therapy of biofilm-related oral diseases. *Biotechnol Appl Biochem* 64:337–346
89. Prentner A *Heilpflanzen der traditionellen europäischen Medizin: Wirkung und Anwendung nach häufigen Indikationen*, Springer, 2017, S. 330 ff.
90. Rehage M, Delius J, Hofmann T, Hannig M (2017) Oral Astringent Stimuli Alter the Enamel Pellicle's Ultrastructure as Revealed by Electron Microscopy. *J Dent* 63:21-29

91. Rozalski M, Micota B, Sadowska B, Stochmal A, Jedrejek D, Wieckowska-Szakiel M, Rozalska B (2013) Antiadherent and Antibiofilm Activity of *Humulus lupulus* L. Derived Products: New Pharmacological Properties. *BioMed Res Int* 2013:1–7
92. Samaranayake YH, Samaranayake LP, Wu PC, So M (1997) The antifungal effect of lactoferrin and lysozyme on *Candida krusei* and *Candida albicans*. *APMIS* 105:875–883
93. 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
94. Schek A Sekundäre Pflanzenstoffe. *Leistungssport* 32:44-52
95. Schurr BC, Hahne H, Kuster B, Behr J, Vogel RF (2015) Molecular mechanisms behind the antimicrobial activity of hop iso- $\alpha$ -acids in *Lactobacillus brevis*. *Food Microbiol* 46:553–563
96. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB (2007) Dental caries. *The Lancet* 369:51–59
97. Shah BN, Panchal MA, Gohil N, Nayak BS, Modi C (2010) Phyto-pharmacological profile of *Humulus lupulus*. *Pharmacologyonline* 1:719-736
98. Sharpe FR, Laws DRJ (1981) The essential oil of hops a review. *J Inst Brew* 87:96–107
99. Simpson WJ (1993) Cambridge prize lecture. Studies on the sensitivity of lactic acid bacteria to hop bitter acids. *J Inst Brew* 99:405–411
100. Slobodníková L, Fialová S, Rendeková K, Kováč J, Mučaji P (2016) Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. *Molecules* 21:1717
101. Stiefel P, Schmidt-Emrich S, Maniura-Weber K, Ren Q (2015) Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiol* 15:36
102. Tartari T, Bachmann L, Maliza AGA, Andrade FB, Duarte MAH, Bramante CM (2016) Tissue dissolution and modifications in dentin composition by different sodium hypochlorite concentrations. *J Appl Oral Sci* 24:291–298
103. 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 Invest* 17:841–850

104. Tennert C, Meyer-Lückel H (2019) Karies, dentaler Biofilm und Ernährung. *Der Freie Zahnarzt* 63:74–83
105. 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
106. Teuber M, Schmalreck AF (1973) Membrane leakage in *Bacillus subtilis* 168 induced by the hop constituents lupulone, humulone, isohumulone and humulinic acid. *Arch Mikrobiol* 94:159–171
107. Tinanoff N, Gross A, Brady JM (1976) Development of plaque on enamel.: Parallel investigations. *J Periodontal Res* 11:197–209
108. Van Der Weijden F, Slot DE (2011) Oral hygiene in the prevention of periodontal diseases: the evidence. *Periodontol 2000* 55:104–123
109. Vocadlo DJ, Davies GJ, Laine R, Withers SG (2001) Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature* 412:835–838
110. Watanabe T, Yamamoto Y, Miura M, Konno H, Yano S, Nonomura Y (2019) Systematic Analysis of Selective Bactericidal Activity of Fatty Acids against *Staphylococcus aureus* with Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration. *J Oleo Sci* 68:291–296
111. Weber H (2002) Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci* 7:217–224
112. Weber M-T, Hannig M, Pötschke S, Höhne F, Hannig C (2015) Application of Plant Extracts for the Prevention of Dental Erosion: An in situ/in vitro Study. *Caries Res* 49:477–487
113. Wilson C, Lukowicz R, Merchant S, Valquier-Flynn H, Caballero J, Sandoval J, Okuom M, Huber C, Brooks TD, Wilson E, Clement B, Wentworth CD, Holmes AE (2017) Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. *Res Rev J Eng Technol* 6:1-25
114. Winey M, Meehl JB, O’Toole ET, Giddings TH (2014) Conventional transmission electron microscopy. *Mol Biol Cell* 25:319–323
115. Wolff D, Kensche A, Rupf S, Hannig M, Hannig C (2014) Der orale Biofilm- neue Perspektiven zu einem alten Thema? *Dtsch Zahnarztl Z* 69:658-673

116. Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C (2000) Architecture of Intact Natural Human Plaque Biofilms Studied by Confocal Laser Scanning Microscopy. *J Dent Res* 79:21–27
117. Wu AJ, Ship JA (1993) A characterization of major salivary gland flow rates in the presence of medications and systemic diseases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 76:301–306
118. Yassen GH, Platt JA, Hara AT (2011) Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J Oral Sci* 53:273–282
119. Zanolli P, Zavatti M (2008) Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J Ethnopharmacol* 116:383–396
120. Zaura-Arite E, van Marle J, ten Cate JM (2001) Confocal Microscopy Study of Undisturbed and Chlorhexidine-treated Dental Biofilm. *J Dent Res* 80:1436–1440
121. Zheng CJ, Yoo J-S, Lee T-G, Cho H-Y, Kim Y-H, Kim W-G (2005) Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Lett* 579:5157–5162
122. Zijngel V, van Leeuwen MBM, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, M. Harmssen HJ (2010) Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth. *PLoS ONE* 5:e9321

Onlinequelle:

123. Bevölkerung Deutschlands bis 2060 - 13. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung. [https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Bevoelkerung/Bevoelkerungsvorausberechnung/Publikationen/Downloads-Vorausberechnung/bevoelkerung-deutschland-2060-presse-5124204159004.pdf?\\_\\_blob=publication-file](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Bevoelkerung/Bevoelkerungsvorausberechnung/Publikationen/Downloads-Vorausberechnung/bevoelkerung-deutschland-2060-presse-5124204159004.pdf?__blob=publication-file)

## 8 Danksagung

Meinem Doktorvater Professor Dr. Matthias Hannig, Direktor der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes danke ich herzlich. Danke für die freundliche Bereitstellung des Themas sowie der zur Durchführung der klinischen Studie notwendigen Materialien und Geräten. In diesem Zusammenhang gilt ein weiterer Dank dem Sonderforschungsbereich 1027. Außerdem bedanke ich mich für die stets konstruktiven Hinweise und Hilfestellungen in sämtlichen Phasen der Arbeit.

Herrn Pütz, Frau Leis und Frau König, die mir wertvolle Hilfestellungen im Bezug auf die Mikroskopieverfahren gegeben haben und ohne deren kompetente Hilfe und Erfahrung die Erstellung der Bilder nicht möglich gewesen wäre. Herrn Dr. Bashar Reda für die unablässige Hilfe bei allen Problemen, die sich im Rahmen der Arbeit auftaten.

Herrn Dr. Florian Baumann, der mir geduldig bei jeglicher Art technischer Probleme im Rahmen der Formatierung zur Seite stand. Herrn Elyas König- Benjeddou, der mit seiner künstlerischen Begabung die Graphik zum Versuchsaufbau entworfen und digitalisiert hat. Ebenso Frau Dr. Barbara Schlimmer, welche den in Material und Methode gezeigten Fotos den letzten Schliff gegeben hat.

Meiner Mutter, Ursula Krehbiel, danke ich insbesondere für die tatkräftige Unterstützung durch regelmäßiges Korrekturlesen der Arbeit.

Meinen Probanden danke ich für die zuverlässige Teilnahme an der Durchführung der klinischen Untersuchungen.

Ein besonderer, liebevoller Dank gilt meiner Familie ohne die weder die Grundlage zur Dissertation, das Zahnmedizinstudium, möglich gewesen wären, noch die Durchführung der Arbeit. Euer steter moralischer Beistand, eure Unterstützung und liebevolle Motivation haben mich bis zum Ende dieser Arbeit getragen. Ich danke auch meinem Freund Volker, der mich beim Schreiben dieser Arbeit immer unterstützt hat.

## 9 Lebenslauf

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