

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

Einfluss von Tanninsäure und experimenteller Kombinationsspüllösungen auf den oralen Bio- film *in-situ*

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

2025

vorgelegt von:

Fabian Maximilian Figlak

geb. am: 05.03.1999 in Homburg / Saar

Tag der Promotion: 26. November 2025

Dekan: Prof. Dr. M. Hannig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Hannig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Flockerzi

Meiner Familie in Liebe gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1	Deutsche Zusammenfassung	1
1.2	Abstract.....	2
2	EINLEITUNG	3
2.1	Literaturübersicht.....	3
2.1.1	Biofilm	3
2.1.2	Erosion	4
2.1.3	Mundspülungen.....	5
2.1.4	Chlorhexidin	5
2.1.5	Tanninsäure.....	7
2.1.6	Fluoridverbindungen.....	8
2.1.7	Pufferlösungen	9
2.2	Ziel der Arbeit / Fragestellung.....	10
3	MATERIAL UND METHODE	11
3.1	Probanden	11
3.2	Prüfkörper	11
3.3	Spüllösungen.....	12
3.4	Versuchsablauf	13
3.5	LIVE/DEAD® - Färbung und Fluoreszenzmikroskopie	15
3.5.1	LIVE/DEAD® Auswertung.....	17
3.6	Transmissionselektronenmikroskopie	18

3.7 Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	19
4 ERGEBNISSE	20
4.1 LIVE/DEAD® - Bedeckung.....	20
4.1.1 Versuchsreihe I – Alle Probanden	20
4.1.2 Versuchsreihe II – Zwei Probanden.....	22
4.2 LIVE/DEAD® - Bilder.....	24
4.3 LIVE/DEAD® - Vitalität.....	26
4.3.1 Versuchsreihe I – Alle Probanden	26
4.3.2 Versuchsreihe II – Zwei Probanden.....	28
4.4 LIVE/DEAD® - Vergleich.....	29
4.5 Rasterelektronenmikroskopie	30
4.6 Transmissionselektronenmikroskopie	38
4.6.1 Versuchsreihe I – Alle Probanden	38
4.6.2 Versuchsreihe II – Zwei Probanden.....	48
5 DISKUSSION	51
5.1 Studiendesign und Probanden.....	51
5.2 Prüfkörper	52
5.3 Analyseverfahren	52
5.3.1 LIVE/DEAD® Auswertung.....	52
5.3.2 REM Auswertung	53
5.3.3 TEM Auswertung.....	53
5.4 Diskussion der Ergebnisse.....	54
5.4.1 Negativkontrolle (Wasser)	54
5.4.2 Positivkontrolle (CHX).....	55

5.4.3 Natriumfluorid	55
5.4.4 Tanninsäure.....	56
5.4.5 Tanninsäure und Natriumfluorid.....	57
5.4.6 Phosphatpuffer	57
5.4.7 Tanninsäure und Phosphatpuffer	58
5.5 Schlussfolgerungen.....	59
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	61
7 DANKSAGUNG.....	70
8 LEBENSLAUF	71

Abkürzungsverzeichnis

bzw.	beziehungsweise
CHX	Chlorhexidin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
FM	Fluoreszenzmikroskop
PK	Prüfkörper
REM	Rasterelektronenmikroskop
TEM	Transmissionselektronenmikroskop

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Ziel: In dieser *in-situ*-Studie sollen antibakterielle und antiadhärente Effekte der Tanninsäure und deren Kombination mit Natriumfluorid und Pufferlösung auf den oralen Biofilm untersucht werden.

Material und Methode: Vier Probanden haben jeweils drei bovine Schmelzprüfkörper je Quadrant im Oberkiefer für 48 h getragen. Die Probanden sollten nach 3 min und anschließend alle 12 h für 30 s mit je 10 ml einer Spülösung spülen. Alle Probanden spülten mit Wasser, Chlorhexidin (0,2 %), Tanninsäure (5 %; pH = 2,3), Natriumfluorid (500 ppm F⁻; pH = 7,9) sowie Tanninsäure und Natriumfluorid (pH = 3,9). In einem zweiten Teil spülten zwei Probanden zusätzlich mit Phosphatpuffer (150 mM; pH = 7,5) und Tanninsäure plus Phosphatpuffer (pH = 5,5). Nach 48 h wurden die Prüfkörper entnommen und mit LIVE/DEAD BacLight angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Weitere Ergebnisse wurden mit dem Raster-elektronen- und Transmissionselektronenmikroskop gewonnen.

Ergebnisse: Die Prüfkörper waren bei der Spülung mit Wasser fast vollständig mit gleichermaßen lebenden und toten Bakterien bedeckt. Mit Chlorhexidin konnte der Biofilm in dieser Studie am stärksten reduziert werden. Die Spülung mit Natriumfluorid zeigte eine geringfügige Reduktion der Bedeckung. Tanninsäure hatte einen guten antibakteriellen Effekt, der Bedeckung und Vitalität signifikant reduzierte. Es zeigten sich jedoch erosive Veränderungen an der Schmelzoberfläche. Die Kombination mit Natriumfluorid konnte nur die Bedeckung noch weiter reduzieren, die Vitalität blieb nahezu unverändert. Die Pufferlösung hatte ähnlich der Negativkontrolle keinen Effekt auf den Biofilm. Die Kombination mit Tanninsäure zeigte, verglichen mit reiner Tanninsäure, eine höhere Bedeckung bei verminderter Vitalität. Es fanden sich keine erosiven Veränderungen.

Schlussfolgerung: Tanninsäure zeigt gute antibakterielle und antiadhärente Ergebnisse. Die Kombination mit Natriumfluorid hatte fast keine Steigerung der antibakteriellen Wirkung zu folge. Nach Kombination mit der Pufferlösung konnten die unerwünschten erosiven Schmelzveränderungen beseitigt werden. Gleichzeitig konnte ein ähnlich guter antibakterieller Effekt erzielt werden wie mit reiner Tanninsäure. Tanninsäure ist auch ohne den sauren Charakter antibakteriell und antiadhärent wirksam. Damit ist sie ein vielversprechendes orales Antiseptikum.

1.2 Abstract

Objectives: The present *in-situ* study has the aim to investigate the antibacterial and anti-adherent effects of tannic acid, and its combinations with sodium fluoride and buffer solution, on the oral biofilm.

Materials and methods: Four volunteers each carried three bovine enamel specimens per quadrant with upper jaw splints. Every subject had to rinse with the following agents: water, chlorhexidine (0,2 %), tannic acid (5 %; pH = 2,3), sodium fluoride (500 ppm F⁻; pH = 7,9) as well as tannic acid and sodium fluoride (pH = 3,9). In a second trial two subjects rinsed additionally with a buffer solution (150 mM; pH = 7,5) and tannic acid plus buffer solution (pH = 5,5). Beginning after 3 min, then every 12 h the subjects rinsed with 10 ml of the agents for 30 s. After 48 h the specimens were removed for analysis. The oral biofilm was stained with LIVE/DEAD *BacLight* and evaluated with the fluorescence microscope. In addition, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy were performed.

Results: The negative control with water showed a nearly fully biofilm covered specimen, featuring equal amounts of dead and live bacteria. Chlorhexidine was able to reduce both parameters surface coverage and biofilm vitality the most in this study. Sodium fluoride showed a low reduction of biofilm coverage. Tannic acid had a good antibacterial effect and reduced coverage as well as vitality significantly. However, the specimens revealed erosive changes of the enamel surface. The combination with sodium fluoride was not able to influence the biofilm vitality, but slightly reduced surface coverage. The buffer solution had no effect on the biofilm and was just as similar as water. Rinsing with buffered tannic acid resulted in a higher coverage, compared with regular tannic acid, with a slightly lower vitality. There were no erosions detected.

Conclusion: Tannic acid provides good antibacterial and anti-adherent effects. Sodium fluoride itself had no significant impact on the biofilm formation and vitality. While the combination of tannic acid and sodium fluoride couldn't improve the effects by much, the erosive changes were still detected. The buffered tannic acid solution showed similar results as just tannic acid but without any hint of erosion. In conclusion, tannic acid seems to be a promising oral antiseptic despite the lack of biofilm coverage reduction. Furthermore, this study shows that the effects are reproducible without the acidic character of itself.

2 Einleitung

Bei der Entstehung oraler Erkrankungen, wie beispielsweise Karies oder Parodontopathien, spielt der bakterielle Biofilm eine entscheidende Rolle. Karies und Parodontitis gehören heutzutage weltweit immer noch zu den häufigsten chronischen Erkrankungen des Menschen. Diese Erkrankungen sind weiterhin die Hauptursache von Zahnverlust und haben eine sehr hohe Prävalenz [35]. Parodontitis, welche eine klinisch relevantes Erscheinungsbild zeigt, betrifft schätzungsweise 11 % der Gesamtbevölkerung [87]. Der modernen Zahnmedizin stehen eine Vielzahl verschiedener Mundspülösungen mit unterschiedlichen Wirkstoffen zur Kontrolle des Biofilms zur Verfügung [20,43,75]. Insbesondere Chlorhexidin (CHX) Mundspülungen werden häufig als Goldstandard bezeichnet [9,58]. Studien haben bereits gezeigt, dass eine effektive Therapie Biofilm-assozierter Erkrankungen stark von der Mitarbeit und damit von der oralen Hygiene der Patienten abhängt [10,66,70]. Eine Prävention durch effektive Biofilmbekämpfung ist eine der Hauptstrategien der heutigen Zahnmedizin und stellt eine besondere Herausforderung für Patient und Behandler dar [24,35]. So ist eine einfache Anwendung, damit auch die Akzeptanz durch den Patienten, ebenso wichtig wie mögliche Nebenwirkungen. Die trotz moderner Methoden weiterhin hohe Prävalenz dentaler Erkrankungen in der Bevölkerung macht neue Strategien, Therapieoptionen und Forschung zu neuen Wirkstoffen und deren Einfluss auf den Biofilm notwendig.

2.1 Literaturübersicht

2.1.1 Biofilm

Unter Biofilm versteht man ein Kollektiv unterschiedlicher Bakterien, welche in eine extrazelluläre Matrix eingebettet sind [51,76]. Diese extrazelluläre Matrix besteht aus Polysacchariden, welche das Gerüst bilden, sowie hauptsächlich aus Wasser. Die Polysaccharide können von Bakterien in Phasen der Abwesenheit von Zucker abgebaut werden und zur Energiegewinnung genutzt werden. Die Matrix sorgt für mechanische Stabilität, bietet aber auch noch weitere Vorteile für den Biofilm. Sie ermöglicht den Transport von Abbauprodukten, Nährstoffen und unter anderem auch von Genen zur Resistenzentwicklung gegenüber Antibiotika [25]. Dadurch wird der Biofilm gegenüber äußeren Einflüssen resistenter [11,32]. Der Biofilm ermöglicht auch das Zusammenleben von anaeroben und aeroben Bakterien, da lokal aerobe Bakterien ein sauerstoffarmes Milieu bilden. Abbauprodukte einiger Bakterien können anderen Spezies zur Metabolisierung zu Verfügung gestellt werden, welche sonst nicht genutzt werden könnten [49,100].

Die Haftung des Biofilms an Zahnoberflächen wird durch die Pellikel vermittelt. Das ist eine bakterienfreie Schicht, vornehmlich bestehend aus Proteinen [39]. Speichelproteine und von Bakterien produzierte Proteine lagern sich durch elektrostatische Wechselwirkungen an die Zahnoberfläche an. Das verhindert ein einfaches Ablösen des Biofilms [2,21]. Die Zahnoberfläche besteht hauptsächlich aus Hydroxylapatit, eine mineralische Verbindung aus Calcium und Phosphat. Dieses unterliegt einem Löslichkeitsgleichgewicht, bei dem sich vor allem Calcium aus dem Hydroxylapatit im Speichel löst. So entsteht eine Doppelschicht aus negativ geladener Zahnsubstanz und positiver Calciumschicht. Hier können nun Proteine elektrostatisch binden [40,41]. Weitere Proteine können dann durch Wechselwirkung andocken, sodass sich nach circa 3 min die Pellikel bildet. Diese erfüllt mehrere Funktionen. Sie vermittelt durch spezielle Proteine antimikrobielle Eigenschaften, kann über Carboanhydrasen den pH-Wert stabilisieren und bietet Schutz vor Erosion und Abrasion [3]. Enzyme aus dem Speichel beeinflussen die Pellikel und können zum Teil selektiv an die Pellikel binden [39].

Allerdings ist die Pellikel auch für die Adhäsion von Bakterien aus der Mundhöhle verantwortlich [21,76]. Über beispielsweise elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals Kräfte wird eine Anhaftung an die Pellikel erreicht. Ein starker Verbund wird anschließend über Adhäsine vermittelt, welche sich auf der Zelloberfläche von Bakterien anlagern und eine Bindung an Proteine der Pellikel-Schicht ermöglichen. Durch Ausbilden der extrazellulären Matrix und Adhäsion weiterer Bakterien entsteht nach einiger Zeit eine komplexe bakterielle Gemeinschaft [40,41]. Dennoch ist ein florierender Biofilm kein alleiniger Faktor für die Entstehung von Parodontopathien oder Karies.

2.1.2 Erosion

Erosion an der Zahnhartsubstanz ist ein chemischer Prozess ohne Beteiligung von Bakterien. Grundlage ist eine Verschiebung des Gleichgewichtes zu Gunsten der Demineralisierung von Zahnhartsubstanz [45]. Dies geschieht durch die Einwirkung saurer Substanzen auf die Zahnoberfläche [27,72]. Häufig handelt es sich dabei um saure Nahrungsmittel, aber auch körpereigene Säuren wie zum Beispiel die Magensäure wirken erosiv. Erosive Zahnhartsubstanzdefekte können unterschiedlich stark ausgeprägt sein, abhängig von der Säure und der Einwirkzeit. Dabei sind Defekte von bis zu mehreren Mikrometer möglich. Meist als glatte, matte Kavitationen sichtbar können sie auch große Teile der Zahnoberfläche erweichen [72,109]. Durch Reibung kann sich der Ausprägungsgrad verschlimmern.

Die erosiven Eigenschaften der sauren Agenzien sind abhängig von verschiedenen Faktoren wie pH-Wert, Pufferkapazität des Speichels, Adhäsion an die Zahnhartsubstanz sowie Mineralkonzentration von Calcium, Phosphat und Fluorid des Zahns [48]. Die Frequenz und Einwirkzeit der Säure spielt ebenfalls eine große Rolle [17,73]. In Studien wurde bereits der Einfluss von verschiedenen erosiven Nahrungsmitteln auf den Zahnschmelz untersucht [73,104]. Ansätze verschiedener Spülösungen und Substanzen zur Remineralisierung und Prävention erosiver Effekte wurden bereits ausgiebig untersucht [17,48,67,69,81,82,84,108]. So sind auch Mundspülungen zum Teil sauer, jedoch führt nicht jeder pH-Wert-Abfall zu erosiven Veränderungen. Abhängig von Calcium- und Fluoridgehalt der Substanzen können erosive Veränderungen durch Remineralisation verhindert werden [73].

2.1.3 Mundspülungen

Mundspülungen finden in der Zahnmedizin bereits seit vielen Jahren Anwendung. Erste Mundspülungen wurden vorwiegend gegen schlechten Mundgeruch eingesetzt und bestanden häufig aus einfachen Kräutermischungen. Mittlerweile sind etliche Mundspülungen auf dem Markt. Insbesondere als unterstützende Maßnahme zur täglichen Mundhygiene und zur Therapie von oralen Erkrankungen werden sie gegen Mundgeruch, Karies, Parodontitis und Gingivitis eingesetzt. Mundspülungen bieten den großen Vorteil der einfachen Anwendung. Heutzutage sind sie aus der modernen Zahnmedizin nicht mehr wegzudenken.

Die Akzeptanz und damit auch die effektive Nutzung beruhen auf Geschmack, Farbe und Geruch. Auch die Nachfrage nach natürlichen Inhaltsstoffen ist vielen Nutzern wichtig [37]. Viele Mundspülungen enthalten zudem Alkohol [20]. Eine CHX-Spülösung gilt als Goldstandard in der Zahnmedizin, doch durch das Nebenwirkungsprofil ist sie nur eingeschränkt zur dauerhaften Anwendung geeignet [58].

2.1.4 Chlorhexidin

CHX ist ein positiv geladenes Molekül aus der Gruppe der Polybiguanide. Bereits seit vielen Jahrzehnten in der Zahnmedizin eingesetzt wurde es anfangs vorwiegend in der Chirurgie zur Desinfektion genutzt [85]. Es zeigt antimikrobielle Eigenschaften [30,58,65]. Durch die positiv geladenen Gruppen ist es in der Lage, an die negativ geladene Zelloberfläche von Bakterien zu binden und die Integrität der Zellwand zu beeinflussen. CHX wirkt somit bakteriostatisch [65]. Außerdem kann es in Bakterien eindringen und deren Metabolismus durch Komplexbildung mit Phosphat stören. Es kommt zu einer Ausfällung der Komplexe bei hohen CHX-Konzentrationen, wodurch es auch bakterizid wirkt [14,19,88]. In Studien konnte die Wirkung

auf den Biofilm bereits nachgewiesen werden [8,14,19,78]. Auch konnte eine Reduktion von Bakterien auf der Zunge und damit eine Verbesserung von Mundgeruch nachgewiesen werden [14,94].

CHX hat außerdem einen direkten Einfluss auf die Pellicel *in-situ*. Es interagiert mit den negativ geladenen Speichelproteinen und verhindert so die Ausbildung der Pellicel. Zudem kann es an die Pellicel selbst binden [86,88]. Diese Schicht ist essenziell für die Entstehung eines Biofilms. Durch die Bindung an Polysacharide der extrazellulären Matrix und der Glykokalyx von Bakterien wird deren Adhäsion gestört [19,78,79,88]. Dadurch wirkt CHX um bis zu 12 Stunden nach Ende der Spülung nach [30,65,86]. Trotz der überragenden Wirksamkeit von CHX wird weiter geforscht, um Alternativen zu entwickeln. Auch Kombinationen zur Verbesserung des Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil werden untersucht [89]. So konnte gezeigt werden, dass eine Kombination von CHX mit Phosphatpuffern die Heilung einer Medikamentenbedingten Osteonekrose signifikant verbessern kann [105].

Eine Studie von Sadat *et al.* (2015) konnte zeigen, dass die Zugabe von Fluoriden zu CHX-Spüllösungen die Anzahl der *S. mutans* Bakterien im Speichel signifikant verringert. Die Nebenwirkungen waren allerdings etwas ausgeprägter als in der Vergleichsgruppe. Dagegen stehen die Ergebnisse einer weiteren Studie, bei der eine Kombination mit Natriumfluorid und Triclosan weniger effektiv war, aber auch weniger Verfärbungen auftraten [64].

Durch das Nebenwirkungsprofil, das insbesondere bei Langzeitanwendungen auftritt, ist CHX nicht für den dauerhaften und präventiven Gebrauch geeignet. Besonders die bräunlich-kupferfarbenen, extrinsischen Zahnverfärbungen zählen zu den häufigsten Nebenwirkungen [85]. Diese treten bereits nach einigen Tagen auf und sind bei der täglichen normalen Mundhygiene kaum zu entfernen [6]. Die genaue Ursache hierfür ist trotz verschiedener Theorien nicht abschließend geklärt. CHX kann Reaktionen von Polysachariden mit Aminosäuren katalysieren, deren Produkte die spezifische Farbe aufweisen. Durch Spaltung von Proteinen können Metallionen mit diesen reagieren und farbige Komplexe bilden. Weitere Nebenwirkungen sind Geschmacksstörungen, Schleimhautveränderungen und verstärkte Zahnsteinbildung. Diese Effekte sind reversibel. In dieser Arbeit werden daher Alternativen zu CHX-Spüllösungen untersucht.

2.1.5 Tanninsäure

Die der Gruppe der Polyphenole zugehörige Tanninsäure ist ein wasserlöslicher und in der Natur vorkommender Stoff. Sie ist vor allem in Rotwein, Tee, Kräutern und Eichen zu finden. Durch die Nahrung nehmen wir Menschen beinahe täglich Polyphenole zu uns [33]. Ein besonderes Merkmal ist die adstringierende Wirkung des Stoffes. Polyphenole sind mit mindestens zwei Hydroxylgruppen ausgestattete, aromatische Verbindungen. Die Eigenschaften von Polyphenolen sind bereits lange bekannt und finden auch in der modernen Medizin Anwendung [54]. Es wurden bereits antioxidative und antimikrobielle Eigenschaften nachgewiesen [92,106]. Zudem sind Polyphenole in der Lage an DNS zu binden und innerhalb von Zellen oxidativen Stress auszulösen [62]. Diese Eigenschaften könnten eine Erklärung für die antibakterielle Wirkung sein. In der Zahnmedizin spielt vor allem die Bindung an verschiedene Proteine, Mucine, sowie Amylase und Cystatin eine Rolle [106]. Durch die Reaktion mit diesen kommt es zur Ausfällung von Komplexen, besonders in der Pellikel-Schicht [12,34,46,57]. Auch die Komplexbildung mit Metallionen und die Adhäsion der Mikroorganismen spielt eine Rolle für die Überlebensfähigkeit der Bakterien [101].

In einer Übersichtsarbeit von Kaczmarek (2020) konnten antibakterielle und antivirale Eigenschaften der Tanninsäure aufgezeigt werden. Auch bei Tanninsäure konnten bereits Zahnverfärbungen bei längerer Anwendung beobachtet werden [83]. Untersuchungen mit Tanninsäure hinsichtlich der Effekte auf die Pellikel wurde von Xi *et al.* (2020) in einer Studie bereits durchgeführt. Dabei wurden bovine Schmelzprüfkörper an Schienen im Oberkiefer eines Probanden befestigt. Zwei Mal täglich wurde mit 1 %iger Tanninsäure gespült und nach 24 h ausgewertet. Unter dem Elektronenmikroskop zeigte sich eine Verstärkung der Elektronendichte an der Pellikel-Schicht. Außerdem wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop eine Biofilm Reduktion beobachtet. Die Anwendung polyphenolhaltiger Wirkstoffe bzw. Kräuter in der Therapie von Parodontopathien wurde bereits in mehreren Studien beschrieben [29,31,102]. Es konnte auch eine effektive Biofilmreduktion an bovinen, *in-situ* getragenen, Dentin-Prüfkörpern nachgewiesen werden [91]. Polyphenole zeigen im Allgemeinen eine Reduktion der initialen bakteriellen Adhärenz [42].

Tagashira *et al.* (1997) haben bereits Versuche mit polyphenolhaltigen Hopfenlösungen (*Humulus lupulus L.*) durchgeführt. Dabei wurden Polyphenole mit hohem und niedrigem Molekulargewicht in unterschiedlichen Konzentrationen direkt auf Bakterienkulturen der Spezies *S. mutans* und *S. sobrinus* aufgetragen. Anschließend wurden diese mit Enzymen, Glycolystransferasen und Nährstoffen versehen und für 24 h inkubiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass

hochmolekulare Polyphenole bereits in niedrigen Konzentrationen effektiv die Zelladhäsion behindern und sogar die Glycoslytransferase inhibieren [101]. Tanninsäure kann zudem spezielle ATPasen an Bakterienmembranen stören. Dies führt zu einem gestörten Ionenfluss. Als Folge wird die Membran durchlässiger für verschiedene Stoffe, was den Energiestoffwechsel und die Signalkaskaden beeinträchtigt [1,91]. Insgesamt kann festgestellt werden, dass sich viele Studien mit der Anwendung von in der Natur vorkommenden Wirkstoffen beschäftigen [15,18,22,30,56,60,77,96,97,110]. Es konnten vor allem antimikrobielle Effekte nachgewiesen werden. Diese macht sich die traditionelle Kräutermedizin auch bezogen auf den dentalen Biofilm zu nutze. Zudem konnten Effekte auf Speichelproteine und Pellikel nachgewiesen werden. Dort zeigten sich charakteristische Veränderungen [46,56,110].

Tanninsäure zeigt jedoch auch unerwünschte Wirkungen. Dazu zählen Geschmacksirritationen, ein anhaltendes Mundtrockenheitsgefühl und Zahnverfärbungen [83]. Tanninsäure kommt insbesondere in solchen Lebensmitteln vor, welche einen hohen Säuregehalt aufweisen. Tanninsäure selbst ist eine Säure. Saure Lebensmittel und auch Tanninsäure haben das Potenzial, den Zahnschmelz durch Erosion zu schädigen [73,104]. Im Rahmen der Arbeit werden Spülösungen mit Tanninsäure verwendet. Es soll die Wirkung auf den Biofilm und die Schmelzoberfläche untersucht werden. Es gibt jedoch keine *in-situ*-Studien (Stand 2024), die eine Kombination von Tanninsäure mit anderen Substanzen zur Optimierung von Effekten und Nebenwirkungen untersuchen haben.

2.1.6 Fluoridverbindungen

Die Anwendung von Fluoriden gehört zu den häufigsten Maßnahmen der Kariesprävention. Die Zufuhr erfolgt meist topisch in Form von Zahnpasta, Gelee oder Mundspülungen. Auch die systemische Applikation mittels Tabletten, der Nahrung oder über das Trinkwasser ist möglich. Die kariesprotektive Wirkung ist durch viele Studien belegt [28,38,44,99]. Zwei wesentliche Effekte sind hierfür verantwortlich. Zum einen der Austausch von dentalem Hydroxylapatit durch das schwerer lösliche Fluorapatit. Zum anderen spielt die Bildung einer Calciumfluoridschicht auf der Zahnoberfläche als Depot für Fluorid-Ionen eine Rolle [93]. Diese beiden Effekte sorgen auch für eine erhöhte Säureresistenz, insbesondere gegen die von Bakterien gebildete Milchsäure [74]. Fluoride in Zahnpasta und Mundspülungen kommen in unterschiedlichen Verbindungen vor. Eine der häufigsten ist Natriumfluorid. Die Fluoridkonzentration unterscheidet sich je nach Produktart und Hersteller [99]. In handelsüblichen Mundspülungen sind Natriumfluoridkonzentrationen von etwa 500 ppm Fluorid zu finden. Auch in Studien werden solche Konzentrationen verwendet [61,63].

In einer Studie von Kirsch *et al.* (2019) konnte gezeigt werden, dass Fluoride effektiv bei der Inhibition des initialen Biofilms sind. Insbesondere Zinnfluorid und Aminfluorid konnten sich hervorheben. Auch eine weitere Studie von Kensche *et al.* (2017) konnte nachweisen, dass Fluoride durch Modifikation der Pellicel eine bakterielle Adhäsion verhindern. Die Studien konnten eine Reduktion der bakteriellen Biofilmbildung, insbesondere innerhalb der ersten 24 h, nachweisen [43,61,63]. Ein signifikanter protektiver Effekt gegen Erosion konnte bei Natriumfluorid nicht nachgewiesen werden [23]. Entscheidend für diese Prozesse ist ein leicht saurer pH-Wert, der eine Remineralisierung des Zahnschmelzes und die Bildung von Fluorapatit ermöglicht [26]. Mundspülungen mit vornehmlich Natriumfluorid werden daher für die Kariesprävention vermarktet. Fluoride sind die Wirkstoffe der Wahl [93]. Die Nachfrage und der Forschungsdrang nach Kombinationen zur Wirkungsoptimierung sind hoch. Es gibt jedoch wenig Studien, die den längeren Einfluss solcher Fluorid-Kombinationen auf den Biofilm untersucht haben.

2.1.7 Pufferlösungen

Pufferlösungen sind Stoffgemische, die aus einer schwachen Säure und ihrer korrespondierenden Base bestehen. Charakteristisch ist, dass sich der pH-Wert des Systems bei der Zugabe einer starken Säure oder Base nur unwesentlich ändert, verglichen mit ungepufferten Lösungen. Puffersysteme können geschlossen funktionieren oder mit ihrer Umgebung interagieren. Dabei geben sie Reaktionsprodukte an ihre Umgebung ab, um den pH-Wert zu stabilisieren. Das Verhältnis der beiden Pufferpaare zueinander ist der entscheidende Faktor bei der Einstellung des pH-Wertes. Die Pufferkapazität beschreibt die Menge, die ein solches System bei Zugabe einer Säure oder Base abpuffern kann, bevor sich der pH-Wert wesentlich ändert. Es kann also als Maß für die Effektivität angesehen werden [50]. Als Maß für die Stärke einer solchen Säure oder Base wird die Säurekonstante pK_s verwendet. Für Pufferlösungen werden idealerweise mittelschwache Säuren bzw. Basen verwendet. Zur Berechnung und annäherungsweisen Darstellung eines solchen Systems wird die Henderson-Hasselbalch-Gleichung herangezogen. Sie wird nachfolgend definiert als: $pH = pK_a - \log_{10} ([HA]/[A^-])$. Dabei steht HA für das protonierte Pufferpaar und A^- für das deprotonierte Gegenstück. Der pK_a -Wert steht hier für die Säurekonstante pK_s . Diese Konstante ist individuell abhängig von der Puffersubstanz [36].

Zu den bekanntesten Puffer gehören der Phosphatpuffer, Kohlensäure-Bicarbonat-Puffer, Essigsäure-Acetat-Puffer und der Ammoniakpuffer. Bei der Physiologie des Menschen spielt insbesondere der Kohlensäure-Bicarbonat und der Phosphatpuffer eine wichtige Rolle, beispielsweise bei der Einstellung des Blut pH-Wertes [50].

Der Phosphatpuffer ist auch in der Lebensmittelindustrie etabliert, wie z.B. bei der Herstellung von Softgetränken wie Coca-Cola® oder Ähnlichem [55]. Liao und Shollenberger (2003) konnten in einer Versuchsreihe nachweisen, dass verschiedene humanpathogene Bakterienspezies in Phosphatpufferlösung für mehrere Jahre aufbewahrt werden können. Es konnte sogar gezeigt werden, dass die Bakterien länger überlebten als in sterilem Wasser [68]. Der menschliche Speichel arbeitet ebenfalls mit diesen Puffersystemen, um den pH-Wert im oralen Milieu konstant zu halten. Dadurch können saure Nahrungsmittel abgepuffert und Demineralisationsprozesse verhindert werden [17,26,104]. Puffersysteme spielen also eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Erosionen und Karies.

Studien zur Untersuchung des Einflusses von Phosphatpuffer oder anderen rein gepufferten Lösungen auf den oralen Biofilm hat es bisher nicht gegeben. So finden sich keine Versuchsreihen, in denen Probanden mit Pufferlösungen spülen mussten, oder in denen Pufferlösungen speziell auf *in-situ* geformten Biofilm appliziert wurden. Puffer wurden lediglich zur Stabilisierung von Testlösungen verwendet [82,105]. Es finden sich auch keine wissenschaftliche Publikationen über die Anwendung von gepufferten Lösungen in der Mundhöhle. In der Medizin kommen ebenfalls keine direkten Pufferlösungen zur Anwendung. Indirekt wird die Ringer-Lactat-Lösung als Puffer eingesetzt. Die Lactat-Ionen werden in der Leber metabolisiert und die freiwerdenden Hydrogencarbonat-Ionen beeinflussen den Blut pH-Wert [5].

Die fehlenden Studien geben Anlass den Einfluss auf den Biofilm, Schmelzoberfläche und die Möglichkeiten zur Kombination zu untersuchen.

2.2 Ziel der Arbeit / Fragestellung

Die vorliegende *in-situ*-Studie untersucht die Wirkung von Tanninsäure, Fluoriden, Pufferlösungen und deren Kombinationen auf den 48 h Biofilm. Es sollen mögliche antibakterielle und antiadhärente Effekte gezeigt werden. Es stellt sich die Frage, ob sich diese Spüllösungen von der Negativkontrolle Wasser unterscheiden und ob sie ähnlich effektiv wie CHX bei der Reduktion der oralen Biofilm-Entstehung sind. Weiter soll die Frage geklärt werden, inwiefern die Kombinationen sich in ihren Wirkungen ergänzen oder behindern. Auch mögliche erosive Effekte sollen untersucht werden. Ziel war es, durch die Kombination der Substanzen, einen möglichen kumulativen Effekt aufzuzeigen und Alternativen gegenüber CHX zu finden.

3 Material und Methode

3.1 Probanden

Insgesamt vier Probanden (je zwei männlich und weiblich) im Alter zwischen 23 bis 28 Jahren nahmen an der Studie teil. Die Probanden waren Studenten und wurden im Hinblick auf ihre Mundgesundheit untersucht. Alle Teilnehmer hatten ein kariesfreies Gebiss und zeigten keine Parodontopathien. Es lagen keine Allgemeinerkrankungen vor und es wurden keine regelmäßigen Medikamente eingenommen. Die Zustimmung durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes (Kennnummer 54/21, 2021) lag vor Beginn vor.

3.2 Prüfkörper

Die folgende Studie nutzte Schmelz-Dentin-Prüfkörper bovinen Ursprungs. Die Prüfkörper (PK) wurden aus den Unterkieferfrontzähnen von Rindern des Schlachthofes in Zweibrücken gewonnen. Mittels einer Trennscheibe wurde aus den vestibulären Glattflächen ein Rohling gefertigt. Anschließend wurden diese in aufsteigender Körnung mit Siliziumcarbid Schleifpapier (CarbiMet™, Buehler, Illinois, USA) an einer Schleifmaschine (Phoenix 3000 Variable Speed Grinder-Polisher, Illinois, USA) mit Wasser in Form gebracht. Mit einer Schichtstärke von circa 2 mm und einer Kantenlänge von circa 5 mm wurde ein annähernd quadratischer PK hergestellt. Dabei wurde ein Verhältnis von Schmelz zu Dentin von 1:3 eingehalten. Die Dentinschicht dient später als Orientierung, außerdem stabilisiert sie die Schmelzschicht und macht diese bruchsicherer. Für jeden Versuch wurden jeweils vier PK angefertigt, deren Schmelzoberfläche mit Nassschleifpapier der Körnung P 2500, sowie der Körnung P 4000 poliert wurden. Die so hergestellten PK wurden unter dem Lichtmikroskop kontrolliert.

Die PK, die nicht sofort weiterverwendet wurden, sowie unfertige wurden bei 4 °C in 0,1 %iger Thymol-Lösung (Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg, Deutschland) im Kühlschrank aufbewahrt. Vor Durchführung eines Versuches wurden die PK gemäß Reinigungsprotokoll behandelt. Nach dreiminütigem Einlegen in 3 %igem Natriumhypochlorit (Natriumhypochlorit-Lösung 3 % DAC 500 ml, Hedinger, Stuttgart, Deutschland) wurden die PK mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) abgespült und für 5 min in VE-Wasser im Ultraschallbad gereinigt. Anschließend wurden diese in 70 % Isopropylalkohol (Isopropylalkohol 70 %, Hedinger, Stuttgart, Deutschland) für 15 min eingelegt. Abschließend wurde jeder PK mit sterilem Wasser (Ampuwa, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) abgespült und für

mindestens 6 h bei 4 °C zur Rehydratisierung aufbewahrt. Danach konnten die PK für die Versuchsreihe weiterverwendet werden.

3.3 Spüllösungen

Die Negativkontrolle erfolgte mit sterilem Wasser, wofür bereits eine gebrauchsfertige Am-puwa-Lösung zur Verfügung stand. Für die Positivkontrolle mit CHX wurde ebenfalls eine gebrauchsfertige Lösung genutzt. Eine 0,2 %ige Chlorhexidindigluconat-Lösung (Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg, Deutschland) wurde verwendet. Die Spüllösungen mit Natriumfluorid, Tanninsäure und Phosphatpuffer wurden für eine Versuchsreihe auf Vorrat hergestellt. Dabei wurden die Vorratsgefäße bei 4 °C für maximal drei Monate gelagert. Für jede Versuchsreihe wurden die Spüllösungen erneut auf Vorrat hergestellt.

Zur Herstellung einer 10 %igen Tanninsäure-Lösung diente ein hochmolekulares Tanninsäurepulver (Sigma®, Saint Louis, USA). Nach Abwiegen von 10 g wurde unter Verwendung eines Magnetrührers (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) mit sterilem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Bei Raumtemperatur wurde die Lösung für 30 min umgerührt und anschließend eingelagert. Für die Herstellung einer 0,2 %igen Natriumfluorid-Lösung diente Natriumfluoridpulver (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Insgesamt 0,2 g des Pulvers wurden, ebenfalls mittels Magnetrührer, mit sterilem Wasser auf 100 ml ergänzt. Das entspricht einem Fluorid-Gehalt von 1000 ppm. Die Pufferlösung wurde selbst angesetzt. Die beiden Ausgangssubstanzen waren Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) und Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4). Für eine Phosphat-gepufferte Lösung der Molarität 300 mM wurden 2,46 g Na_2HPO_4 und 1,53 g NaH_2PO_4 (Carl Roth GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) zusammengegeben, anschließend mit sterilem Wasser auf 100 ml ergänzt und gerührt und mit Millex® Inline-Filtern (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) steril filtriert. Die Phosphatkonzentration der Lösung betrug 89 mg, vergleichbar mit dem Phosphatan teil in 100 ml H-Milch [80].

Vor Versuchsdurchführung wurden die Lösungen für 30 min erneut mit dem Magnetrührer durchmischt und 10 min ruhen gelassen. Anschließend wurden je 20 ml der Spüllösungen in ein Falconrörchen gegeben und für die Probanden vorbereitet. Vor der Spülung durch den Probanden wurden die Spüllösungen im Verhältnis 1:1 mit sterilem Wasser verdünnt, damit die finale Konzentration der Spüllösungen erreicht wird. Außerdem wird so eine adäquate Durchmischung erzielt. Die Kontrollen mit CHX und sterilem Wasser wurden als Fertiglösung verwendet. Für die Versuche mit den Kombinationsspüllösungen wurde jeweils Tanninsäure und

Natriumfluorid bzw. Tanninsäure und Phosphatpuffer im Verhältnis 1:1 gemischt. Durch die Verwendung von Stammlösungen und der anschließenden Verdünnung ergeben sich folgende Konzentrationen der Testlösungen: Tanninsäure 5 %, Phosphatpuffer 150 mM, Natriumfluorid 500 ppm F⁻. In Tabelle 1 sind alle Spülösungen und ihre pH-Werte aufgelistet.

Tabelle 1: Spülösungen und ihre gemessenen pH-Werte

Spülösung	pH-Wert
Steriles Wasser	5,7
CHX 0,2 %	9,4
Natriumfluorid 500 ppm F ⁻	7,9
Tanninsäure 5 %	2,3
Phosphatpuffer 150 mM	7,5
Tanninsäure 5 % + Natriumfluorid 500 ppm F ⁻	3,9
Tanninsäure 5 % + Phosphatpuffer 150 mM	5,5

3.4 Versuchsablauf

Für jeden Probanden wurden auf einem Gipsmodell aus Tiefziehfolien (DURAN®, Scheu Dental GmbH, Iserlohn, Deutschland) zwei Kunststoffschienen angefertigt: je eine für den ersten und zweiten Quadranten und jeweils vom ersten Prämolaren bis zum zweiten Molaren zugeschnitten. Zur besseren Retention wurden in die Schienen circa 5 mm große Löcher in regelmäßigen Abständen gebohrt. Die PK wurden mit einem dünnfließenden Silikon (President light body, Coltène/Whaledent GmbH + Co. KG, Langenau, Deutschland) bukkal auf der Schiene befestigt. Für jeden Versuch wurden je Quadrant drei PK befestigt, zwei in der Körnung P 2500, ein PK in der Körnung P 4000 (Abb. 1). Auf Nahrung wurde 2 h vor dem Einsetzen der Schiene verzichtet. Die beiden Schienen wurden für 48 h intraoral getragen und nur zum Essen herausgenommen und in feuchtem Milieu gelagert. Während der gesamten Tragedauer wurden die Zähne nur mit Wasser und Zahnbürste gereinigt, wobei die Schiene nicht getragen wurde. Auf die Anwendung von häuslichen Mundspülungen, Kaugummis und ähnlichem wurde verzichtet. Es wurde überwiegend Wasser getrunken und bei Konsum anderer Getränke wurde die Schiene in feuchtem Milieu gelagert.



Abb. 1: Rechte Trageschiene auf dem Modell eines Probanden. Die Zahlen 1 bis 3 zeigen die fixierten PK in Silikon. PK 1 und 2 in der Körnung P 2500, PK 3 in der Körnung P 4000.

Vor der Applikation der Spüllösung wurden je 5 ml der Spüllösung und Wasser oder der kombinierten Spüllösungen zusammengegeben und vorsichtig durch Schwenken des Falcon-Röhrchens durchmischt. Bei den Kontrollen wurden direkt 10 ml der Lösung verwendet. Anschließend wurde für 30 s mit 10 ml gespült. Die Probanden spülten direkt nach 3 min, dann nach jeweils 12 h, 24 h und 36 h. Nach 48 h Tragedauer wurden die Schienen abgelegt und die PK vorsichtig aus dem Silikon gelöst. Die PK wurden mit vollentsalztem Wasser aus einer Druckflasche abgespült, um den Speichel und freie Zellen zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die Auswertung der PK. Zwischen den einzelnen Versuchsreihen wurde eine Auswaschzeit von mindestens zwei Tagen eingehalten, um eine Überschneidung der Effekte zu verhindern. Alle vier Probanden durchliefen die Hauptversuchsreihe bestehend aus Negativkontrolle, Positivkontrolle, Natriumfluorid, Tanninsäure und Tanninsäure + Natriumfluorid. Zwei dieser Probanden wurden zufällig ausgewählt und durchliefen zusätzlich eine Versuchsreihe mit Phosphatpuffer und Tanninsäure + Phosphatpuffer (Abb. 2).

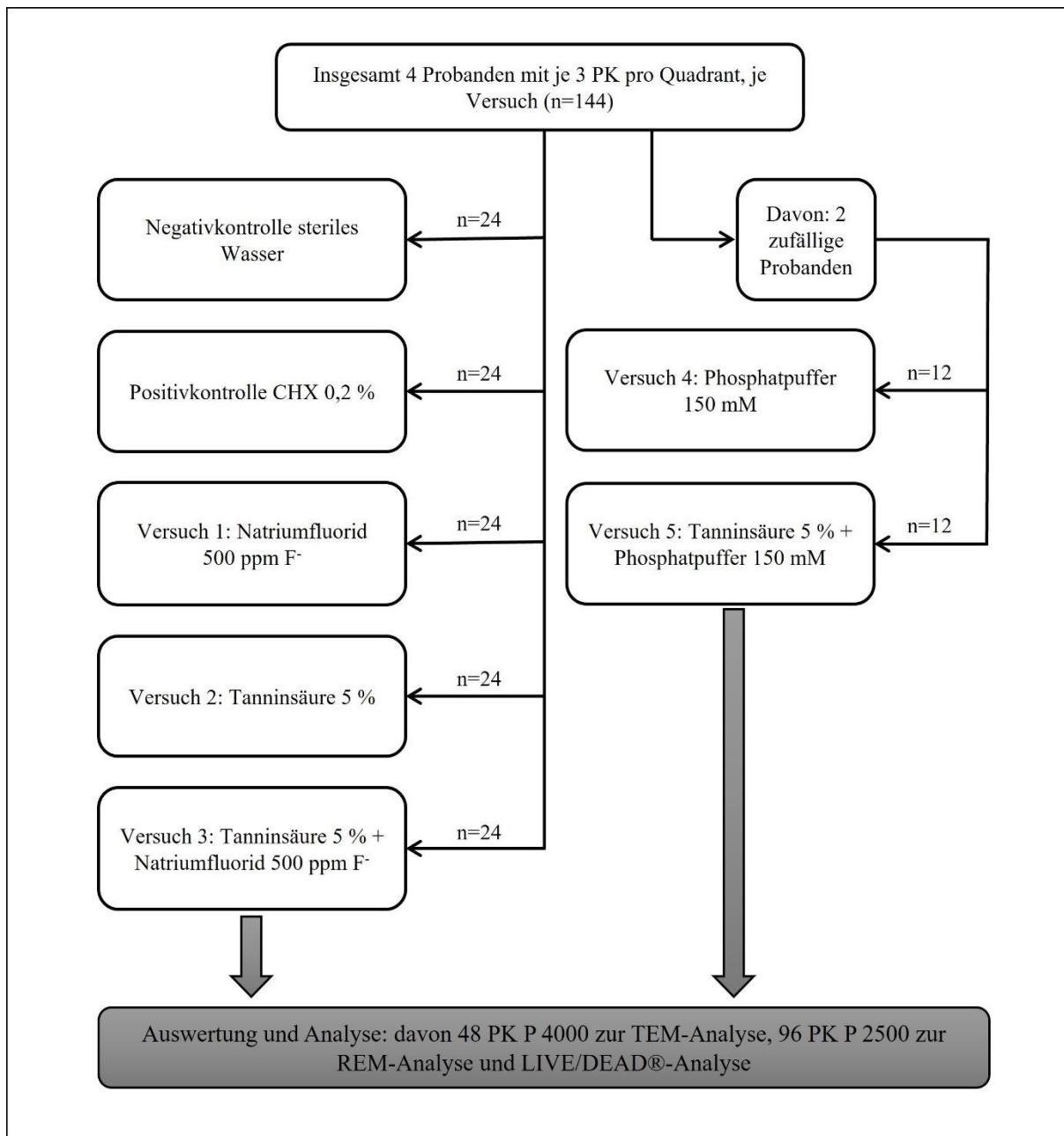


Abb. 2: Diagramm zur Darstellung des Versuchsablauf mit Anzahl der analysierten PK. TEM = Transmissions-elektronenmikroskopie, REM = Rasterelektronenmikroskopie.

3.5 LIVE/DEAD® - Färbung und Fluoreszenzmikroskopie

Jeweils zwei PK (poliert bis P 2500) pro Proband, jeweils links und rechts, wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die PK wurden in einer Feuchtkammer temporär gelagert. Dazu diente ein Well-Platte, in welcher ein fusselfreies Tuch in eine der Mulden platziert und mit vollentsalztem Wasser befeuchtet wurde. Der zu analysierende PK wurde aus der Feuchtkammer genommen, mit einem fusselfreien Tuch vorsichtig getrocknet und Markierungen auf der Schmelzoberfläche vorgenommen. Der PK wurde dazu in sechs Segmente eingeteilt, in jedem dieser wird ein repräsentatives Bild aufgenommen. Zur Färbung der Bakterien des

Biofilms wurde das LIVE/DEAD® *BacLight*™ Bacterial Viability Kit L7012 (LIVE/DEAD® *BacLight*™ Bacterial Viability Kit L7012, Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) verwendet. Das Set besteht aus dem grün fluoreszierendem Farbstoff STYO 9 (3,34 mM, 300 µl Lösung in Dimethylsulfoxid) sowie dem rot fluoreszierendem Farbstoff Propidiumiodid (20 mM, 300 µl Lösung in Dimethylsulfoxid) und außerdem einem *BacLight* mounting oil. Die Farblösungen werden bei -20 °C für maximal ein Jahr lichtgeschützt gelagert. Beide Farbstoffe sind in der Lage die Nukleinsäuren der Bakterien nachzuweisen. Sie unterscheiden sich in ihrer Eigenschaft die bakterielle Membran zu penetrieren. STYO 9 kann intakte und beschädigte Membranen von Bakterien durchdringen, Propidiumiodid lediglich beschädigte Membranen. Propidiumiodid verdrängt STYO 9 in Zellen, in denen beide Substanzen präsent sind. Daher fluoreszieren Bakterien mit beschädigter Membran rot, solche mit intakter Membran grün.

Jeweils 1 µl beider Farbstofflösungen wurden in 1000 µl 0,9 %iger NaCl-Lösung in ein lichtgeschütztes Eppi-Gefäß pipettiert. Anschließend wurde die Färbelösung mit einem Vortex-Gerät vermischt. Die Lösung ist bei 4 °C einen Monat haltbar. Der PK wurde mit 15 µl Färbelösung vollständig bedeckt und für 10 min lichtgeschützt inkubiert. Danach wurde der PK in drei Mulden mit 0,9 %iger NaCl-Lösung geschwenkt, um die restliche Färbelösung zu entfernen. Der PK wurde dann mit einem fusselfreiem Tuch vorsichtig getrocknet. Mit einem Putty-Silikon (Optosil® Comfort® Putty, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) wurde eine Kugel geformt und auf einem Objektträger platziert. Der PK wurde vorsichtig eingelassen, sodass die Ränder des PK gefasst waren und ein Deckglas die Oberfläche nicht berühren würde. Dann wurde die Schmelzfläche des PK mit 10 µl Mounting-Öl benetzt und das Deckglas aufgesetzt. Die Oberfläche des PK wurde parallel zur Fläche des Objektträgers ausgerichtet, damit ein Mikroskopieren mit nahezu gleichem Fokus möglich ist.

Mikroskopiert wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager.M2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland). Zunächst wurde in 20-facher Vergrößerung die Markierung aufgesucht, dann wurde auf eine 1000-fache Vergrößerung gewechselt. Mit einem Fluoresceindiacetat-Filter wird STYO 9 angeregt, welches dann grünes Licht mit einer Wellenlänge von 500 nm emittiert. Propidiumiodid emittiert bei 635 nm rotes Licht, mit Hilfe eines Ethidiumbromid-Filter. So entstehen zunächst zwei verschiedene Bilder in Graustufen mit der Mikroskop-Kamera (AxioCam MRm, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland), welche dann in einer Software zusammengefügt werden (Axio Vision SE64, Rel. 4.9.1, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland). Daraus entsteht ein fertiges, farbiges Bild, das tote

Bakterien in rot und lebende Bakterien in grün zeigt. Zeitgleich wurde der zweite PK inkubiert und im Anschluss mikroskopiert. Danach wurde alles im Gefahrstoffabfall entsorgt.

3.5.1 LIVE/DEAD® Auswertung

Die gewonnenen Bilder wurden anschließend mittels Software analysiert. Je sechs Bilder pro PK, damit insgesamt zwölf Bilder pro Proband und Versuch. Untersucht wurde sowohl die Bedeckung der Prüfkörper als auch die Vitalität der Bakterien. Die Auswertung erfolgte durch eine Person. Für die Auswertung wurde ein Monitor (ASUS® TUF VG27AQ, WQHD, Taipeh, Taiwan) mit einer Auflösung von 2560 x 1440 im HDR-Modus verwendet. Es wurde in einem verdunkelten Raum bei gerader Sicht auf den Monitor ausgewertet.

Die Auswertung der Bedeckung wurde mit dem Programm ImageJ (ImageJ 1.53, NIH, Bethesda, Maryland, USA) durchgeführt. Die Fläche, die mit Bakterien bedeckt war, wurde manuell ausgewählt und im Verhältnis zur Gesamtfläche betrachtet. Dabei wurden die einzelnen Pixel des Bildes als bedeckt oder nicht bedeckt gezählt. Der so erhaltene Wert war die Anzahl der Pixel, die mit Bakterien bedeckt waren, und wurde in das Verhältnis zur Gesamtfläche gesetzt. Das Ergebnis ist ein Prozentwert.

Die Vitalität wurde mit dem Programm MATLAB® (MATLAB® R2021b, The MathWorks®, Natick, Massachusetts, USA) und dem Zusatzprogramm Viability (Hendrik Hähl, AG Jacobs, Experimentalphysik, Universität des Saarlandes, Homburg, Deutschland) ausgewertet. Die Bilder wurden in einem grünen Kanal und in einem roten Kanal getrennt dargestellt. Zunächst wurden die Untersuchungsparameter festgelegt, da es unter anderem zu Überlagerungsartefakten kommt, welche als orangene Objekte dargestellt werden. Eingestellt wurde ein Verhältnis von 50 % zu 50 % für überlappende Objekte. Das bedeutet 50 % der orangenen Objekte im grünen Kanal werden als rot interpretiert, sowie 50 % der orangenen im roten Kanal als grün. Eine Fraktion von 2,5 % wurde als nicht eindeutig, damit als Abweichung, einberechnet. Der Objektradius wurde auf den Standardeinstellungen von minimal 2 bis maximal 10 Pixel belassen. Nun wurde manuell die Fläche ausgewählt, die mit Bakterien bedeckt ist. Dies wurde für den grünen und roten Kanal aller Bilder eines PK durchgeführt. Anschließend wurden die Bilder ausgewertet. Dabei wird in der definierten Fläche jedes grüne (lebende) und rote (tote) Bakterium gezählt. Das Verhältnis von lebenden Bakterien zur Gesamtzahl ist die Vitalität und wird als Prozentwert angegeben. Die Werte wurden auf die zweite Dezimalstelle gerundet.

3.6 Transmissionselektronenmikroskopie

Für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde je ein PK links und rechts der Schiene entnommen. Dies waren die P 4000 PK. Nach Reinigung der PK mit sterilem Wasser wurden die Dentinschicht des PK mit einem Bleistift markiert. Dann wurden die PK jeweils in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß gegeben. In diesen befand sich jeweils 1 ml einer TEM-Fixierlösung, welche sich aus 1 % Glutaraldehyd (Glutaraldehyd, 50 % Lösung in Wasser, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland), 1 % Paraformaldehyd (Paraformaldehyd, reinst., pulverförmig, Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) und 0,1 M Cacodylatpuffer (Cacodylatsäure Natriumsalz Trihydrat, Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) zusammensetzt. Die Gefäße wurden bei 4 °C für mindestens 24 h gelagert, bevor sie weiterverwendet wurden. Die PK wurden dann mit 1 %iger Osmiumsäure nachfixiert und kontrastiert. Anschließend wurden, in aufsteigender Reihenfolge von 50 % bis 100 % Aceton, die PK entwässert. Die Proben wurde über Nacht in einem Gemisch eingelagert, bestehend aus: Aceton, 2-Dodecenyldbernsteinsäureanhydrid (DDSA) (Agar Scientific Ltd, Essex, United Kingdom), 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (SERVA Electrophoreses GmbH, Heidelberg, Deutschland) und Araldit CY212 (Agar Scientific Ltd, Essex, United Kingdom). Dann wurden die PK in diesem Gemisch umgesetzt, in ein Araldit-Gemisch ohne Aceton gegeben und schließlich in Araldit eingebettet. Das Araldit wurde bei 65 °C für zwei Tage im Brutschrank polymerisiert.

Die Araldit-Blöcke wurde getrimmt und poliert. Bei Erreichen der zu untersuchenden Oberfläche wurde auf ein Ultramikrotom (Ultracut Leica EM UC7, Wetzlar, Deutschland) gewechselt. Mit einem Diamantmesser wurden Ultradünnschnitte von circa 65 nm Dicke hergestellt. Diese wurden auf ein Kupfer-Netz mit Piloform (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) aufgezogen. Mit UranyLess (Delta Microscopies, Mauressac, Frankreich) und Bleicitrat (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde eine Negativkontrastierung durchgeführt. Unter 1000 bis 98000-fachen Vergrößerungen wurden die Proben mit einem TEM-Mikroskop (Tecnai 12, FEI, Eindhoven, Niederlande) untersucht. Zur Beurteilung der Biofilmdicke, Struktur und Pellikel-Schicht wurde mit dem Programm iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions, Olympus, Tokio, Japan) von verschiedenen Abschnitten Bilder erstellt. Diese wurden dann hinsichtlich ihrer Ultrastruktur, Elektronendichte, Biofilm und Besonderheiten ausgewertet.

3.7 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die PK für die REM-Analyse wurden zunächst in 1 ml einer Fixierlösung für mindestens 1 h bei 4 °C fixiert. Die Lösung bestand aus 2 %igem Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer. Die PK wurden danach in drei Schritten für je 10 min in 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Ausgehend von 50 % (Ethanol \geq 99,8 %, vergällt, Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) bis hin zu 100 % unvergälltem Ethanol (Ethanol \geq 99,5 %, Ph. Eur. reinst., Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland). Alle Arbeiten wurden bei Raumtemperatur unter einem Abzug durchgeführt. Anschließend wurde der PK über Nacht im Abzug an der Luft getrocknet. Die PK wurden auf einem tellerförmigen Probenträger mit der nicht zu untersuchenden Dentinseite aufgeklebt. Mit Hilfe eines Sputter-Geräts (Sputter Coater SCD 040, Oerlikon Balzers Coating Germany GmbH, Bingen, Deutschland) wurden die PK mit Gold beschichtet und leitfähig gemacht.

In einem Rasterelektronenmikroskop (XL 30 ESEM FEG, FEI Company, Eindhoven, Niederlande) wurde von charakteristischen Oberflächenabschnitten in den Vergrößerungen von 25 bis 20000-fach Bildaufnahmen angefertigt. Die Bilder wurden hinsichtlich ihrer Biofilmbedeckung, Struktur, Oberflächenveränderungen und Besonderheiten ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 LIVE/DEAD® - Bedeckung

4.1.1 Versuchsreihe I – Alle Probanden

In der ersten Versuchsreihe durchliefen alle Probanden die Negativ- und Positivkontrolle sowie die Versuche 1-3 (Abb. 2). Die Ergebnisse der Probanden wurden anhand der Bilder ausgewertet und für jeden Versuch zusammengetragen. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse aller sechs Bilder der rechten und linken Seite zusammengenommen und daraus der Mittelwert gebildet. Dieser repräsentiert das Ergebnis eines Probanden.

Kontroll-Spüllösungen

Die Negativkontrolle zeigt nach Spülung mit sterilem Wasser eine Bedeckung von 60-97 % bei Betrachtung aller vier Probanden. Daraus ergibt sich ein Mittelwert von 68 % für diesen Versuch. Die Unterschiede zwischen den Probanden sind mit zum Teil 30 % recht hoch. Bei der Positivkontrolle mit CHX 0,2 % zeigt sich ausnahmslos eine signifikant reduzierte Bedeckung gegenüber der Kontrolle mit Wasser. Der Mittelwert liegt bei 6 %, wobei Proband 3 mit 16 % den Höchstwert bildet und Proband 4 mit 0,4 % den niedrigsten Wert bildet (Abb. 3). Charakteristische Bilder sind in Abb. 9 gezeigt.

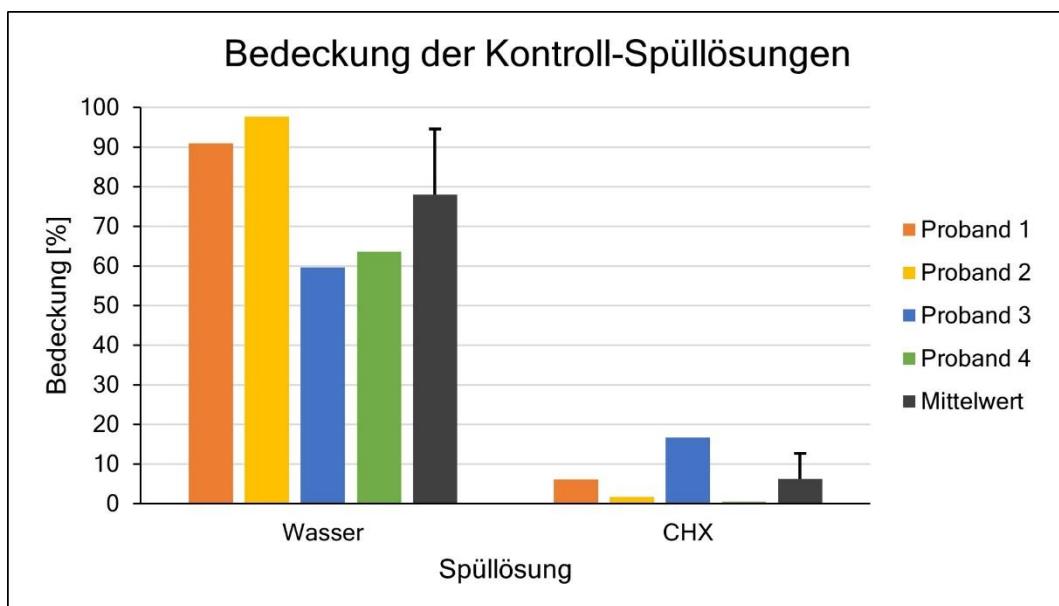


Abb. 3: Bakterielle Bedeckung in [%] aller PK eines Probanden für den Spülversuch mit sterilem Wasser und CHX. Die Balken stellen das Ergebnis der Bildanalyse eines Probanden dar. Der Mittelwert setzt sich aus den Werten der vier Probanden zusammen. Nach 48 h Biofilm Bildung *in-situ*, wurden die PK *ex-vivo* mittels FM untersucht. Die Bedeckung wurde mit ImageJ ausgewertet. Die aufgesetzten Linien zeigen die \pm Standardabweichungen. CHX = Chlorhexidin.

Spülversuch 1: Natriumfluorid 500 ppm F⁻

Die Spülösung mit Natriumfluorid zeigt besonders bei Proband 2 eine größere Abweichung im Vergleich zu den anderen Probanden. Der Mittelwert beträgt 46 %. Proband 2 hat eine Bedeckung von 95 %, die anderen zeigen eine Bedeckung zwischen 20 % und 38 % (Abb. 4). Charakteristische Aufnahmen sind in Abb. 10 gezeigt.

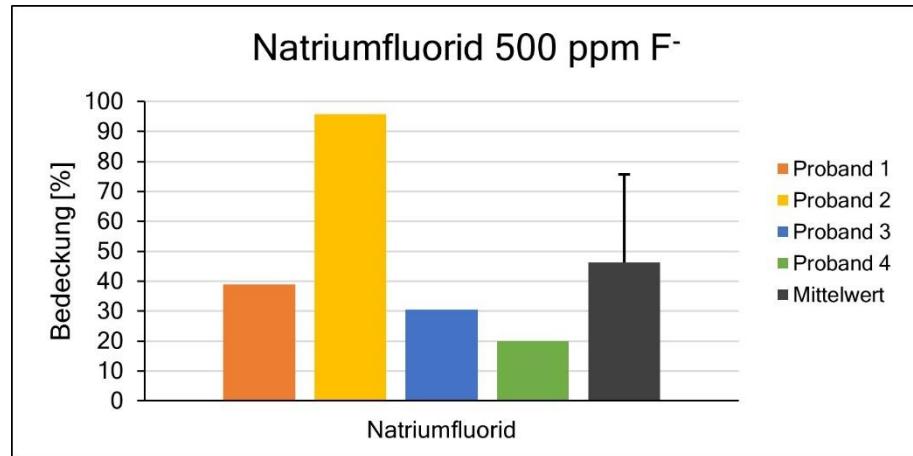


Abb. 4: Bakterielle Bedeckung in [%] aller PK eines Probanden für den Spülversuch mit Natriumfluorid. Der Mittelwert setzt sich aus den Werten der vier Probanden zusammen. Die Auswertung erfolgte mit ImageJ nach 48 h Biofilmbildung. Die aufgesetzte Linie zeigt die \pm Standardabweichung. Proband 2 zeigt einen besonders hohen Bedeckungswert.

Spülversuch 2: Tanninsäure 5 %

Bei der Spülung mit Tanninsäure zeigt sich eine signifikante Reduktion der Bedeckung gegenüber der Negativkontrolle. Der Mittelwert liegt bei 25 %, wobei Proband 3 mit 48 % die größte Abweichung aufweist. Die Bedeckung aller Proband liegt zwischen 6 % und 48 % (Abb. 5). Repräsentative Aufnahmen sind in Abb. 10 gezeigt.

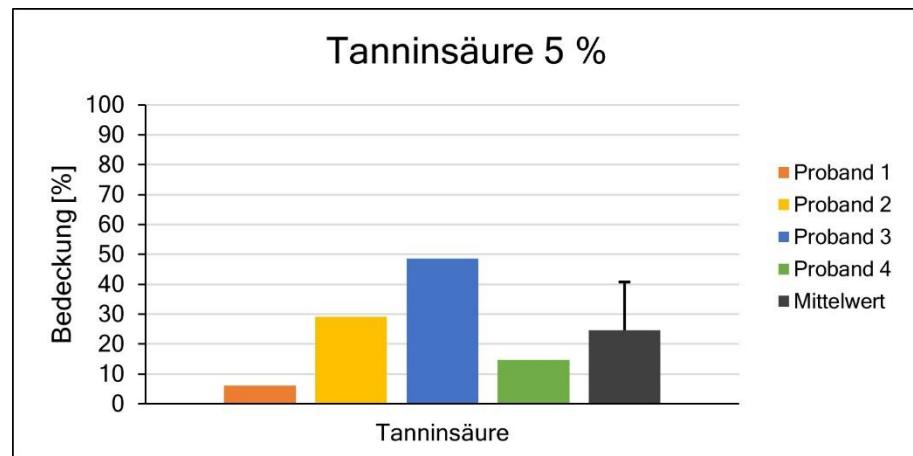


Abb. 5: Bakterielle Bedeckung in [%] aller PK eines Probanden für den Spülversuch mit Tanninsäure. Der Mittelwert setzt sich aus den Werten der vier Probanden zusammen. Die Auswertung erfolgte mit ImageJ nach 48 h Biofilmbildung. Die aufgesetzte Linie zeigt die \pm Standardabweichung. Proband 3 zeigt die größte Abweichung vom Mittelwert.

Spülversuch 3: Tanninsäure 5 % + Natriumfluorid 500 ppm F-

Der Spülversuch zeigt bei allen Probanden ein ähnliches Ergebnis. Die Bedeckung liegt zwischen 5-15 % und der Mittelwert bei 10 % (Abb. 6). Damit sind die Werte gegenüber der Negativkontrolle signifikant geringer. Die Kombinationsspüllösung zeigt auch eine geringere Bedeckung im Vergleich zu den anderen beiden Spüllösungen. Verglichen mit dem CHX Versuch liegen die Werte dennoch höher. Aufnahmen sind in Abb. 10 gezeigt.

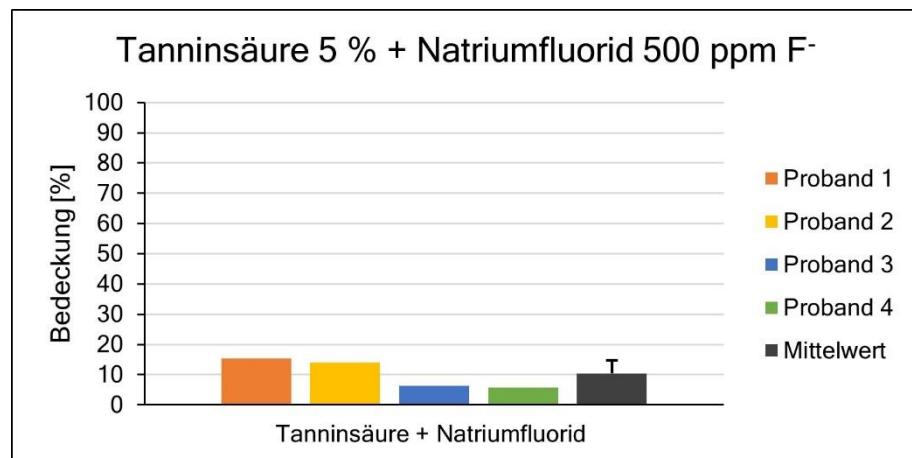


Abb. 6: Bakterielle Bedeckung in [%] aller PK der Probanden für den Kombinationsspülversuch mit Tanninsäure + Natriumfluorid. Der Mittelwert wird durch den Wert der einzelnen Probanden gebildet. Bedeckung nach 48 h Biofilmbildung und Spülprotokoll. Die Auswertung erfolgte mit ImageJ. Die aufgesetzte Linie zeigt die \pm Standardabweichung.

4.1.2 Versuchsreihe II – Zwei Probanden

In dieser zweiten Versuchsreihe durchliefen der Proband 2 und Proband 4 zwei zusätzliche Spülversuche. Das grundlegende Spülprotokoll blieb dabei unverändert. Die Auswertung erfolgte ebenfalls exakt wie in der ersten Versuchsreihe. Zunächst erfolgte ein Versuch mit Phosphatpuffer und anschließend mit Phosphat-gepufferter 5 %iger Tanninsäure (Abb. 2).

Spülversuch 4: Phosphatpuffer 150 mM

Der Spülversuch mit 150 mM konzentriertem Phosphatpuffer zeigt bei beiden Probanden eine hohe Bedeckung von 81 % bzw. 83 %. Der Mittelwert liegt bei 82 % (Abb. 7). Der Versuch zeigt somit ähnliche Ergebnisse wie die Negativkontrolle. Repräsentative Aufnahmen sind in Abb. 9 gezeigt.

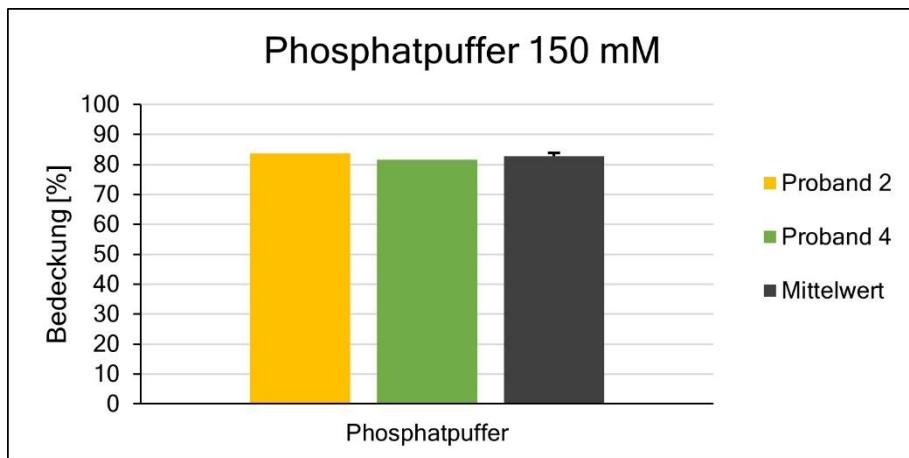


Abb. 7: Bakterielle Bedeckung in [%] aller PK der beiden Probanden für den Spülversuch mit Phosphatpuffer. Der gezeigte Mittelwert setzt sich aus den Ergebnissen der Probanden zusammen. Auswertung nach 48 h Biofilmbildung und Spülprotokoll. Die Auswertung erfolgte mit ImageJ. Die aufgesetzte Linie zeigt die \pm Standardabweichung.

Spülversuch 5: Tanninsäure 5 % + Phosphatpuffer 150 mM

Die Spülung mit Phosphat-gepufferter 5 %iger Tanninsäure zeigt eine deutliche Reduktion der Bedeckung beider Probanden verglichen mit reinen Phosphatpuffer. Die Probanden haben eine Bedeckung von 13 % - 35 % (Abb. 8). Der Mittelwert von 24 % liegt zudem höher als der der CHX Positivkontrolle. Bilder sind in Abb. 10 gezeigt.

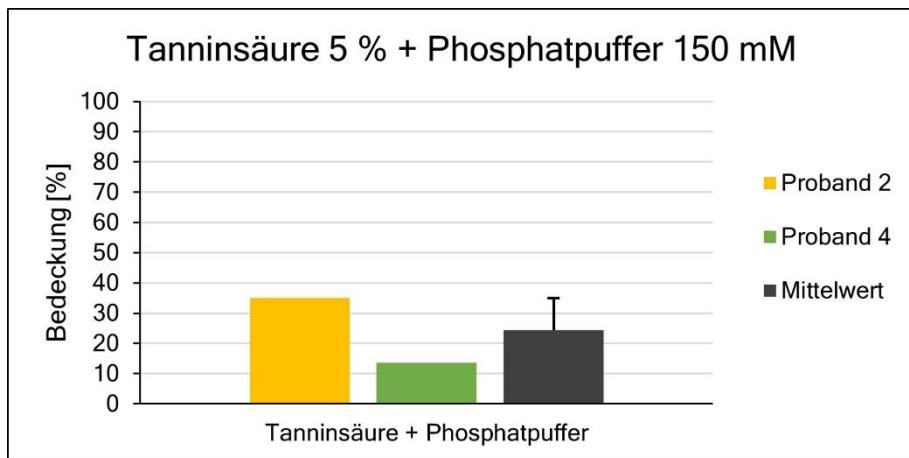


Abb. 8: Bakterielle Bedeckung in [%] aller PK der beiden Probanden für den Spülversuch mit Phosphat-gepufferter Tanninsäure. Der Mittelwert setzt sich aus den Ergebnissen der Probanden zusammen. Auswertung nach 48 h Biofilmbildung und Spülprotokoll. Die Auswertung erfolgte mit ImageJ. Die aufgesetzte Linie zeigt die \pm Standardabweichung.

4.2 LIVE/DEAD® - Bilder

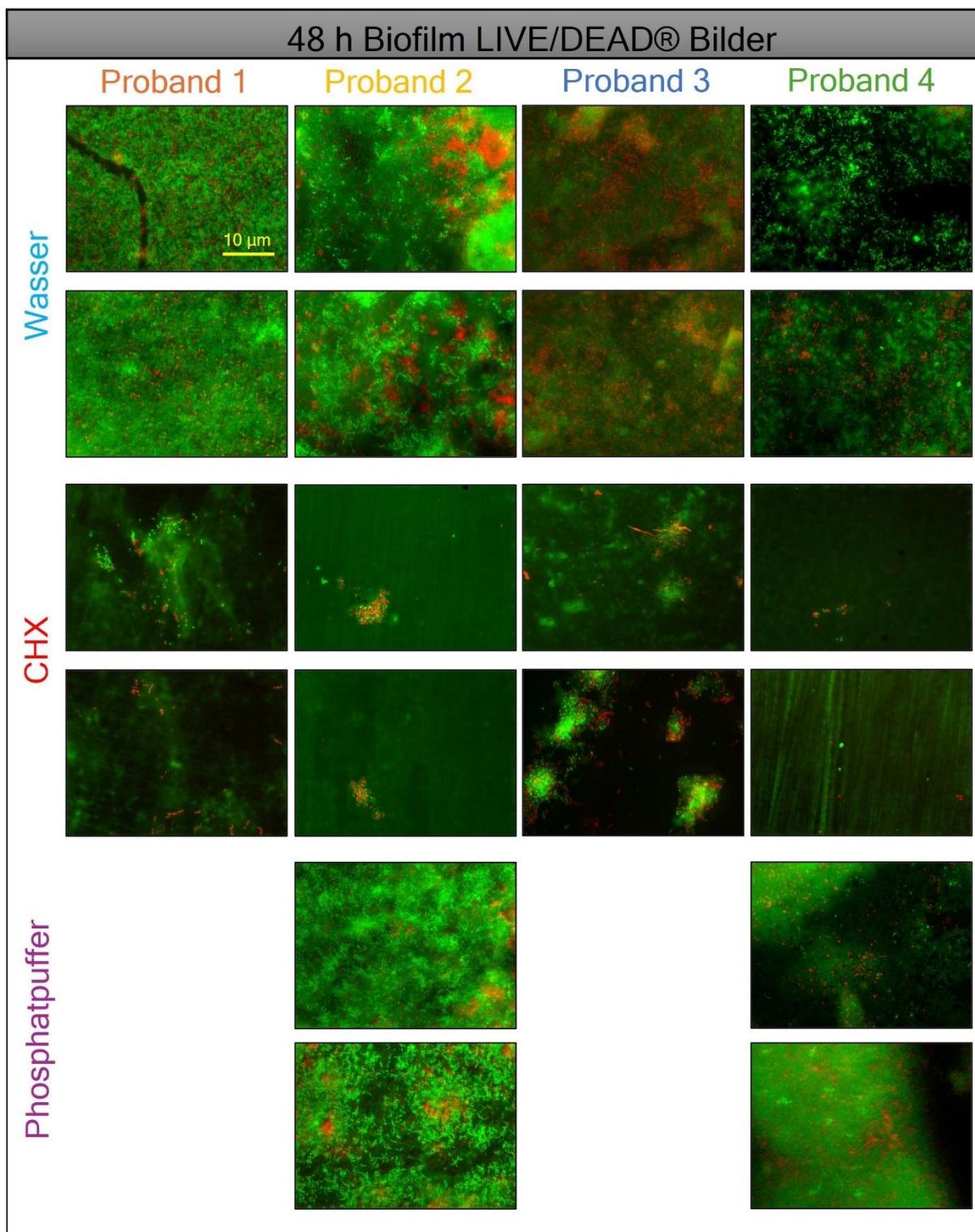


Abb. 9: Charakteristische LIVE/DEAD® Bilder. Für jeden Probanden ist jeweils ein Bild der rechten (oben) und linken (unten) Seite gezeigt. Die Spülung erfolgte gemäß Spülprotokoll und die PK wurden nach 48 h mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Tote Bakterien sind in rot, lebende in grün dargestellt. Die Bilder repräsentieren die Effekte der gezeigten Spüllösungen auf den *in-situ* gebildeten Biofilm. Die beiden Bilder des Wasser Spülversuches von Proband 3 wurden, zur besseren Sichtbarkeit, in der Helligkeit angepasst. CHX = Chlorhexidin.

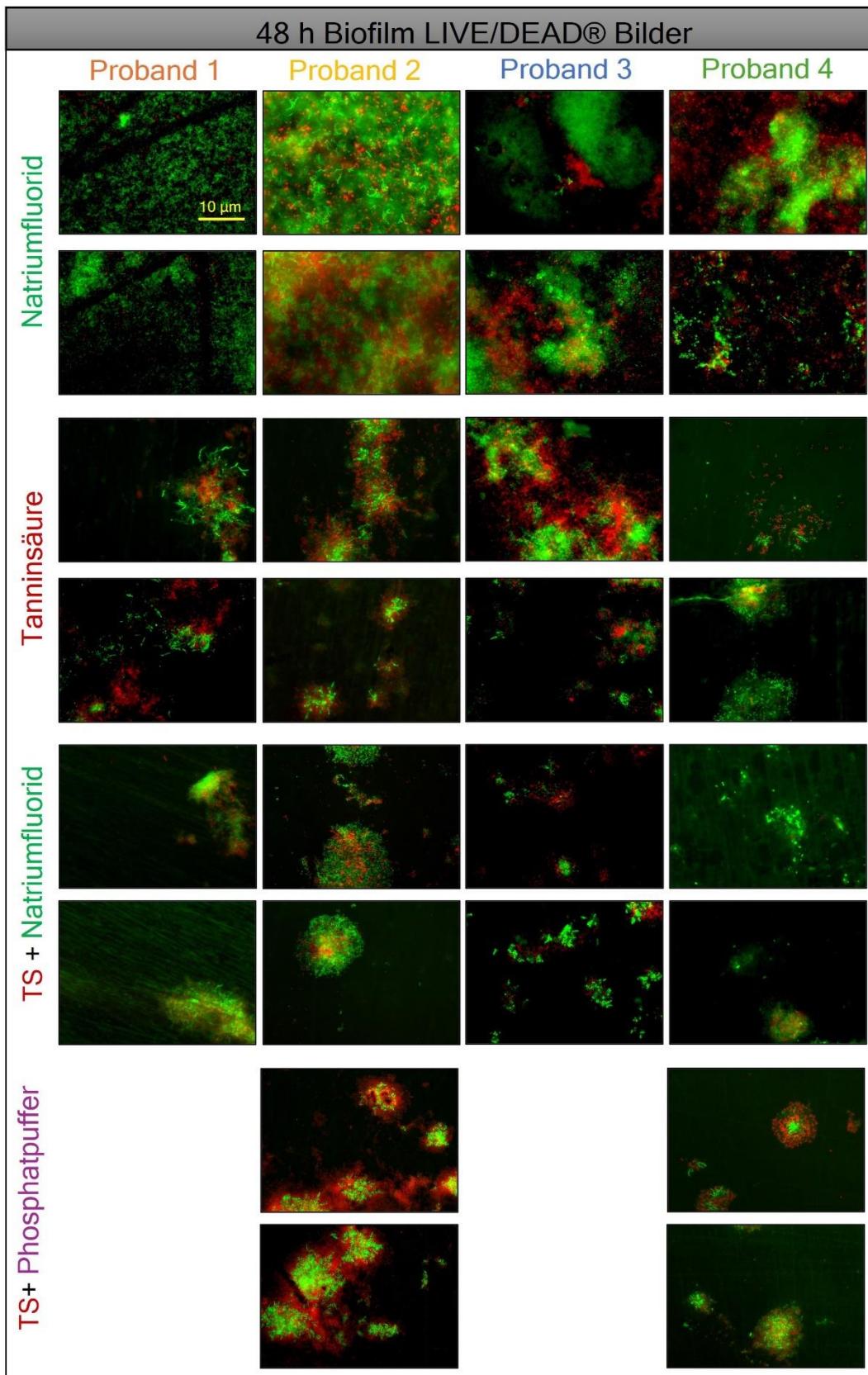


Abb. 10: Bilder der LIVE/DEAD®-Analyse. Für jeden Probanden ist ein Bild der rechten (oben) und linken (unten) Seite gezeigt. Die Spülung erfolgte gemäß Spülprotokoll, die PK wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Tote Bakterien sind in rot, lebende Bakterien in grün dargestellt. Die Bilder repräsentieren die Effekte der Spüllösungen auf den 48 h *in-situ* gebildeten Biofilm. TS = Tanninsäure.

4.3 LIVE/DEAD® - Vitalität

4.3.1 Versuchsreihe I – Alle Probanden

Der Versuchsablauf ist wie bereits in Punkt 4.1.1 beschrieben durchgeführt worden. Die Bilder wurden mit dem Viability-Tool in MATLAB® hinsichtlich der Vitalität des Biofilms untersucht. Die Ergebnisse werden nachfolgend als Diagramme dargestellt.

Kontrollspülösungen

Die Negativkontrolle zeigt im Mittel eine Vitalität von 63 %. Die Probanden zeigen eine Vitalität von 47 % - 79 % und damit ist die mittlere Abweichung circa 15 % vom Mittelwert. Die Spülung mit CHX 0,2 % zeigt bei den Probanden 1 und 3 eine Vitalität von 58 % bzw. 60 %. Bei den Probanden 2 und 4 hingegen nur 32 % bzw. 23 %. Der Mittelwert liegt bei 44 % (Abb. 11). Die Abweichung der Probanden voneinander ist somit recht hoch. Repräsentative Aufnahmen sind in Abb. 9 gezeigt.

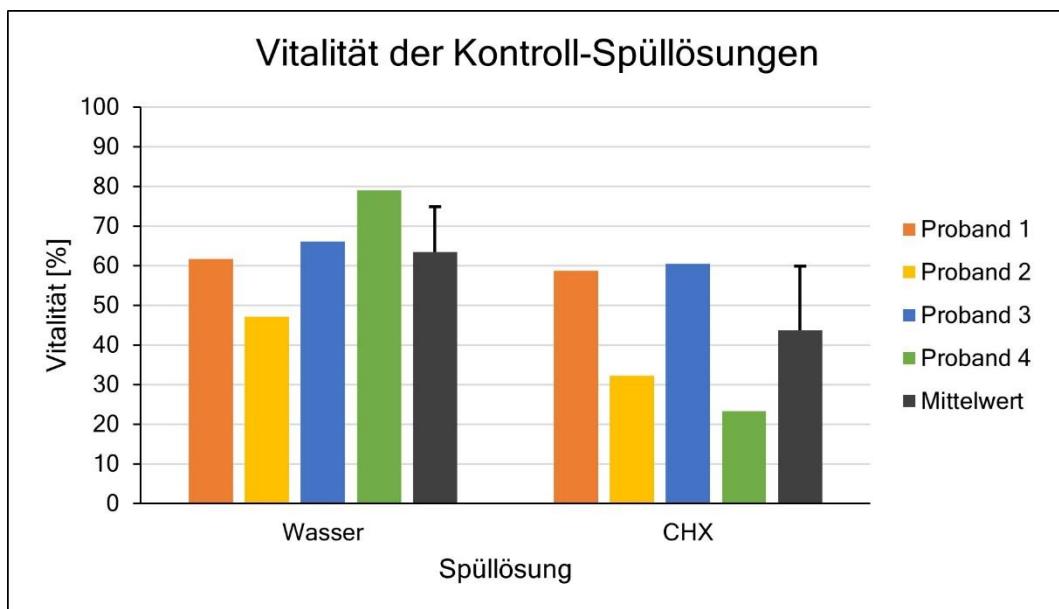


Abb. 11: Vitalität in [%] für alle PK eines Probanden. Dargestellt als Balkendiagramm. Der Mittelwert setzt sich aus den Einzelwerten der Probanden zusammen. Es sind die Ergebnisse für den Spülversuch mit sterilem Wasser und CHX gezeigt. Auswertung nach 48 h Biofilmbildung und Spülprotokoll. Die Auswertung erfolgte mit MATLAB®. Die aufgesetzten Linien zeigen die \pm Standardabweichungen. CHX = Chlorhexidin.

Spülversuch 1: Natriumfluorid 500 ppm F⁻

Der Biofilm der Probanden hat eine Vitalität von 40 % - 71 % (Abb. 12). Der Mittelwert liegt in diesem Versuch bei 58 % und damit nur 5 % unter dem Mittelwert der Negativkontrolle (Abb. 11). Proband 4 zeigt die größte Abweichung vom Mittelwert. Charakteristische Bilder sind in Abb. 10 gezeigt.

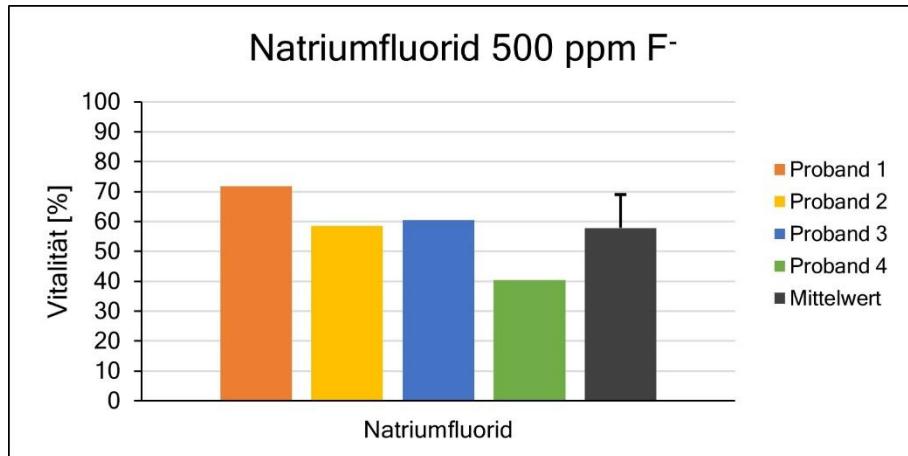


Abb. 12: Vitalität in [%] aller PK der vier Probanden für den Spülversuch mit Natriumfluorid. Dargestellt als Balkendiagramm. Der Mittelwert setzt sich aus den Einzelwerten der Probanden zusammen. Auswertung nach 48 h Biofilmbildung und Spülprotokoll. Die Auswertung erfolgte mit MATLAB®. Die aufgesetzte Linie zeigt die \pm Standardabweichung.

Spülversuch 2: Tanninsäure 5 %

Der Mittelwert der Vitalität für diesen Versuch liegt bei 45 %. Die Probanden zeigen einen Wert von 30 % bis 65 %. Proband 2 zeigt die größte Abweichung nach unten gegenüber den anderen. Proband 1 hat die größte Abweichung nach oben (Abb. 13). Repräsentative Bilder sind in Abb. 10 gezeigt.

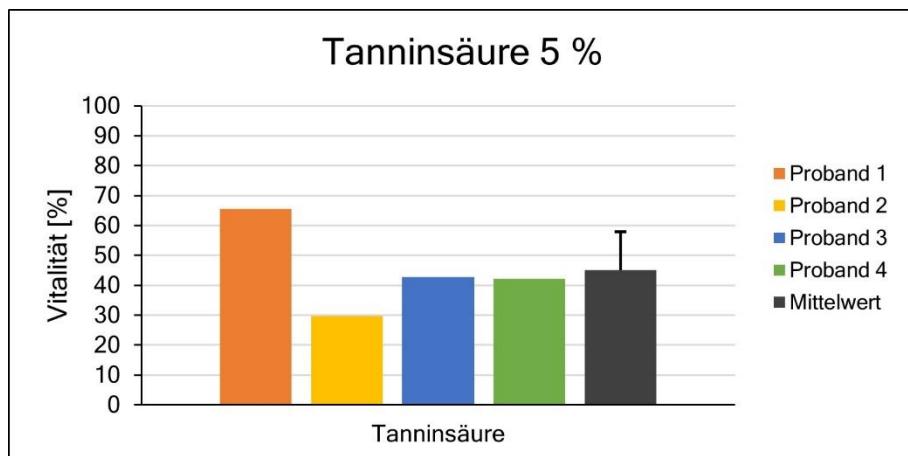


Abb. 13: Vitalität in [%] aller PK der vier Probanden für den Spülversuch mit Tanninsäure. Dargestellt als Balkendiagramm. Der Mittelwert setzt sich aus den Einzelwerten der Probanden zusammen. Auswertung nach 48 h Biofilmbildung und Spülprotokoll. Die Auswertung erfolgte mit MATLAB®. Die aufgesetzte Linie zeigt die \pm Standardabweichung.

Spülversuch 3: Tanninsäure 5 % + Natriumfluorid 500 ppm F⁻

Die Probanden zeigen eine Vitalität von 21 % bis 58 %. Der Mittelwert liegt für diesen Versuch bei 44 %. Proband 1 weicht hierbei mit 21 % Vitalität des Biofilms stark von den anderen Probanden ab (Abb. 14). Charakteristische Bilder sind in Abb. 10 gezeigt.

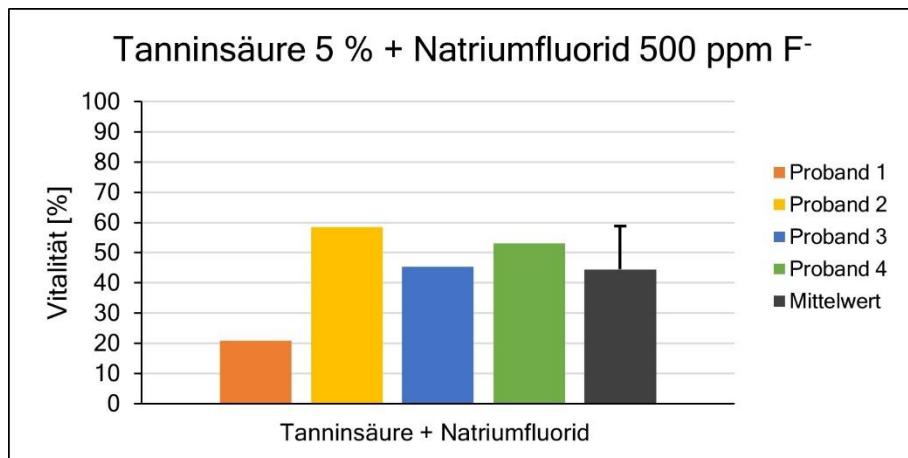


Abb. 14: Vitalität in [%] aller PK der vier Probanden für den Spülversuch mit Tanninsäure und Natriumfluorid als Kombination. Dargestellt als Balkendiagramm. Der Mittelwert setzt sich aus den Einzelwerten der Probanden zusammen. Auswertung erfolgte nach 48 h Biofilmbildung und mit MATLAB®. Die aufgesetzte Linie zeigt die \pm Standardabweichung.

4.3.2 Versuchsreihe II – Zwei Probanden

Der Versuchsaufbau gleicht dem Versuch wie in Punkt 4.1.2 bereits beschrieben, wobei die Auswertung der Vitalität des Biofilms mit MATLAB® erfolgte. Dargestellt sind die Ergebnisse als Balkendiagramme.

Spülversuch 4: Phosphatpuffer 150 mM

Die beiden Probanden zeigen einen Wert von 47 % bzw. 64 %. Der Mittelwert liegt bei 55 % (Abb. 15). Beide Probanden zeigen vergleichbare Ergebnisse wie im Spülversuch mit steriles Wasser (Abb. 11). Repräsentative Bilder dieses Versuches sind in Abb. 9 gezeigt.

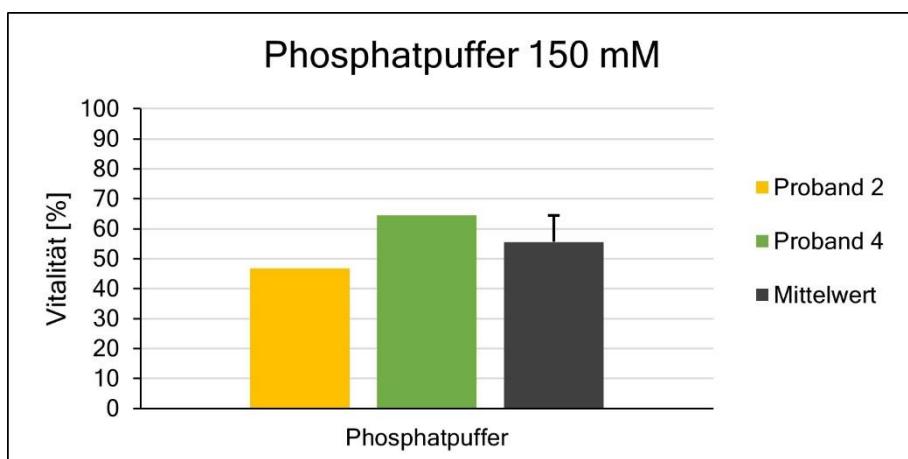


Abb. 15: Vitalität in [%] aller PK der zwei Probanden für den Spülversuch mit Phosphatpuffer. Dargestellt als Balkendiagramm. Der Mittelwert setzt sich aus den Einzelwerten der Probanden zusammen. Auswertung nach 48 h Biofilmbildung und Spülprotokoll. Die Auswertung erfolgte mit MATLAB®. Die aufgesetzte Linie zeigt die \pm Standardabweichung.

Spülversuch 5: Tanninsäure 5 % + Phosphatpuffer 150 mM

Beide Probanden zeigen für diesen Versuch ein nahezu identisches Ergebnis. Der Biofilm von Proband 1 hat eine Vitalität von 28 %, Proband 2 von 30 %. Der Mittelwert liegt bei 29 % (Abb. 16). Aufnahmen für diesen Spülversuch sind in Abb. 10 gezeigt.

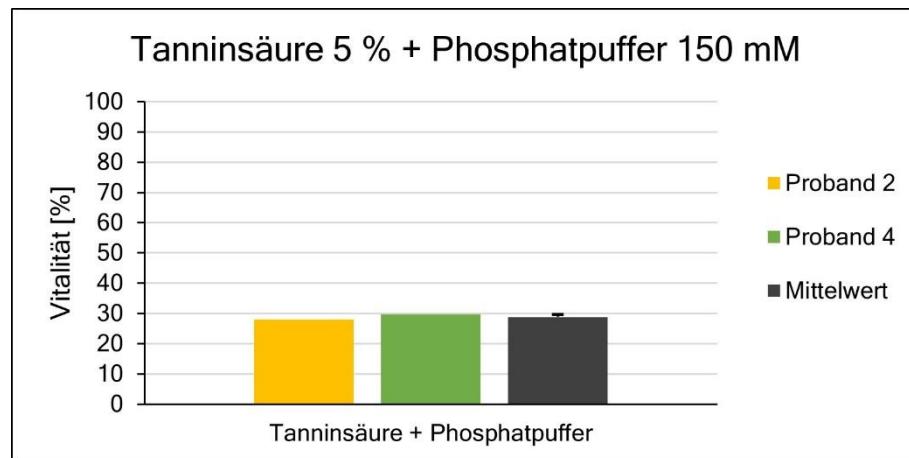


Abb. 16: Vitalität in [%] aller PK der zwei Probanden für den Spülversuch mit Phosphat-gepufferter Tanninsäure. Dargestellt als Balkendiagramm. Der Mittelwert setzt sich aus den Einzelwerten der Probanden zusammen. Auswertung nach 48 h Biofilmbildung. Die Auswertung erfolgte mit MATLAB®. Die aufgesetzte Linie zeigt die \pm Standardabweichung.

4.4 LIVE/DEAD® - Vergleich

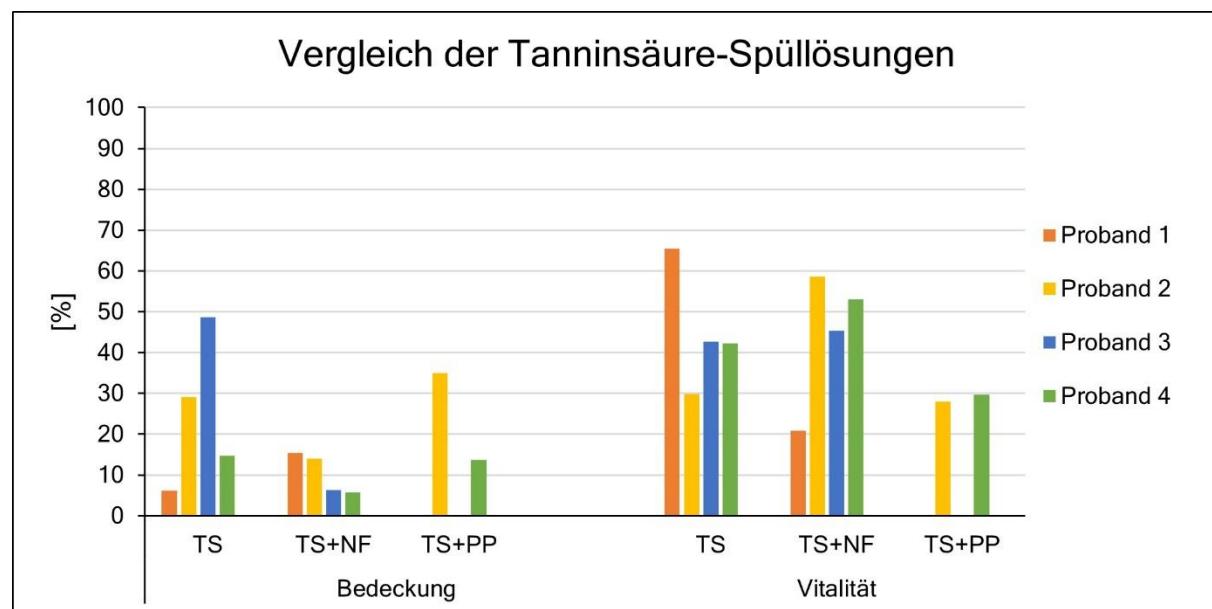


Abb. 17: Bedeckung und Vitalität in [%] der Spülversuche mit Tanninsäure, dargestellt als Säulendiagramm. Für jeden Probanden wurde aus allen PK der Wert für Bedeckung (linke Seite) und Vitalität (rechte Seite) ermittelt. Analyse nach 48 h *in-situ* Biofilmbildung und anschließender Auswertung mit ImageJ für die Bedeckung und MATLAB® für die Vitalität. TS = Tanninsäure 5 %, TS+NF = Tanninsäure 5 % + Natriumfluorid 500 ppm F⁻, TS+PP = Tanninsäure 5 % + Phosphatpuffer 150 mM. Entsprechende Bilder sind in Abb. 10 gezeigt.

4.5 Rasterelektronenmikroskopie

Die untersuchten PK zeigen überwiegend eine Besiedlung durch kokkenförmige Bakterien, die sich als kurze, zum Teil runde Strukturen auf den Bildern darstellen. Vereinzelt sind stäbchenförmige Bakterien zu entdecken. Es zeigen sich Anhäufungen von Bakterien in Nestern und größeren Kolonien, die von unbedeckter Schmelzoberfläche unterbrochen sind. Gelegentlich sind Pellikel-Aggregate zu erkennen. In großen Vergrößerungen zeigen sich die Zellausläufer (Fimbrien) der Bakterien. Zwischen manchen Kolonien und Bakterien sind Hohlräume und eine Schichtungsstruktur zu erkennen (Abb. 18).

Der Spülversuch mit Wasser zeigt eine vollständige Bedeckung mit Bakterien und nur vereinzelte Areale, die bakterienfrei sind (Abb. 18). Der CHX-Versuch zeigt kaum Bakterien auf dem PK, der Biofilm hat keine eindeutige Struktur und die Pellikel-Schicht ist verändert (Abb. 19). Natriumfluorid zeigt ähnliche Ergebnisse wie der Spülversuch mit Wasser (Abb. 20). Proband 1 zeigte hier selektiv gegenteilige Ergebnisse. Der Versuch mit 5 %iger Tanninsäure zeigt überwiegend bakterienfreie PK. Zum Teil weisen diese unstrukturierten Aggregate tiefe Furchen auf. Es ist keine klare Biofilm-Struktur erkennbar (Abb. 21). Die Spülösung-Kombination aus Tanninsäure und Natriumfluorid zeigt nur wenige mit Bakterien besiedelte Areale. Die wenigen Nester zeigen intakte Bakterien, teilweise in Furchen eingebettet. Die Biofilmstruktur kann erahnt werden, ist jedoch nicht klar strukturiert. Einzelne Bakterien lassen sich nicht unterscheiden (Abb. 22). Verglichen mit dem Spülversuch der Tanninsäure sind größere Bakterienansammlungen und Ansätze des Biofilms zu erkennen. Der Versuch mit Phosphatpuffer zeigt eine fast vollständige Bedeckung und vollständig intakten Biofilm bzw. Bakterien. Es lässt sich eine Schichtung des Biofilms erkennen und zwischen den Bakterien sind Hohlräume zu entdecken (Abb. 23).

Tanninsäure und Phosphatpuffer in Kombination zeigt PK mit größeren Kolonien und kleineren Nestern. Verglichen mit reiner Tanninsäure oder Tanninsäure und Natriumfluorid nehmen die Kolonien größere Areale ein. Dennoch ist der Großteil des PK frei von Bakterien. Innerhalb der Kolonien sind die Bakterien intakt und zeigen eine klare Strukturierung. Daneben sind Areale von homogenen, formlosen Aggregaten zu finden (Abb. 24).

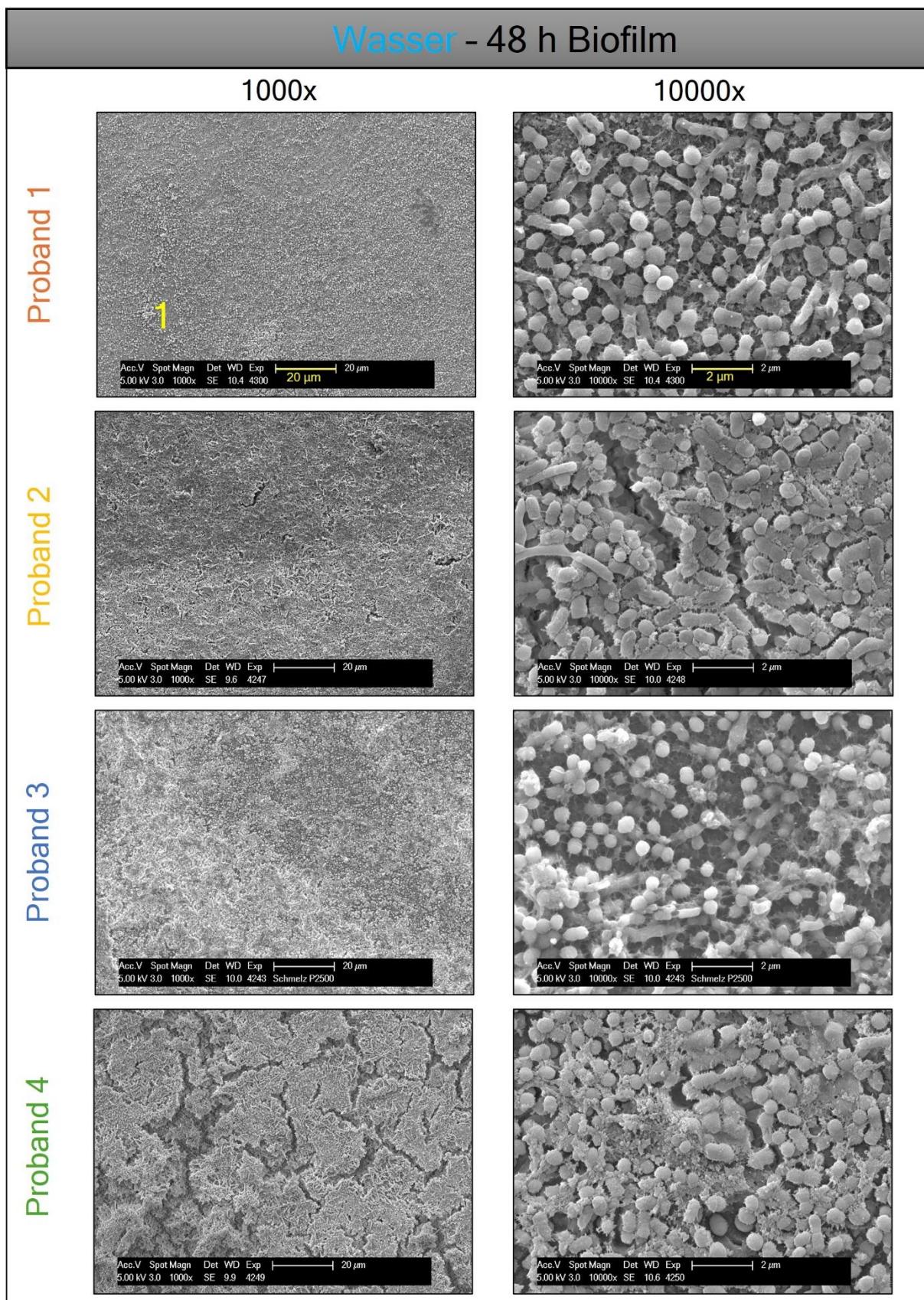


Abb. 18: Aufnahmen der PK mit dem REM in den Vergrößerungen 1000-fach und 10000-fach. Für jeden der 4 Probanden sind jeweils zwei Bilder gezeigt. Die Bakterien haben eine intakte Struktur und sind vollständig bedeckt. Teilweise in mehreren Schichten angeordnet. Nur ganz wenige Areale (1) sind frei von Bakterien.

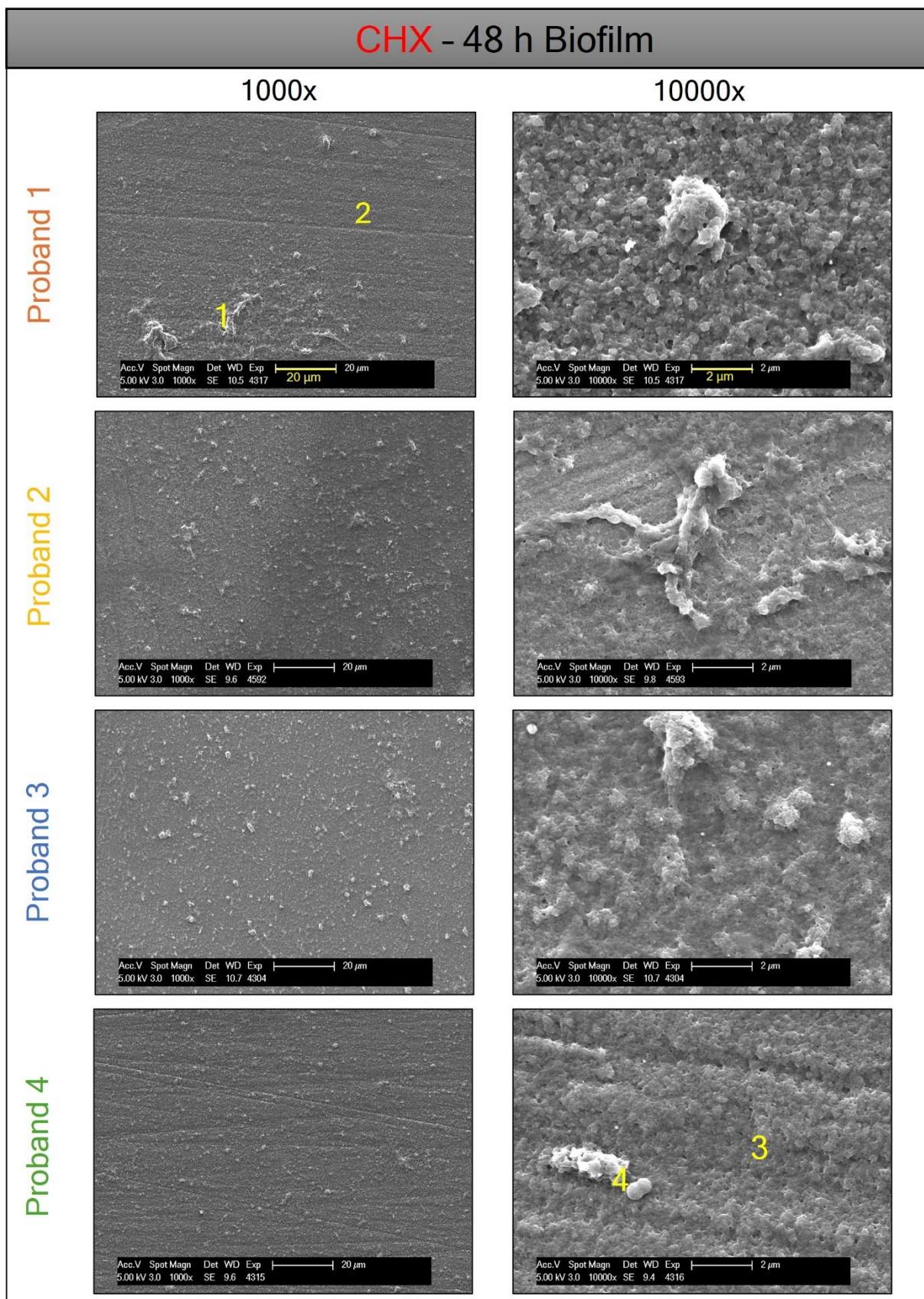


Abb. 19: Aufnahmen der PK mit dem REM in den Vergrößerungen 1000-fach und 10000-fach. Für jeden der 4 Probanden sind jeweils zwei Bilder gezeigt. Die PK sind nur punktuell bedeckt (1). Die Pellikel-Struktur ist verändert. Der PK ist überwiegend frei von Bakterien (2). Der Biofilm hat keine klare Strukturierung (3). Bakterien sind nur wenige als intakt zu erkennen (4). CHX = Chlorhexidin.

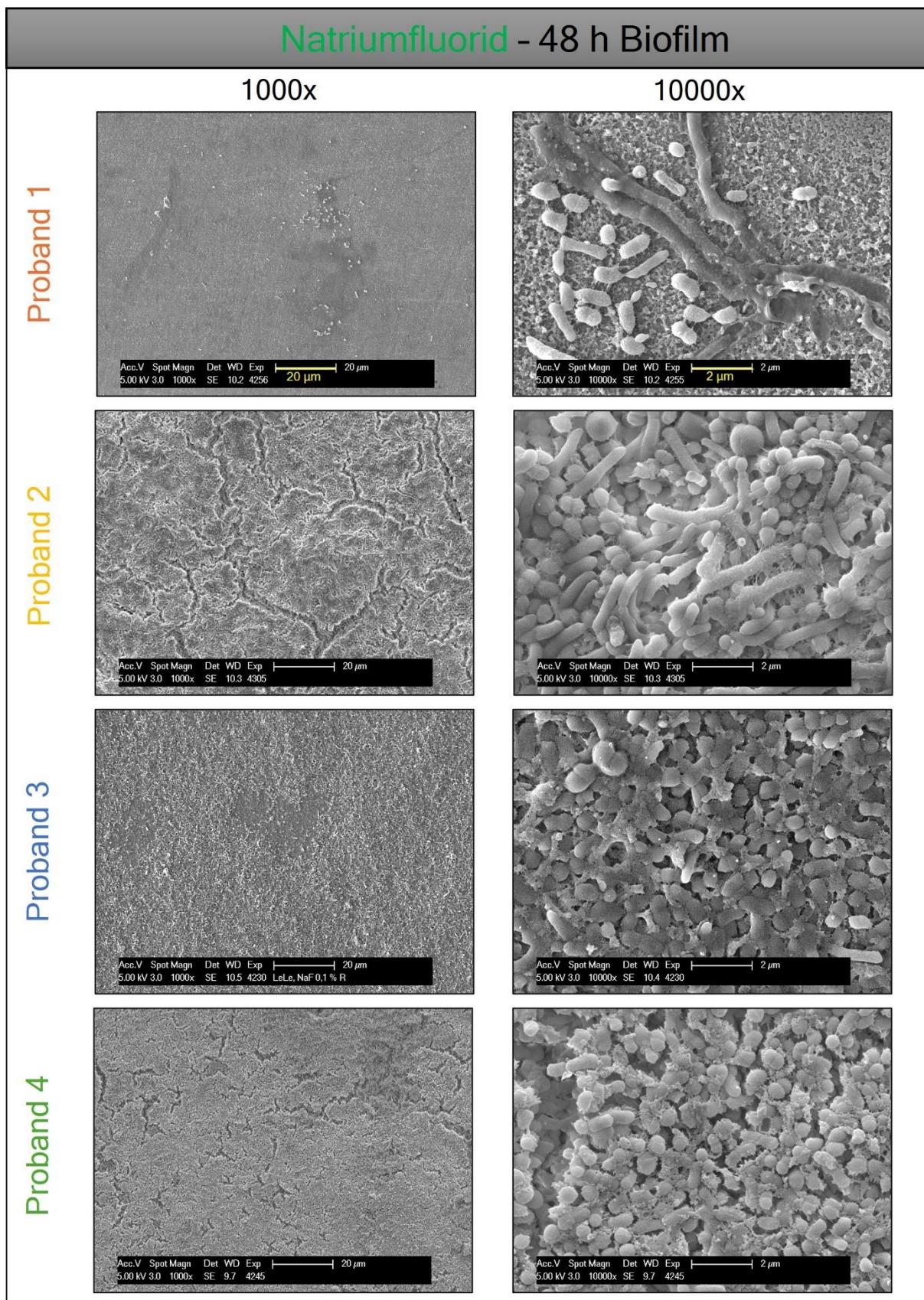


Abb. 20: Aufnahmen der PK mit dem REM in den Vergrößerungen 1000-fach und 10000-fach. Für jeden der 4 Probanden sind jeweils zwei Bilder gezeigt. Mit Ausnahme von Proband 1 sind die PK überwiegend mit Biofilm bedeckt und nur selten unterbrochen. Bakterienstrukturen sind klar zu erkennen. Proband 1 zeigt das Gegenteil. Der PK ist überwiegend frei von Bakterien, diese sind jedoch intakt.

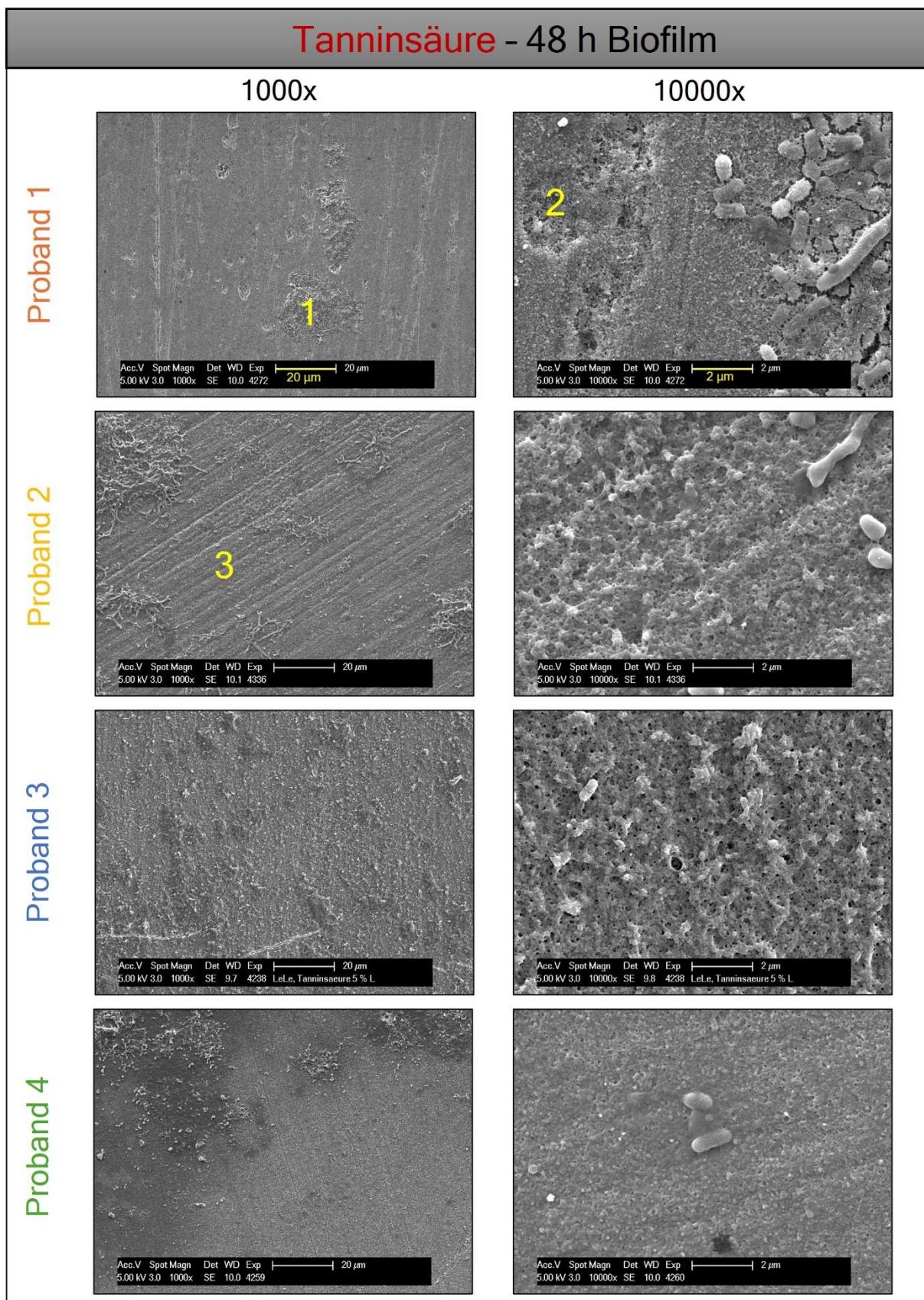


Abb. 21: Aufnahmen der PK mit dem REM in den Vergrößerungen 1000-fach und 10000-fach. Für jeden der 4 Probanden sind jeweils zwei Bilder gezeigt. Die PK sind überwiegend frei von Bakterien (1). Stellenweise sind tiefe Furchen innerhalb unstrukturierter Aggregate zu erkennen (2). Bakterien sind nur selten in intakten Strukturen erkennbar. Die Polierspuren der PK selbst sind zum Teil deutlich sichtbar (3).

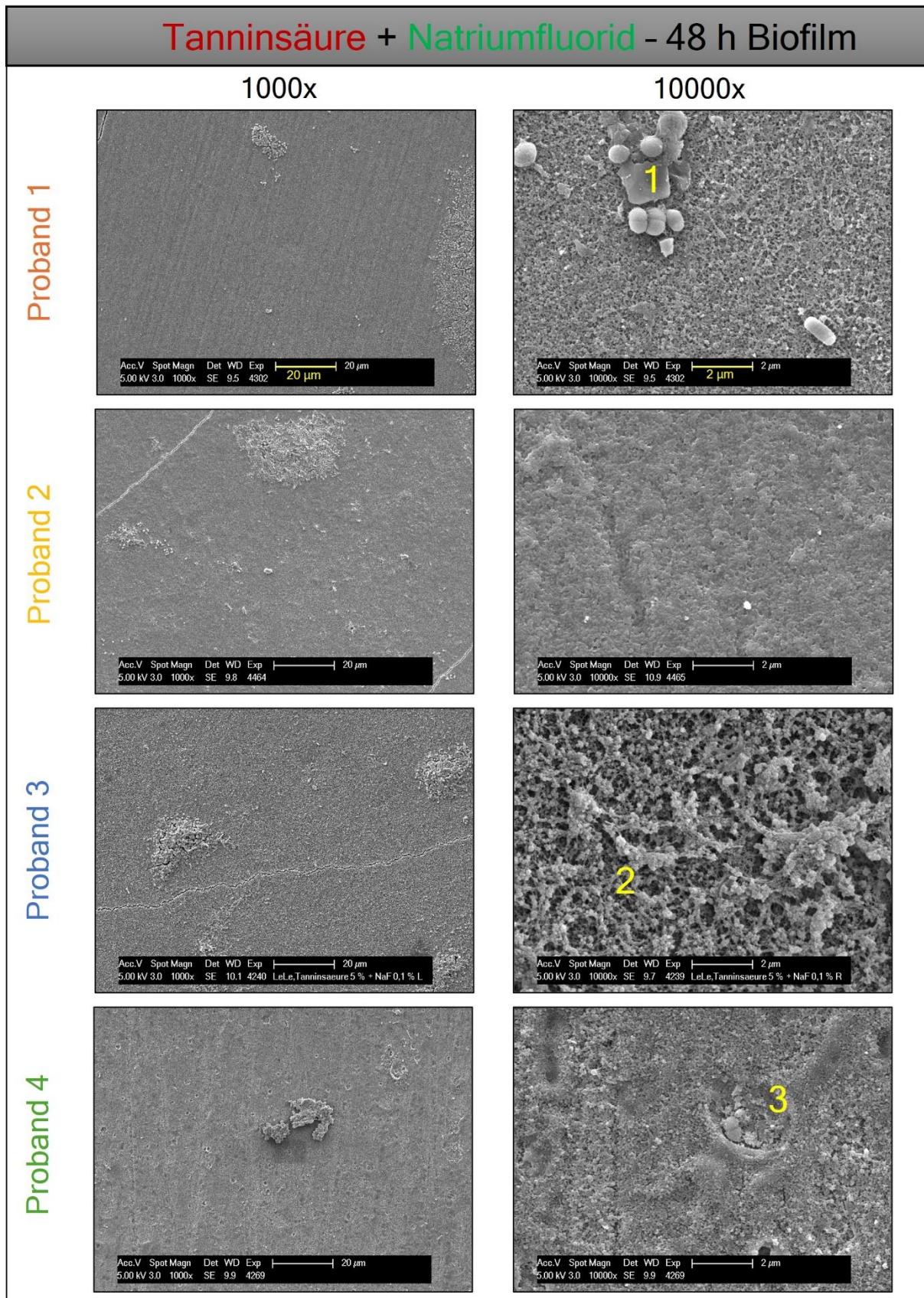


Abb. 22: Aufnahmen der PK mit dem REM in den Vergrößerungen 1000-fach und 10000-fach. Für jeden der 4 Probanden sind jeweils zwei Bilder gezeigt. Die PK sind vorwiegend bakterienfrei, vereinzelt sind Kolonien und Nester zu erkennen. Intakte Bakterien sind selten (1). Die Biofilm-Struktur ist teilweise zu erkennen, ohne dass eine eindeutige Identifizierung einzelner Gebilde möglich wäre (2). In Furchen finden sich Nester (3).

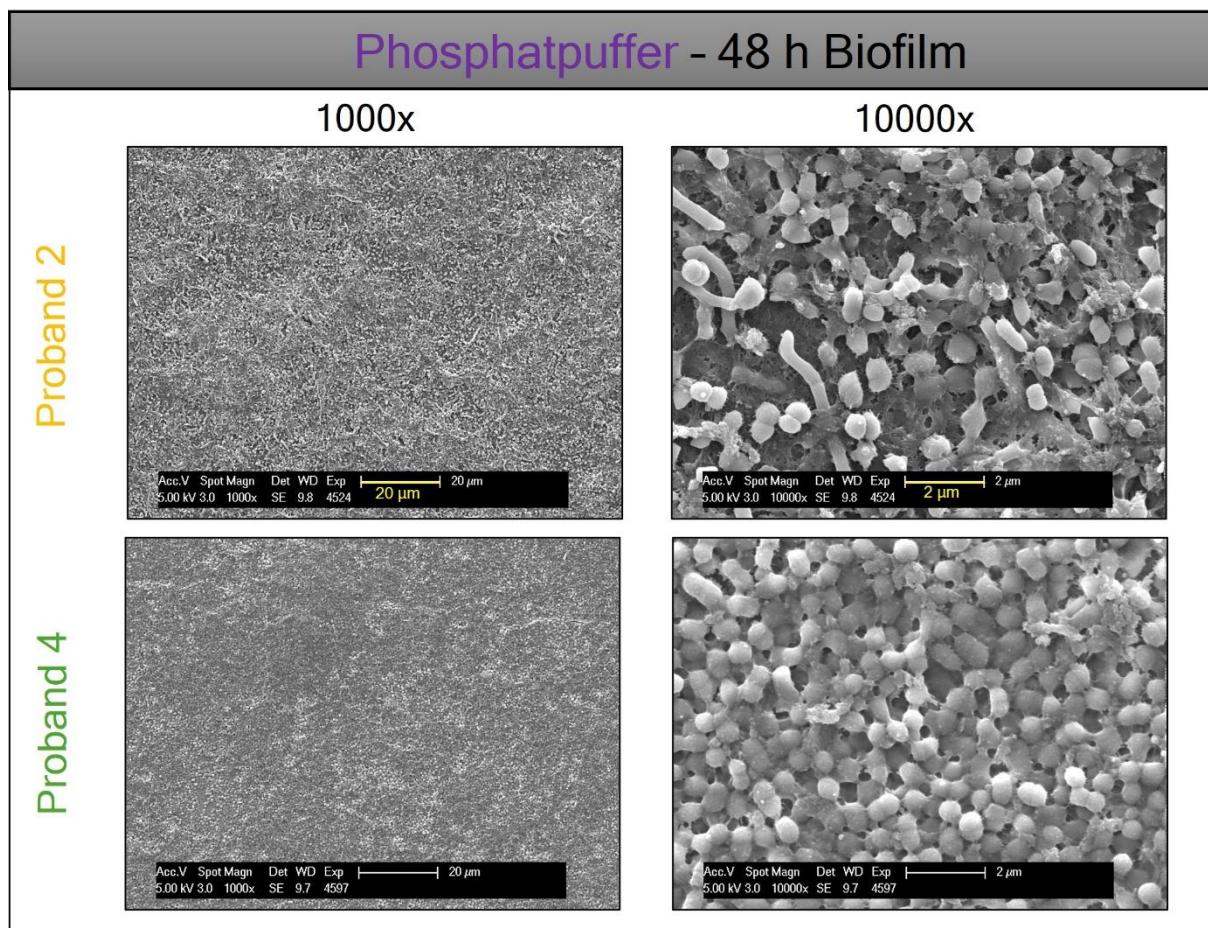


Abb. 23: Aufnahmen der PK mit dem REM in den Vergrößerungen 1000-fach und 10000-fach. Für die beiden Probanden sind jeweils zwei Bilder gezeigt. Die PK sind nahezu vollständig bedeckt. Bakterien sind vollständig erkennbar, es lassen sich mehrere Schichten erkennen.

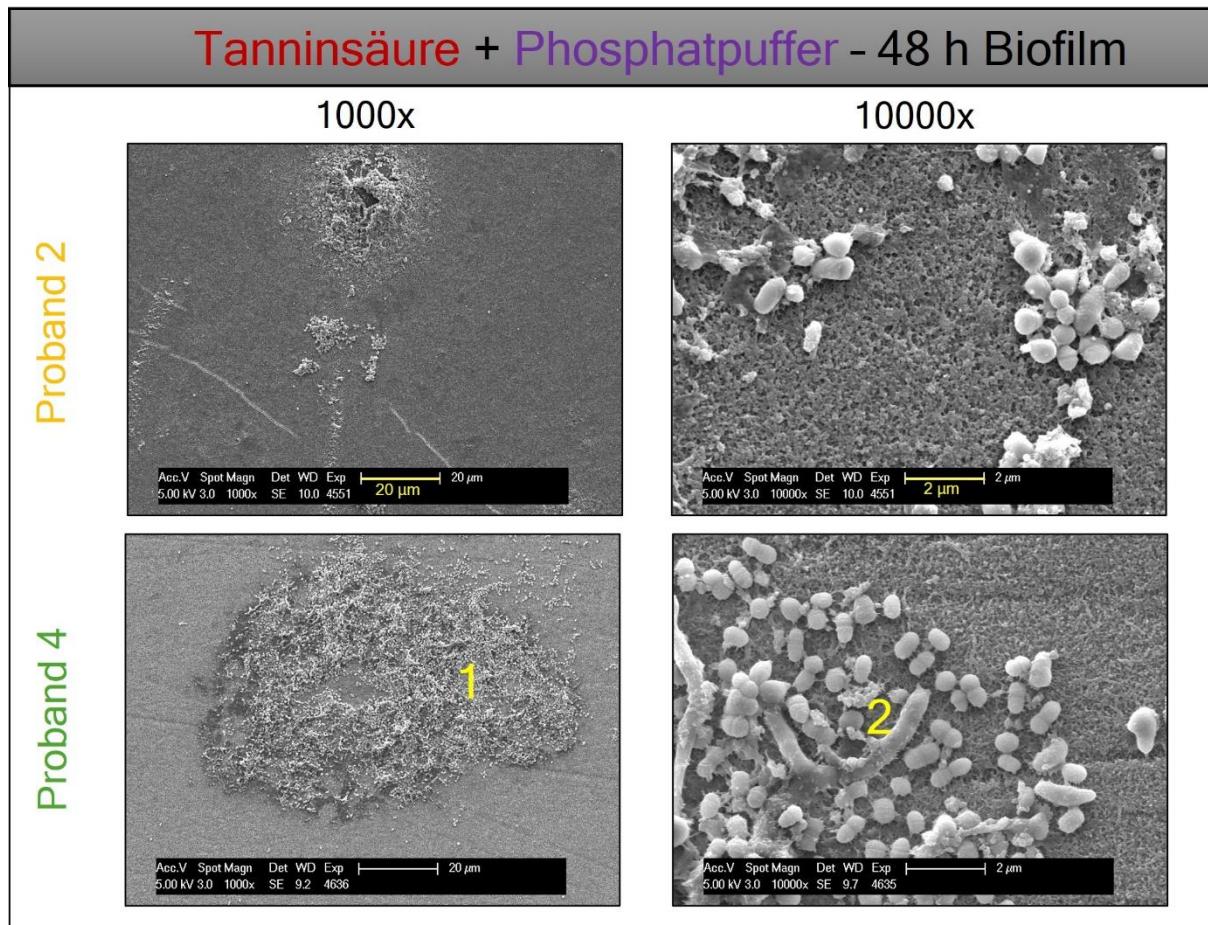


Abb. 24: Aufnahmen der PK mit dem REM in den Vergrößerungen 1000-fach und 10000-fach. Für die beiden Probanden sind jeweils zwei Bilder gezeigt. Die PK sind größtenteils bakterienfrei, es sind größere Kolonien (1) neben kleineren Nestern zu erkennen. Die Bakterien innerhalb der Kolonie sind intakt und zeigen sich klar strukturiert (2). Daneben sind große Areale mit homogenen, unstrukturierten Aggregaten zu finden.

4.6 Transmissionselektronenmikroskopie

4.6.1 Versuchsreihe I – Alle Probanden

Negativkontrolle

Die Negativkontrolle mit sterilem Wasser zeigt eine kontinuierliche bakterienreiche Schicht mit zum Teil Stärken von 7000 nm. Es sind gleichartige ultrastrukturelle Nester im Sinne von echten Kolonien zu erkennen (Abb. 26). Die Bakterien haben intakte Konturen und zeigen Einschnürungen, möglicherweise im Sinne von Teilungsfurchen (Abb. 25). Die Pellikel-Schicht ist als elektronendichte Struktur an der Schmelzoberfläche zu erkennen. Die Dicke variiert bei 20 nm. Der Biofilm ist bei allen Probanden gleichmäßig und in ähnlicher Struktur ausgebildet. Aufnahmen wurden aufgrund der Größe des Biofilms in 6800-facher und 49000-facher Vergrößerung angefertigt. Das erste Bild von Proband 4 ist in der Vergrößerung 2900-fach dargestellt, da nur in dieser der Biofilm vollständig darstellbar war (Abb. 26).

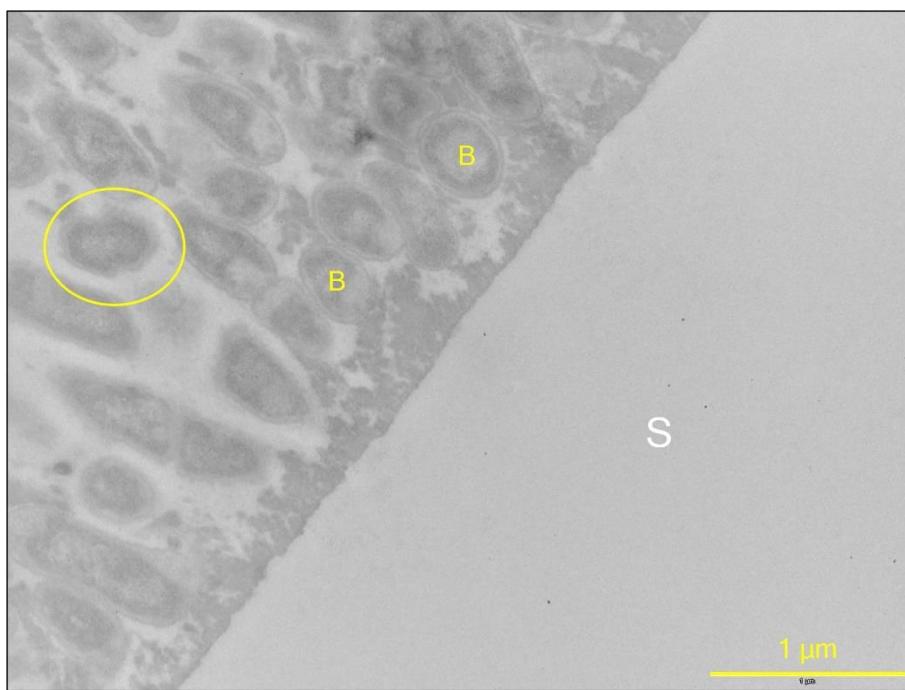


Abb. 25: 48 h Biofilm nach Spülung mit sterilem Wasser. Die TEM-Aufnahme zeigt einen PK der linken Seite von Proband 1 in der Vergrößerung 23000-fach. Bakterien haben klare intakte Konturen (B), einige zeigen Einschnürungen, die als Teilungsfurchen interpretiert werden können (gelber Kreis). S = Schmelzseite

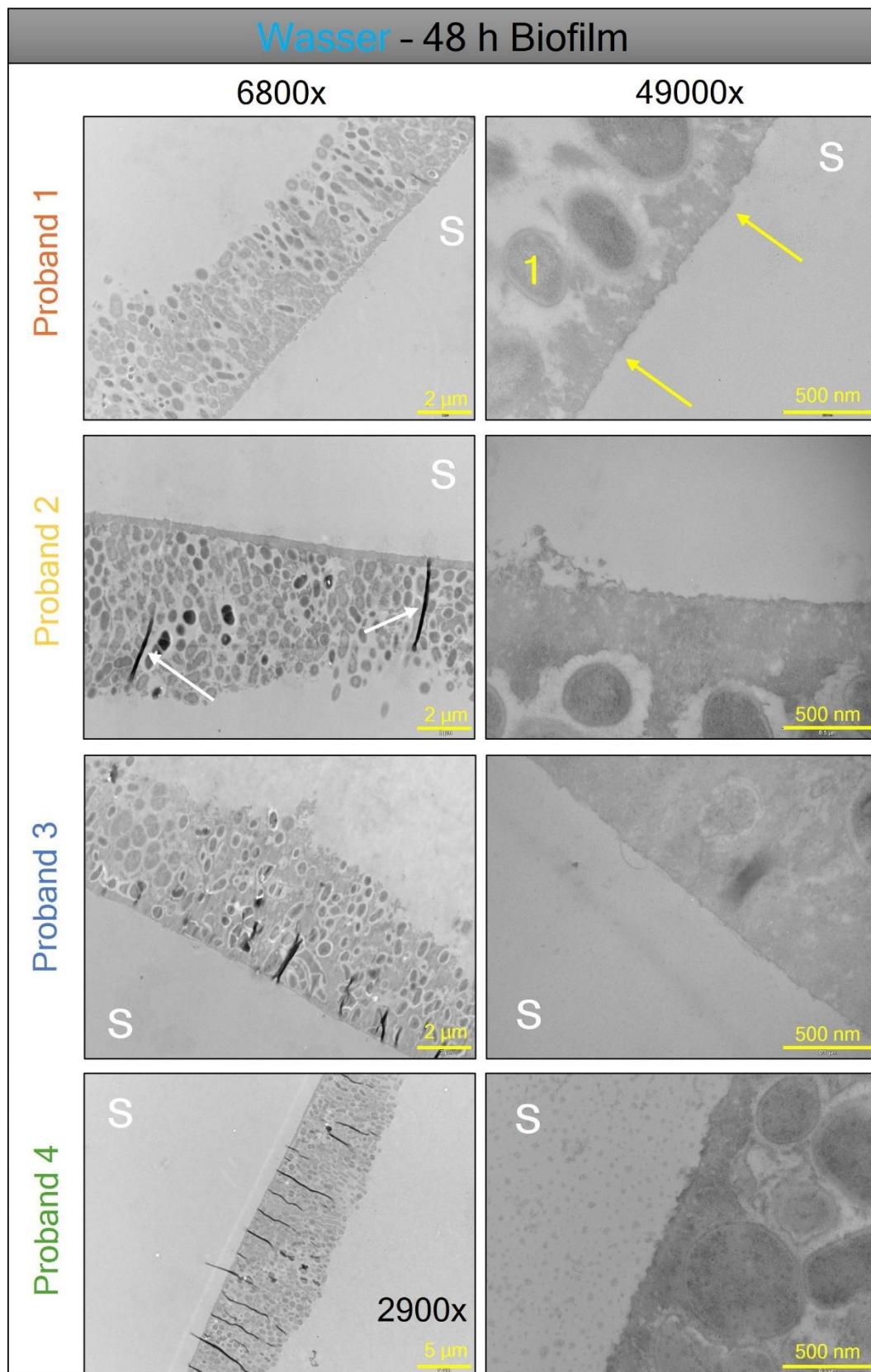


Abb. 26: TEM-Aufnahmen nach 48 h Biofilmbildung. Das linke Bild zeigt den PK der rechten, daneben der linken Seite. Es ist ein intakter vitaler Biofilm zu erkennen. Die Bakterien sind im mehreren Ebenen angeordnet. Bakterien sind klar als solche zu identifizieren (1), die Pellikel-Schicht ist schmal und kontinuierlich ausgebildet (**gelbe Pfeile**). Die Übersichtsaufnahme von Proband 2 zeigt an einigen Stellen schwarze Streifen im Sinne von Riss- bzw. Quetschartefakten (**weiße Pfeile**). **S** = Schmelzseite.

Positivkontrolle

Die Positivkontrolle mit 0,2 %iger CHX Lösung zeigt für alle Probanden sehr ähnliche Bilder, in denen der bakterielle Biofilm nicht mehr eindeutig identifizierbar ist. Es zeigen sich elektronendichte Strukturen nahe der Pellikel-Schicht und generalisierte elektronendichte Strukturen. Einzelne Bakterien oder Strukturen sind nicht abgrenzbar (Abb. 27). Die Dicke variiert unter den Probanden, im Maximum eine Dicke von 1000 nm. Der Mittelwert liegt bei 400 nm. Vereinzelt sind Alterationen der Schmelzoberfläche zu erkennen, die sich elektronendicht darstellen. Die Aufnahmen wurden unter 23000-facher sowie 49000-facher Vergrößerung angefertigt. Die Struktur zeigt sich konstant unterhalb der Probanden mit geringer Abweichung der Dicke.

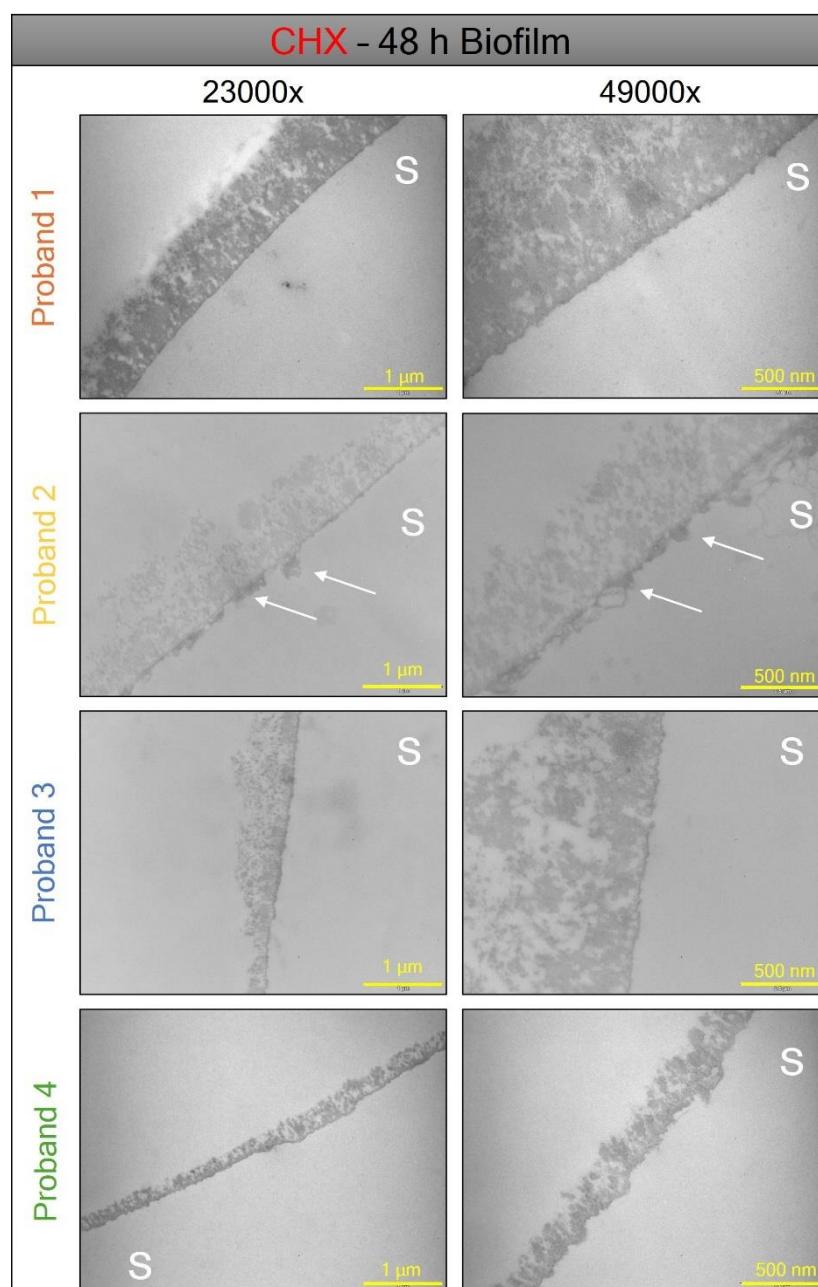


Abb. 27: TEM-Aufnahmen aller Probanden nach 48 h Biofilmbildung. Das linke Bild zeigt den PK der rechten, daneben der linken Seite. Die Pellikelbasisschicht ist als eine deutliche, elektronendichte Struktur erkennbar. Darauf anschließend eine dicke globuläre Schicht aus Proteinaggregaten. Zum Teil sind elektronendichte Alterationen der Schmelzsicht zu erkennen (weiße Pfeile). S = Schmelzseite.

Spülversuch 1: Natriumfluorid 500 ppm F-

Der Spülversuch mit Natriumfluorid zeigt ähnliche Ergebnisse bezogen auf die Negativkontrolle (Abb. 26). Der Biofilm ist intakt, klar strukturiert und mehrschichtig. Die Dicke des Biofilm beträgt im Mittel 5000 nm. Proband 3 zeigt einen besonders ausgeprägten Biofilm, sodass im Vergleich zu den anderen Aufnahmen diese in der Vergrößerung 6800-fach aufgenommen wurde. Zum Teil sind Zellnester nahe an der Pellikel-Schicht erkennbar. Es zeigt sich insgesamt ein vitaler Biofilm, mit Ausnahme von Proband 1, welcher einen eher unstrukturierten, zerklüfteten und unregelmäßigen Biofilm aufweist (Abb. 28). Der Biofilm variiert zudem in Dicke und Struktur innerhalb und unterhalb der Probanden.

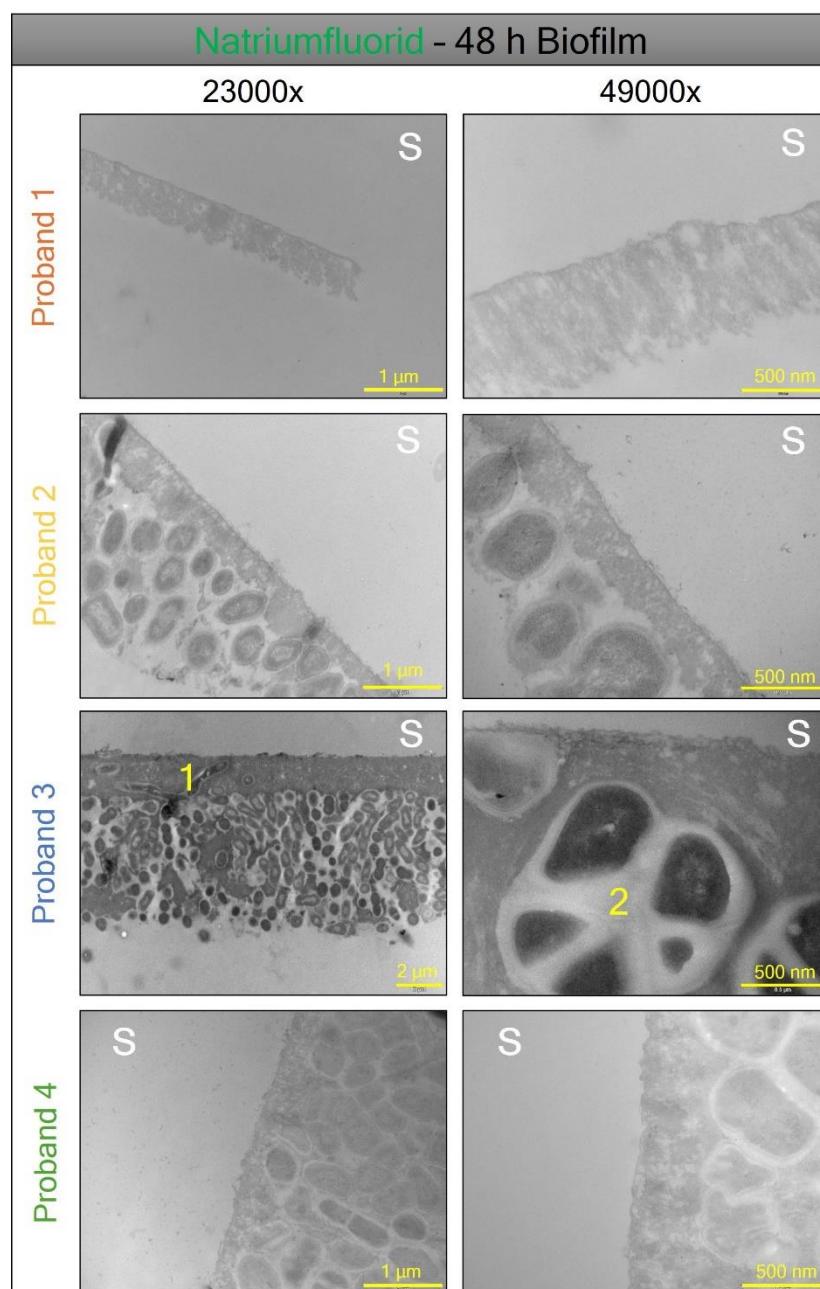


Abb. 28: TEM-Aufnahmen aller Probanden nach 48 h Biofilm-Bildung. Die linke Spalte zeigt die PK der rechten Seite, daneben die der linken. Es sind repräsentative Aufnahmen der Probanden gezeigt. Proband 1 zeigt eine elektronendichte Pellikelbasisschicht und globuläre Strukturen ohne erkennbare Bakterien. Die anderen Probanden zeigen einen vitalen, mehrschichtigen und strukturierten Biofilm. Die Pellikel-Schicht ist stark verbreitert. Bakterien sind klar erkennbar und bilden zum Teil Nester (2) nahe der Pellikel-Schicht (1). S = Schmelzseite.

Spülversuch 2: Tanninsäure 5 %

Der Spülversuch mit Tanninsäure zeigt eine zerklüftete, elektronendichte Struktur. Es sind keine bakterielle Strukturen zu erkennen. Es findet sich eine verbreiterte Pellikel-Schicht mit homogenen Proteinaggregaten, welche sich als elektronendicht darstellen. Der Biofilm ist nicht durchgängig und besitzt eine geringe Dicke, im Mittel ca. 300 nm (Abb. 29). Es zeigen sich unterhalb der Schmelzsicht Infiltrate sowie Alterationen der Schmelzsicht und Pellikel-Schicht. Zum Teil, wie beispielsweise Proband 3 ausgeprägt zeigt, sind diese bis zu 500 nm unterhalb der Schmelzoberfläche zu finden. Diese stellen sich auch als eine elektronendichte Struktur dar. Die Pellikel-Schicht ist teilweise nicht klar von den Aggregaten abzugrenzen (Abb. 30).

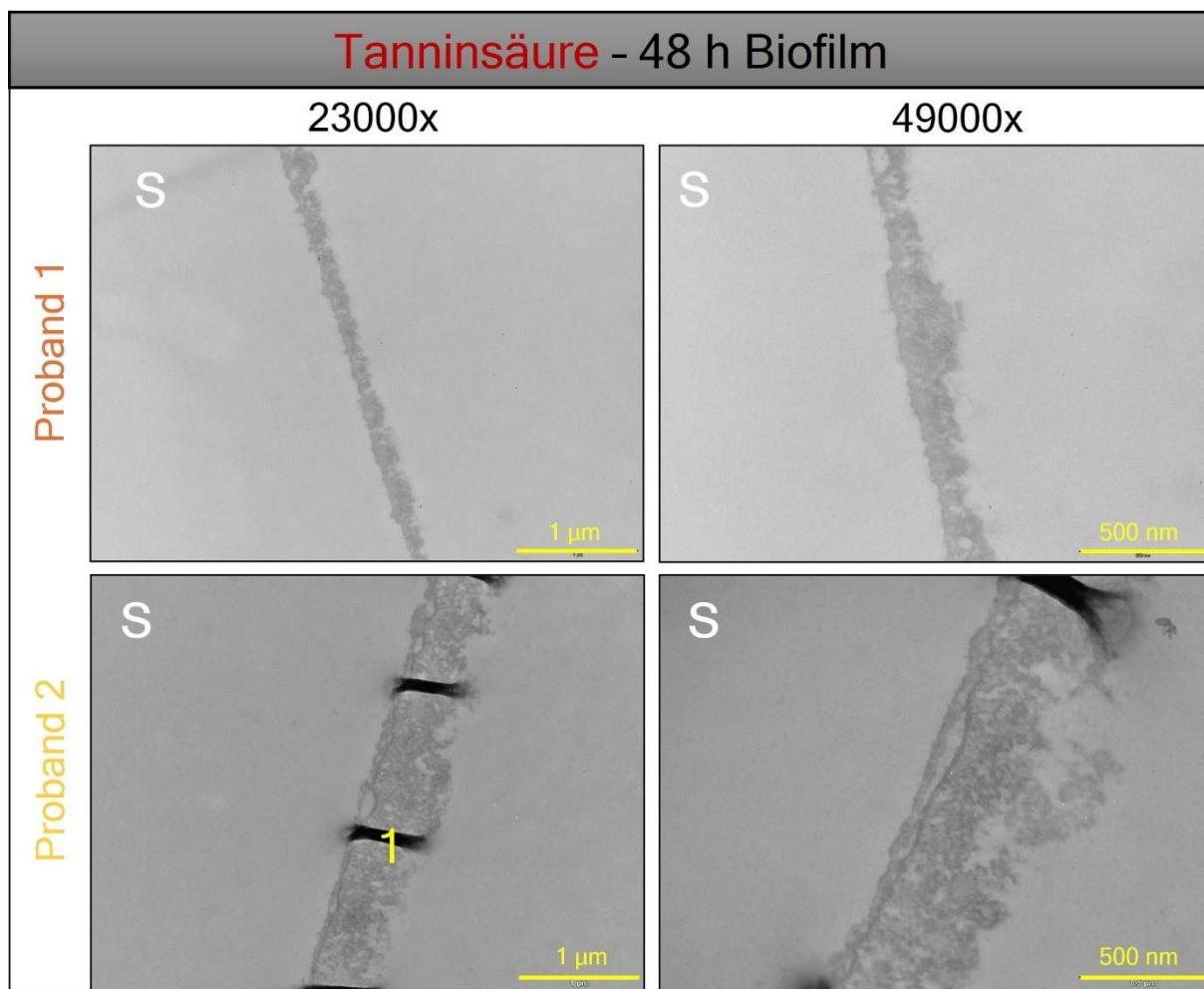


Abb. 29: Repräsentative TEM-Aufnahmen der Probanden 1 und 2 nach 48 h Biofilm-Bildung. Die linke Spalte zeigt die PK der rechten Seite, daneben die der linken. Beide Probanden zeigen keine klare Struktur, mit elektronendichten Aggregaten, insbesondere nahe der Pellikel-Schicht. Es zeigt sich eine geringe Dicke, teilweise sind Alterationen der Schmelzoberfläche zu erkennen. Proband 2 zeigt einen stark zerklüfteten Biofilm mit abschnittsweise starker Artefakt Bildung (1). Bakterien sind nicht oder nur schemenhaft zu erkennen. Es zeigt sich ein Bild eines devitalen Biofilm. S = Schmelzseite.

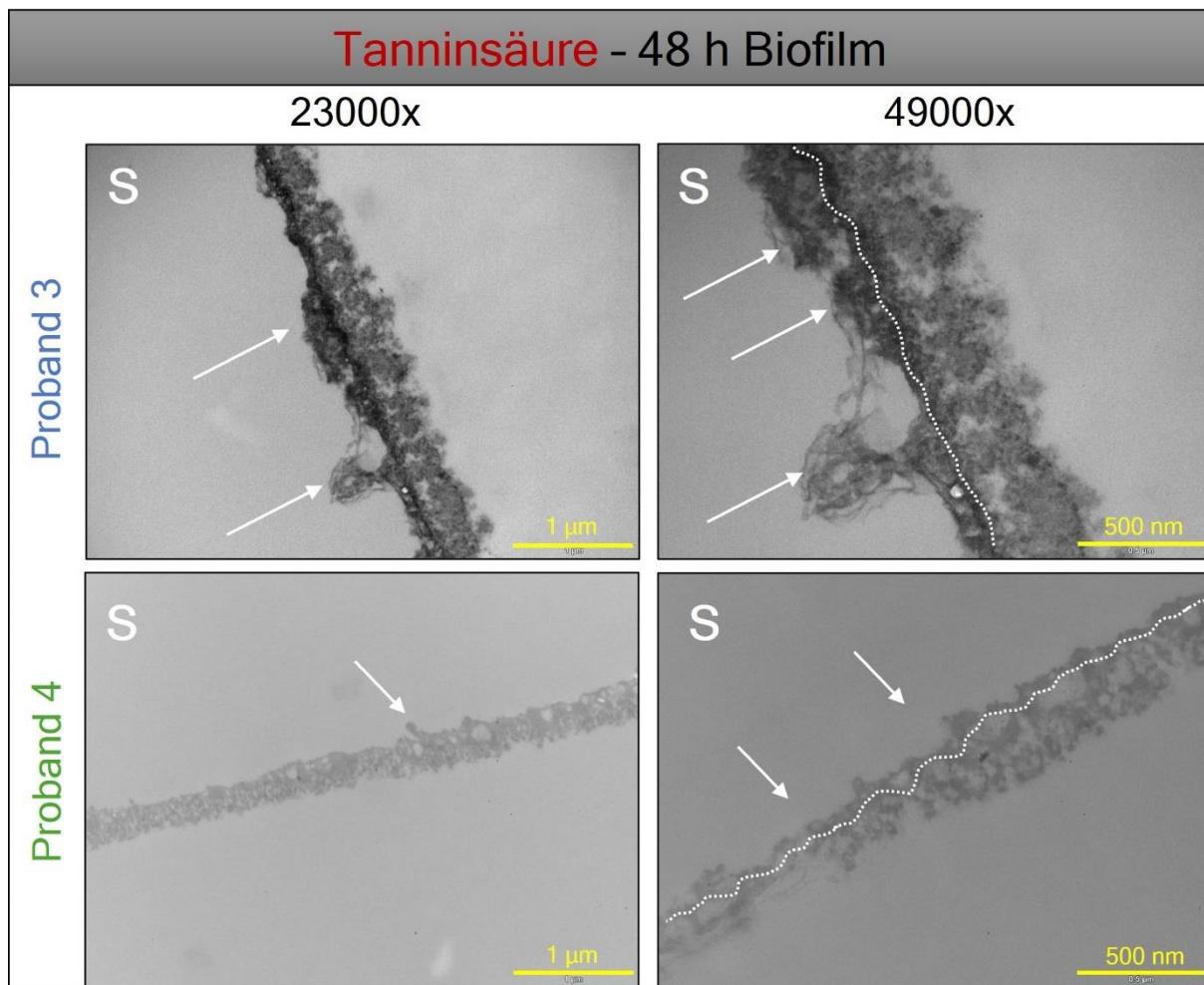


Abb. 30: Repräsentative TEM-Aufnahmen der Probanden 3 und 4 nach 48 h Biofilm-Bildung. Die linke Spalte zeigt die PK der rechten Seite, daneben die der linken. Proband 3 zeigt eine stark elektronendichte zerklüftete Oberflächenstruktur. Es finden sich homogene Proteinaggregate mit dicker Basis-Pellikel Ausbildung (**weiße schraffierte Linie**). Ein exakte Abgrenzung ist nicht möglich. Es sind Alterationen der Schmelzoberfläche und Infiltrate unterhalb der Schmelzsicht zu erkennen (**weiße Pfeile**). Die Oberflächenstruktur ist unregelmäßig ohne erkennbare Bakterien. Die Pellikel zeigt Kontinuitätsunterbrechungen und Fragmentierung. Die Pellikel hat eine geringe, nahezu konstante Dicke. **S** = Schmelzseite.

Alle Probanden zeigen eine Biofilmstruktur, die den Aufnahmen der Positivkontrolle ähnlich sind. Es sind elektronendichte, homogene Aggregate an der Pellikel-Schicht zu erkennen (Abb. 29). Besonders auffallend waren Proband 3 und 4 (Abb. 30). Diese zeigen eine deutliche unterbrochene und fragmentierte globuläre Schicht. Teilweise war die Pellikelbasisschicht nicht klar abgrenzbar. Die elektronendichten Infiltrate unterhalb der Schmelzsicht zeigen sich hier sehr ausgeprägt. Eine Artefaktbildung kann durch die Regelmäßigkeit und die Struktur ausgeschlossen werden. Bei 23000-facher Vergrößerung ist die verbreiterte Pellikel-Schicht als stark elektronendichte Struktur zu erkennen. In Richtung Schmelzseite finden sich die Veränderungen der Schmelzoberfläche. Diese sind ebenfalls elektronendicht und morphologisch mit dem Biofilm der dem Schmelz abgewandten Seite vergleichbar. Diese sind nicht kontinuierlich ausgebildet,

finden sich allerdings in gehäuften, regelmäßigen Abständen als Gruppe im Sinne von Nestern wieder. Auch hier lässt sich keine klare Strukturierung erkennen. Erkennbar sind einige wenige elektronendichte Areale. Diese zeigen sich als rundliche, scharf begrenzte Formen mit zum Teil zentralen Aufhellungen. Sie finden sich gruppiert unmittelbar unter der Schmelzoberfläche (Abb. 31). Der übrige Biofilm ist nur als wolkenartiges, kontrastreiches Gebilde sichtbar. Die nachfolgende Aufnahme in 49000-facher Vergrößerung von Proband 3 zeigt den Sachverhalt exemplarisch.

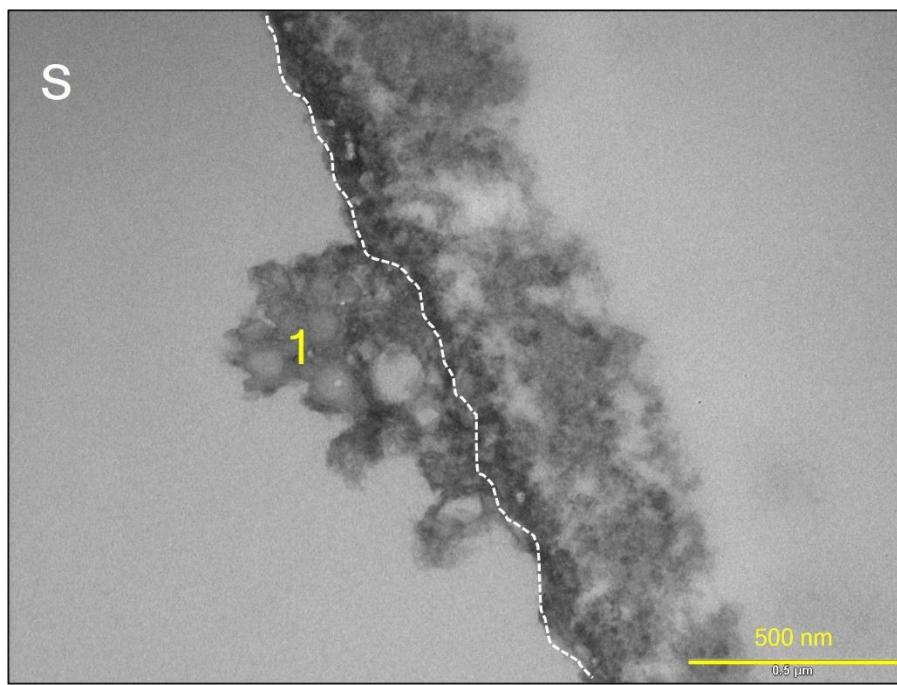


Abb. 31: TEM-Aufnahme des rechten PK von Proband 3 nach 48 h Biofilm-Bildung, in der Vergrößerung 49000-fach, nach Spülung mit Tanninsäure. Erkennbar ist die unscharfe, wolkenartige und diskontinuierliche Struktur der Oberflächlichen globulären Schicht. Darauf folgt die elektronendichte Pellikel-Schicht mit vielen Aggregaten. Es sind keine Bakterien erkennbar. Unterhalb der Schmelzschicht (weiße gestrichelte Linie) finden sich Alterationen mit nestartigen Ansammlungen runder, scharf begrenzter Formen (1). S = Schmelzseite.

Spülversuch 3: Tanninsäure 5 % + Natriumfluorid 500 ppm F

Die TEM-Aufnahmen der Kombinationsspüllösung zeigen vergleichbare Ergebnisse wie die Aufnahmen der reinen Tanninsäure. Es zeigt sich eine dicke, elektronendichte Pellikel-Schicht. Der Biofilm ist tendenziell unstrukturiert, wolkenartig und unterbrochen. Bakterien sind nicht eindeutig identifizierbar, sondern lediglich schemenhaft sichtbar (Abb. 32). Diese sind zum Teil in eine homogene elektronendichte Matrix eingebettet. Die Dicke und Morphologie des Biofilms unterscheiden sich bei den Probanden vergleichsweise stark. Proband 2 und 3 haben dickere elektronendichte Pellikel. Im Mittel zeigt sich eine Dicke von ca. 1500 nm. Bevorzugt an der obersten Schicht sind schemenhaft Bakterien zu vermuten (Abb. 33). Demgegenüber stehen die Aufnahmen der Probanden 1 und 4. Diese zeigen einen sehr kontrastreichen, unregelmäßigen Biofilm mit schwer zu differenzierenden Strukturen. Bakterien sind nur ansatzweise

erkennbar. Die Pellicel-Schicht ist auch hier mit homogenen, elektronendichten Aggregaten besetzt. Diese ist bei allen Probanden deutlich verdickt und zeichnet sich klar von den restlichen Strukturen ab (Abb. 33). Alterationen der Schmelzsicht zeichnen sich durch Infiltrationen unterhalb der Schmelzoberfläche aus. Diese Infiltrate sind fadenartig und unstrukturiert. Bei Proband 1 lassen sich ansatzweise Bakterien erahnen (Abb. 32). Eindeutig erkennbar sind diese allerdings nicht.

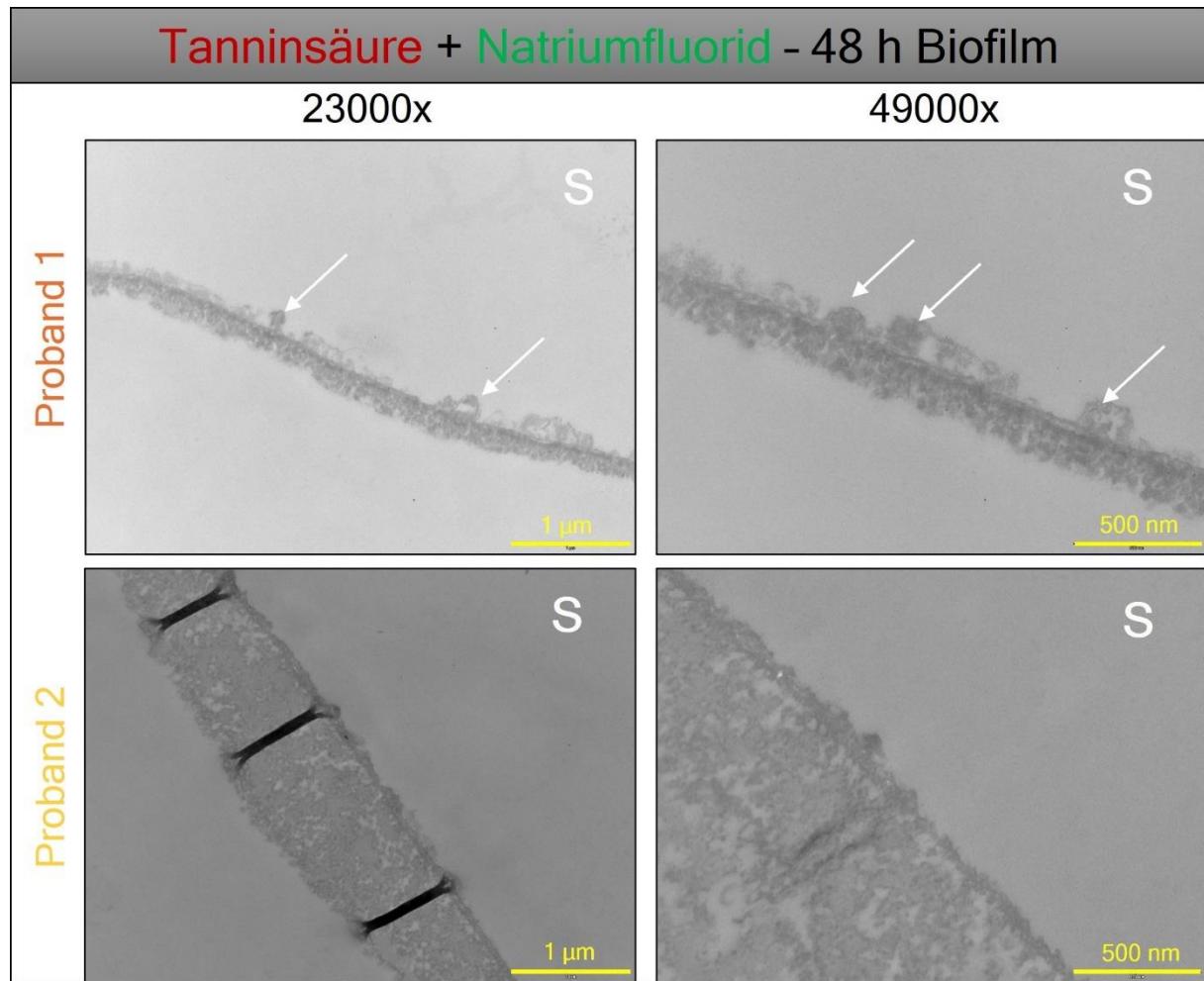


Abb. 32: Repräsentative TEM-Aufnahmen der Probanden 1 und 2 nach 48 h Biofilm-Bildung. Die linke Spalte zeigt die PK der rechten Seite, daneben die der linken. Es ist ein unregelmäßiger, kontrastreicher und fragmentierter Biofilm zu erkennen. Bakterien sind nur schemenhaft erkennbar. Die Pellicel-Schicht ist elektronendicht und verdickt. Es zeigen sich homogene Aggregate. Die Schmelzoberfläche zeigt Alterationen mit Infiltrationen unterhalb dieser. Diese sind als wolkenartige Gebilde zu identifizieren (weiße Pfeile). S = Schmelzseite.

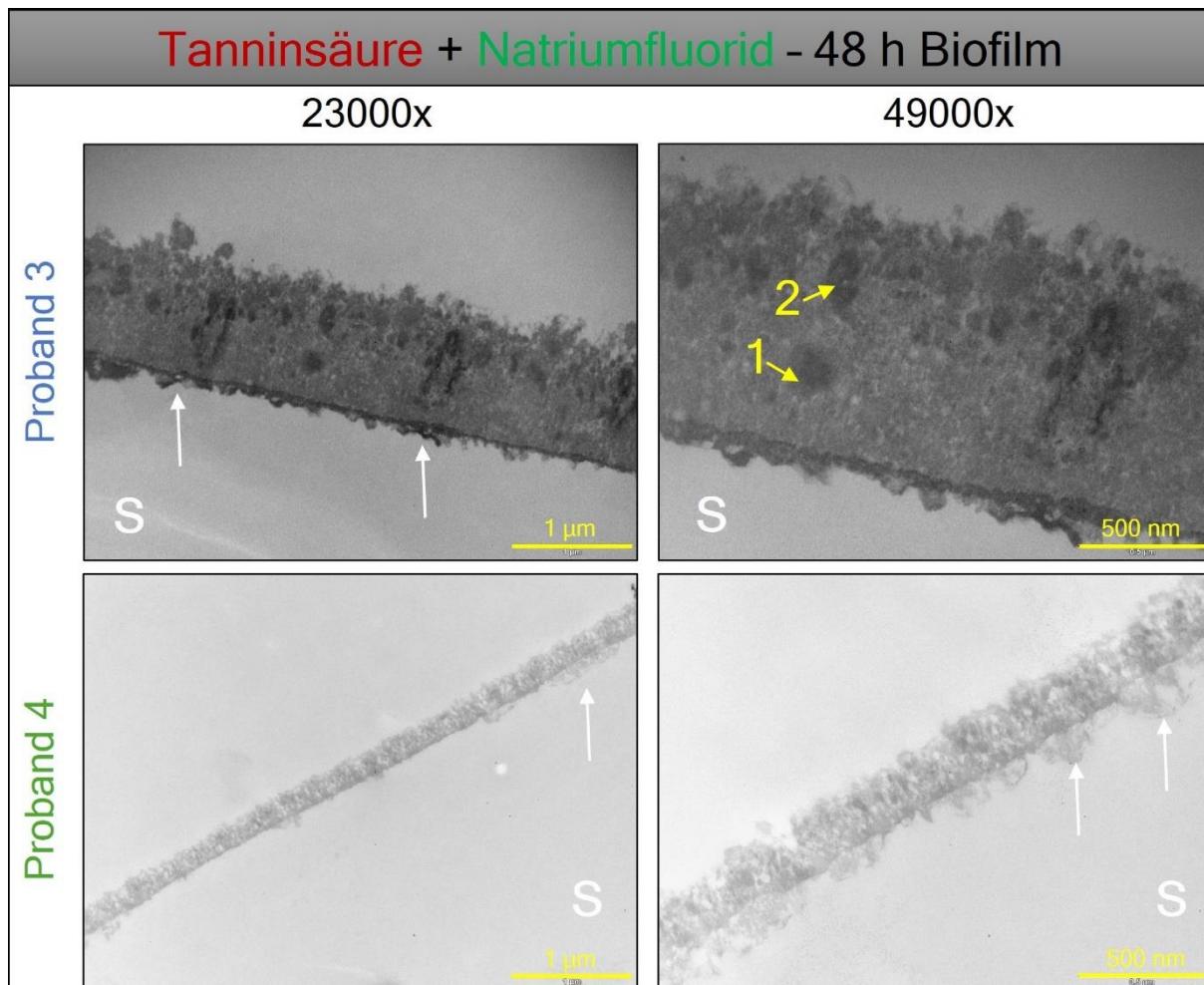


Abb. 33: Repräsentative TEM-Aufnahmen der Probanden 3 und 4 nach 48 h Biofilm-Bildung. Die linke Spalte zeigt die PK der rechten Seite, daneben die der linken. Der Biofilm ist bei Proband 3 als sehr elektronendicht mit vielen Aggregaten erkennbar. Teilweise sind Bakterien schemenhaft erkennbar (**1** und **2**), eingebettet in eine einheitliche Matrix. Diese sind nicht scharf abgrenzbar und zeigen keine klare Integrität. Sie finden sich kontenziert in der obersten Schicht. Die Pellikel-Schicht ist deutlich hervorgehoben mit homogenen elektronendichten Aggregaten. Proband 4 zeigt einen kontrastreichen, wolkenartigen Biofilm ohne klare Struktur. Die Pellikel-Schicht zeichnet sich auch hier deutlich ab. Alterationen der Schmelzoberfläche mit Infiltrationen unterhalb dieser zeigen sich bei beiden (**weiße Pfeile**). **S** = Schmelzseite.

Die Kombination von Tanninsäure und Natriumfluorid zeigt demnach ähnliche Ergebnisse wie die der reinen Tanninsäure. Morphologische Erscheinungen wie die verdickte Pellikel-Schicht, die elektronendichten homogenen Aggregate und die allgemein geringe Biofilmdicke finden sich bei beiden Versuchsreihen. Die Veränderungen um die Pellikel-Schicht sind im Kombinationsspülversuch etwas weniger stark ausgeprägt. Weiterhin unterscheidet sich der Kombinationsversuch dahingehend, dass die Dicke des Biofilms unter den Probanden stark variiert. Zudem sind bakterielle Strukturen insbesondere in der obersten Schicht des Biofilms zwar ohne strukturelle Integrität und nur schemenhaft angedeutet, allerdings deutlicher erkennbar als bei den Aufnahmen aus dem Versuch mit reiner Tanninsäure. Die Alterationen der

Schmelzoberfläche zeigte sich bei beiden Versuchen. Im Kombinationsversuch jedoch weniger stark ausgeprägt. Die Probanden 2 und 4 zeigen, verglichen miteinander, große Unterschiede in Dicke und Struktur. Dennoch unterscheiden sich die Ergebnisse der Probanden, bezogen auf die Spülversuche mit Tanninsäure und Tanninsäure und Natriumfluorid, kaum voneinander. Die Morphologie ist sowohl in Dicke, Struktur und Pellikel-Schicht sehr ähnlich. Proband 1 zeigt eine deutlich ausgeprägtere Alteration der Schmelzoberfläche mit Infiltraten bei der Kombination als bei reiner Tanninsäure. Proband 3 zeigt bei Tanninsäure eine starke Fragmentierung des Biofilms sowie aller oben genannten Merkmale (Abb. 30). Bei der Kombination von Tanninsäure und Natriumfluorid zeigt der Proband einen dicken Biofilm mit zum Teil erkennbaren bakteriellen Strukturen. Die Alterationen der Schmelzoberfläche sind weiterhin deutlich erkennbar, allerdings nicht so stark ausgeprägt (Abb. 33). Unterhalb der Pellikel finden sich fadenartige, weniger elektronendichte, flache, parallel zur Schmelzoberfläche verlaufende und unregelmäßige Veränderungen. Gelegentlich sind rundliche, weniger elektronendichte Areale erkennbar. Die nachfolgende Aufnahme von Proband 3 verdeutlicht dies exemplarisch (Abb. 34).

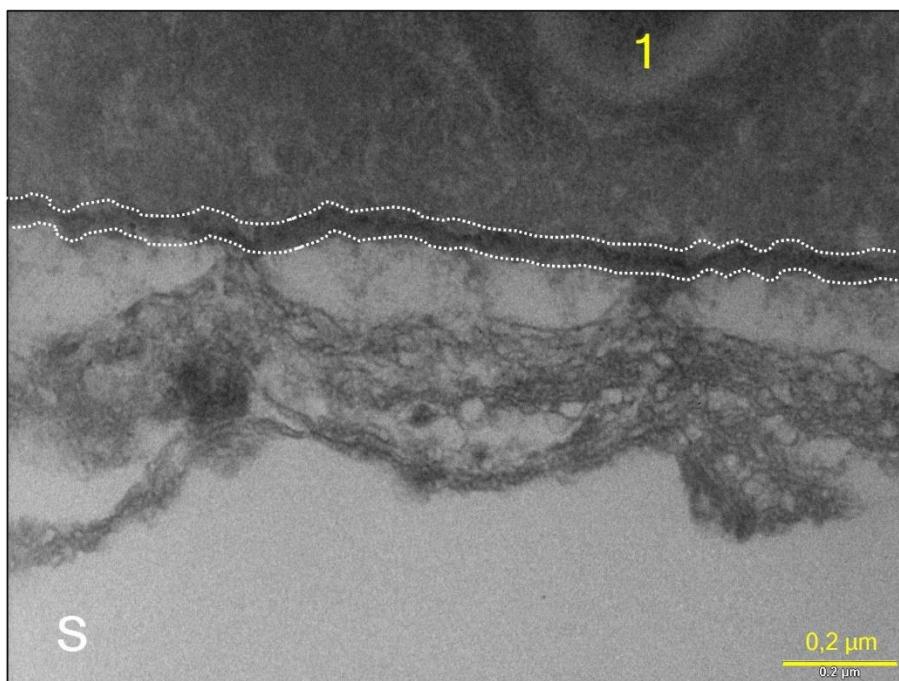


Abb. 34: TEM-Aufnahme des rechten PK von Proband 3 nach 48 h Biofilm-Bildung, in der Vergrößerung 98000-fach, nach Spülung mit Tanninsäure + Natriumfluorid. Es zeigt sich eine elektronendichte, verdickte Pellikel-Schicht mit homogenen Aggregaten (weiße gestrichelte Linien). Oberhalb ist ein maturierter und regelmäßiger Biofilm mit schemenhaft erkennbaren Bakterien (1). Alterationen der Schmelzoberfläche mit Infiltraten zeigen sich als parallel verlaufende wolkenartige Strukturen. S = Schmelzseite.

4.6.2 Versuchsreihe II – Zwei Probanden

Spülversuch 4: Phosphatpuffer 150 mM

Die Ergebnisse der TEM-Aufnahmen für die Spülung mit Phosphatpuffer zeigen sehr ähnliche Ergebnisse, verglichen mit der Negativkontrolle Wasser. Die Pellikel-Schicht ist unverändert und schmal, der Biofilm deutlich ausgeprägt und ist mehrschichtig angeordnet. Der Biofilm ist nur selten unterbrochen. Es sind im Vergleich zu Wasser keine Besonderheiten in Biofilm oder Pellikel-Schicht festzustellen (Abb. 35). Proband 2 zeigt morphologisch eine geringere Dicke des Biofilms.

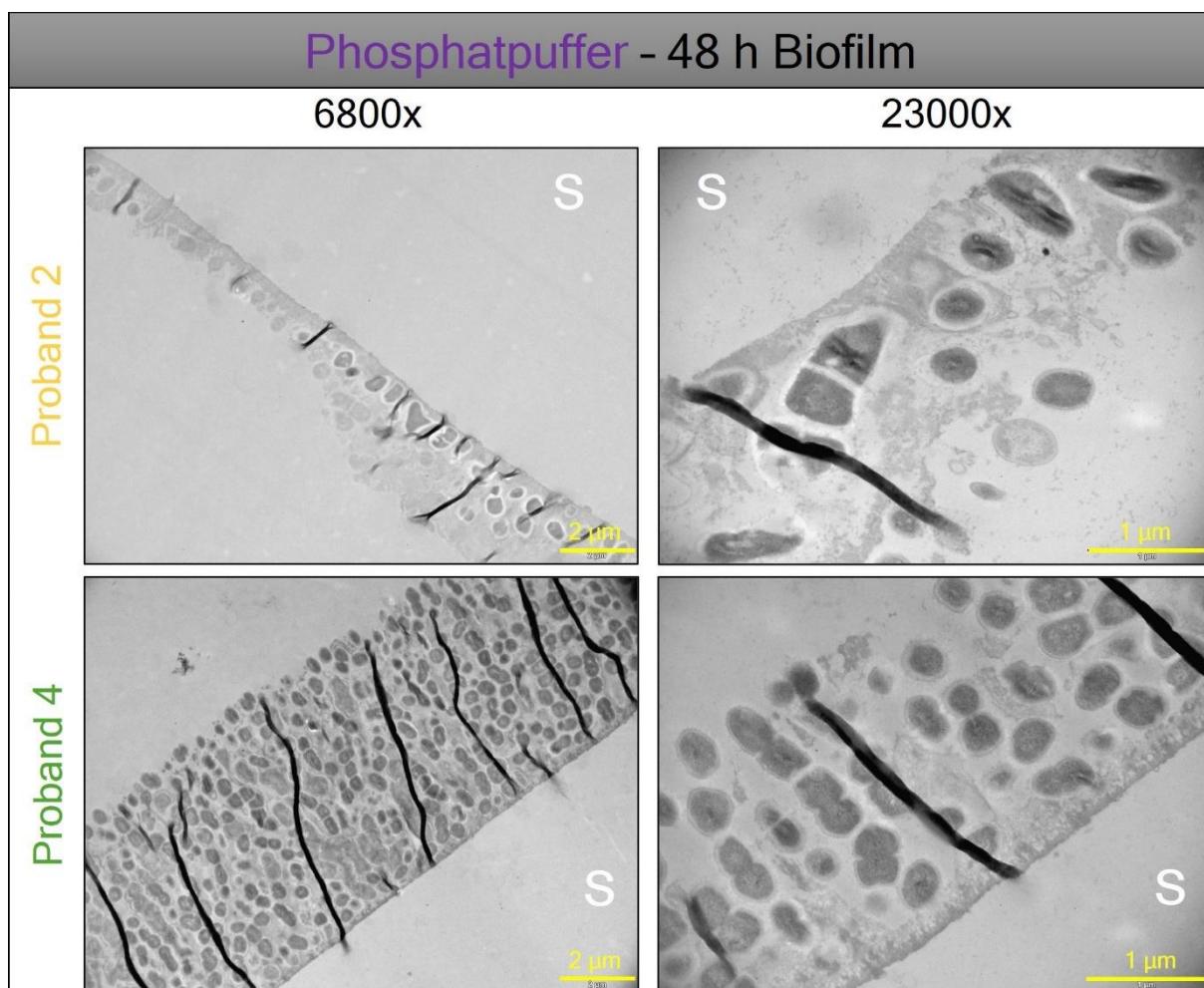


Abb. 35: TEM-Aufnahmen der Probanden 2 und 4 nach 48 h Biofilmbildung. Beide Probanden zeigen eine gut strukturierten Biofilm. Bakterien sind klar erkennbar und mehrschichtig angeordnet. Teilweise sind Bakterien mit mittigen Einschnürungen zu erkennen. Der Biofilm von Proband 2 ist im Vergleich zu Proband 4 nicht so dick ausgebildet. Die Pellikel-Schicht ist schmal und unverändert. **S** = Schmelzseite.

Die Pellikel-Schicht zeigt eine ähnliche Morphologie wie bei der Negativkontrolle Wasser. Sie ist elektronendichter und gleichmäßig ausgeprägt. Die Biofilm Morphologie ist ebenfalls sehr ähnlich. Bakterien sind klar erkennbar und scharf begrenzt. Die Matrix ist, soweit beurteilbar, nicht verändert und ist regelmäßig ausgebildet. Die Morphologie entspricht einem regulär ausgebildeten Biofilm. Die nachfolgende Aufnahme (Abb. 36) von Proband 4 in 49000-facher Vergrößerung zeigt die besagten Ergebnisse.

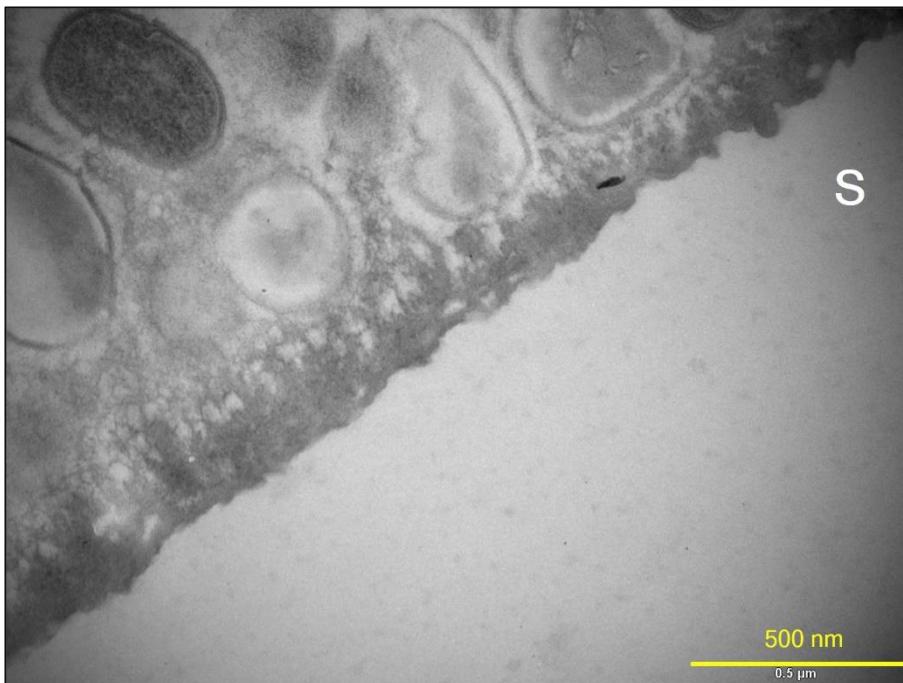


Abb. 36: TEM-Aufnahme des rechten PK von Proband 4 nach 48 h Biofilm-Bildung, in der Vergrößerung 49000-fach, nach Spülung mit Tanninsäure + Phosphatpuffer. Die Aufnahme zeigt einen klar strukturierten, mehrschichtigen Biofilm mit intakten Bakterien. Die Pellikel-Schicht zeigt sich regelmäßig, kontinuierlich und elektronendicht. S = Schmelzseite.

Spülversuch 5: Tanninsäure 5 % + Phosphatpuffer 150 mM

Die Ergebnisse zeigen einen unstrukturierten Biofilm. Bakterien sind nur schemenhaft erkennbar. Der Biofilm zeigt eine ähnliche Morphologie wie die TEM-Bilder bei dem Spülversuch mit Tanninsäure (Abb. 30). Die Pellikel-Schicht ist elektronendicht, und mit homogenen Aggregaten besetzt. Sie hebt sich vom restlichen Biofilm ab. Verglichen mit den TEM-Bildern der Tanninsäure ist diese allerdings nicht so stark elektronendicht hervorgehoben. Die Pellikel-Schicht und Schmelzoberfläche sind kontinuierlich ausgeprägt und ohne Unterbrechungen. Die Dicke des Biofilms ist vergleichbar mit der des Tanninsäure-Versuches und liegt im Mittel bei 400 bis 500 nm. Bei Proband 4 sind Bakterien erkennbar. Diese sind in eine schemenhafte Matrix eingebettet. Proband 2 zeigt einen dickeren Biofilm verglichen mit Proband 4. Beide Probanden haben dennoch eine ähnliche Erscheinung des Biofilms. Die oberste Schicht des Biofilms erscheint stark fragmentiert, die Oberfläche zerklüftet.

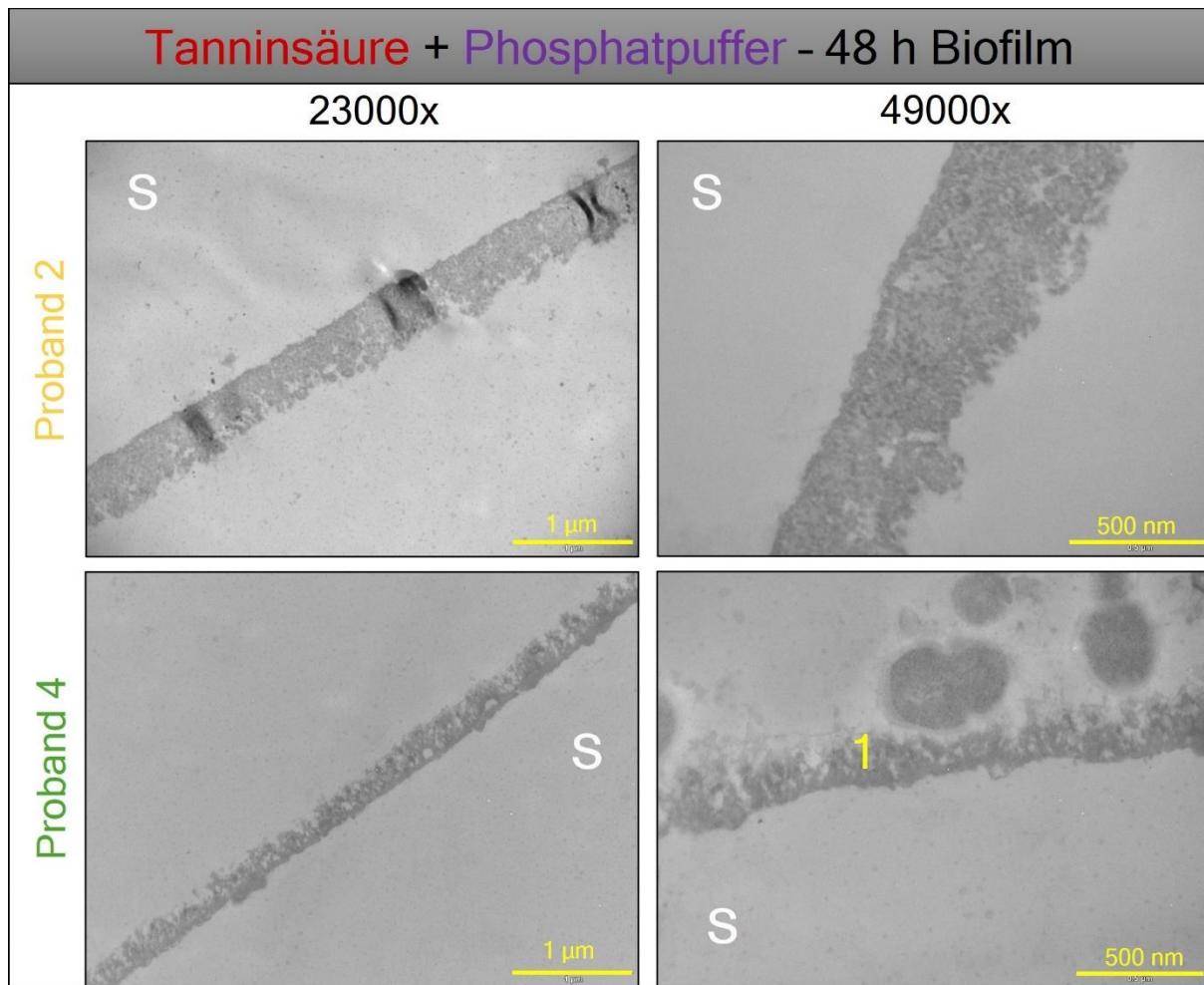


Abb. 37: TEM-Aufnahmen der Probanden 2 und 4 nach 48 h Biofilmbildung. Die linke Spalte zeigt PK der rechten Seite, daneben die der linken. Es zeigt sich insgesamt ein unstrukturierter, aggregatreicher Biofilm. Bakterien sind nur schemenhaft erkennbar. Die Oberfläche ist stark zerklüftet. Einzig Proband 4 zeigt in 49000-facher Vergrößerung einige rundliche, scharf begrenzte Formen die als Bakterien interpretiert werden können. Diese befinden sich in einer schemenhaften Matrix eingebettet. Die Pellikel-Schicht ist regelmäßig und kontinuierlich ausgebildet. Sie zeigt sich elektronendicht und mit homogenen Aggregaten besetzt (**1**). **S** = Schmelzseite.

5 Diskussion

5.1 Studiendesign und Probanden

Diese Studie beschäftigte sich mit dem Einfluss verschiedener Spülösungen auf den oralen Biofilm. Im vorliegenden Fall handelt es sich um eine *in-situ*-Studie. Da der Biofilm ein komplexer Zusammenschluss verschiedener Bakterien und Mikroorganismen ist, nähert sich der Versuch realen, klinischen Bedingungen lediglich an. Eine weitere Rolle spielen zusätzliche Parameter der Mundhöhle. Dazu gehören der Speichel, die Mundschleimhaut und individuelle Faktoren. Dadurch besitzt der Versuch, verglichen mit einer *in-vitro*-Studie, eine größere klinische Relevanz.

In den Versuch wurden vier Probanden mit einbezogen. Zu Beginn hatten diese ein Alter von 23 bis 28 Jahre. Allesamt waren Zahnmedizin-Studenten. Das Gebiss war kariesfrei und zeigte keine entzündlichen Veränderungen wie Gingivitis oder Parodontitis. Ihre Mundhygiene war sehr gut. Sie repräsentieren daher nicht unbedingt den Durchschnitt der Bevölkerung [87]. Sowohl ihr Alter als auch ihre Mundgesundheit beeinflussen die Pellicel-Zusammensetzung und das Vorhandensein von bestimmten Bakterienspezies [2,39]. Da ein solcher Versuchsaufbau sehr aufwändig ist und große Disziplin der Probanden erfordert, ist es schwer geeignete Personen zu akquirieren. Die Probanden müssen über einen längeren Zeitraum mehrfach die Schienen tragen, sich streng an die Vorgaben des Versuches halten und daher zuverlässig sein. Es durfte nur Wasser getrunken werden, ohne Zahnpasta geputzt werden und bei Mahlzeiten war die Schiene auszuziehen. Daher fehlt in diesem Versuch auch der mechanische Abrieb des Biofilms durch die Nahrung. Auch die Vorbereitung der Prüfkörper und Auswertung derer ist sehr aufwendig. Die Anzahl der Probanden orientierte sich daher an anderen vergleichbaren Studien [8,19,20,43,78,90,103]. Dennoch eignet sie sich im Rahmen der Grundlagenforschung zur Beschreibung der Effekte verschiedener Spülösungen. Für ein exakteres, repräsentativeres Gesamtergebnis wären mehr Probanden, auch aus unterschiedlichen sozio-ökonomischen Verhältnissen, nötig.

Jeder Proband nahm an allen Spülversuchen teil. Zwischen den einzelnen Versuchen wurde eine Auswaschzeit von mindestens zwei Tagen eingehalten. Dies verhindert, dass sich Effekte der einzelnen Versuche überlagern. Die Spülmenge und -zeit orientieren sich an Anwendungshinweisen handelsüblicher Mundspülösungen wie beispielsweise Meridol (CP Gaba GmbH, Hamburg, Deutschland). Die Fluoridkonzentration wurde ebenfalls an die der handelsüblichen

Spüllösungen angepasst. In der Literatur wurden für Fluoride ähnliche Konzentrationen verwendet [28,63]. Die Tanninsäure-Konzentration wurde an ähnliche Studiendesigns angelehnt [46,91]. Da für die Pufferlösung keine Studien oder Vergleichslösungen vorhanden waren, wurde eine Molarität gewählt, die ausreichend stark genug war, um Tanninsäure abzupuffern. Gleichzeitig liegt der Phosphat-Anteil ähnlich hoch wie in normaler H-Milch und ist demnach gesundheitlich unbedenklich [80]. CHX lag für die positiv Kontrolle als Fertiglösung in klinisch üblicher Konzentration vor [6,58,79,89]. Die Tragedauer betrug 48 h, diese ergab sich aus Vorversuchen. In diesen zeigte sich bei 24 h eine zu geringe Biofilmbildung für die Auswertung. Das Spülprotokoll lässt die Beurteilung der initialen Kurzzeiteffekte und Langzeiteffekte der Spüllösungen zu.

5.2 Prüfkörper

Insgesamt wurden für die Studie 144 bovine Schmelz-PK benutzt. Einige Studien konnten bereits nachweisen, dass diese sich als Ersatz für humane Zähne in Studien eignen [47,107]. Dies ist bedingt durch die geringe Verfügbarkeit von humanen Zähnen. Zudem sind humane Zähne flächenmäßig kleiner und haben oft kariöse Läsionen, was die Aussortierung und damit den Bedarf erhöht. Außerdem stellen sie ein Infektionsrisiko dar. Allerdings haben bovine Zähne größere Schmelzkristalle und gleichmäßiger verteiltes Calcium [47]. Diese Eigenschaften sollten, insbesondere im Hinblick auf die Beurteilung von Erosionen, in die Interpretation einfließen. Dennoch sind bovine Zähne in vielen Studiendesigns etabliert, was diese auch untereinander vergleichbar macht. Klinisch höhere Relevanz hätten dennoch humane Zähne.

5.3 Analyseverfahren

5.3.1 LIVE/DEAD® Auswertung

Mit Hilfe der LIVE/DEAD® *BacLight*™ Analyse wurde der Biofilm angefärbt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dieses Verfahren ist durch seine Zuverlässigkeit, einfache Handhabung und gutem Kontrast der Färbung anderen Verfahren vorzuziehen [16,40,103]. Die Auswertung der Bedeckung erfolgte mit ImageJ. Die lizenzenfreie Software ist bereits seit 1987 erhältlich und hat in der Wissenschaft bereits Einzug gefunden [53,95]. Für die Analyse von Bilddateien gehört sie zu den am häufigsten genutzten Anwendungen. Die Bakterien wurden manuell erfasst und anschließend wurden diese Pixel der Gesamtheit der Pixel gegenübergestellt. Für die Analyse der Vitalität wurde das Programm MATLAB™ verwendet. Dieses multifunktionelle, kommerzielle Programm erschien 1984. Überwiegend für Datenauswertung und

Analyse genutzt, findet es insbesondere an Hochschulen und in der Industrie Anwendung und ist durch verschiedene sogenannte Add-Ons vielseitig erweiterbar, wodurch Bildanalysen möglich sind. Hierzu wurde ein eigenes von der Universität des Saarlandes, Abteilung Experimentalphysik, entwickeltes Programm genutzt. Dieses nutzt zur Erfassung von Bakterien zusätzlich zu Pixeln deren Helligkeit und Farbsättigung.

Durch mehrschichtigen Biofilm kommt es zuweilen zu Überlagerungen und daher zu Ungenauigkeiten. Um Überlagerungseffekte auszugleichen, wurden solche Bakterien, die das Programm erkannt hat, zu 50 % als LIVE und 50 % als DEAD gewertet. Durch die Farbstoffe, die Nukleinsäure anfärben, erscheinen sich teilende Bakterien heller. Ebenso zeigt sich ein Unterschied bei verschiedenen Bakterienspezies. Auch die Belichtungszeit des FM spielt eine Rolle bei der Darstellung der Bakterien. Denn bei großen Bakterienansammlungen wird die Belichtung reduziert, um übermäßige Helligkeit zu verhindern. Ansonsten würden diese als einziger Farbfleck dargestellt werden. Nachteilig ist hierbei, dass in weniger dichten Bereichen die Bakterien nur unzureichend dargestellt werden. Die Vitalität hat zudem bei weniger bedeckten PK eine geringere Aussagekraft. Denn in diesem Fall haben wenige Bakterien einen größeren Einfluss auf das Gesamtergebnis als eine repräsentativer Menge.

5.3.2 REM Auswertung

Zusätzlich wurde die LIVE/DEAD Untersuchung durch REM-Aufnahmen ergänzt. Durch die Kombination beider bildgebenden Methoden konnten mehr Informationen gewonnen werden. Das Rasterelektronenmikroskop erlaubt die Darstellung der Oberflächenstruktur von Bakterien und Biofilm. Weiterhin können Artefakte und ähnliches durch die Mehrinformationen besser erfasst werden [13,71]. Die LIVE/DEAD Aufnahmen dienen nur der Interpretation lebender und toter Bakterien. Die REM-Aufnahmen werden in einem kontrastreichen, grauen Bild dargestellt. Daher sind Auflösung, Kontrastbildung und die gesamte Bildqualität entscheidend für eine adäquate Beurteilung [13]. Da die Aufnahmen zum Teil mit großer Vergrößerung gemacht werden, ist das Blickfeld stark eingeschränkt. So lassen sich Ergebnisse einzelner Ausschnitte nicht auf die Gesamtheit des PK übertragen.

5.3.3 TEM Auswertung

Die TEM Analyse ergänzt die anderen Auswertungen um eine weitere Ebene. Bei der Darstellung wird der Prüfkörper längs angeschnitten und erlaubt so eine Beurteilung der Biofilmdicke. Zudem kann die Ultrastruktur des Biofilms und der Pellikel betrachtet werden [98]. Wie bei der REM Analyse wird das Bild in grau dargestellt und ausgewertet. Die Anfertigung von

Ultradünnsschnitten (50-70 nm) führt häufig zu Stauchungen der Probe. Die so entstandenen Artefakte stellen sich als schwarz dar und machen den Bereich unmöglich zu beurteilen (Abb. 26). Die Methode hat den Nachteil, dass unter Umständen ein Bereich des PK angeschnitten wurde, der einen dünnen Biofilm aufweist. Daher decken sich die TEM-Ergebnisse manchmal nicht mit den Ergebnissen der anderen beiden Methoden. Zudem lässt sich durch eine TEM-Aufnahme kein Rückschluss auf die Gesamtheit des Präparats schließen. Innerhalb eines Probanden variierte zudem der Kontrast, also die Elektronendichte, was wahrscheinlich auf unterschiedliche Schichtstärken zurückzuführen ist. Mitunter sind auch Ablösungsartefakte zu finden, was die Beurteilung dieses Bereiches erschwert. Die Gesamtheit aller drei Methoden, unter Berücksichtigung der Fehlerquellen, lässt eine gute Analyse der Präparate zu.

5.4 Diskussion der Ergebnisse

5.4.1 Negativkontrolle (Wasser)

Die PK waren im Mittel zu 68 % bedeckt. Die Unterschiede zwischen den Probanden waren hoch, teilweise bis zu 30 %. Vergleichbare Studien quantifizieren häufig die Anzahl der Bakterien bzw. Anzahl der Kolonien und nicht die prozentuale Bedeckung [52]. Das macht die Vergleichbarkeit schwierig. In einigen wenigen Studien, welche nach 48 h Tagedauer die Proben analysierten, zeigte sich eine vergleichbare Bedeckung [43,78]. Die Vitalität war im Mittel bei 63 % und deckt sich mit Ergebnissen aus der Literatur [8,78]. Sowohl tote als auch lebende Bakterien sind vorhanden. Da Wasser keinen Effekt hat, können insbesondere in der Anfangsphase der Biofilmbildung die Speichelproteine auf den Biofilm wirken. Die antibakteriellen Komponenten führen dazu, dass sich tote Bakterien auf der Schmelzoberfläche sammeln. An diese lagern sich schließlich weitere Bakterien an, die dann einen größeren Biofilm bilden. Die bakterielle Biofilmbildung überlagert dann den antibakteriellen Effekt des Speichels [7]. Mit dem REM wird die Oberfläche des Biofilms dargestellt. Es sind Bakterien dargestellt, die eine kugelförmige Struktur aufweisen. Dieser aufliegend finden sich fadenförmige und kugelförmige elektronendichte Aggregate. Es könnte sich dabei um Polysaccharide der Zellmembran oder Teile der extrazellulären Matrix handeln [49,100]. Eine genaue Bestimmung lässt sich durch die Aufnahme nicht vornehmen. Die TEM-Aufnahmen zeigen einen dichten, dicken Biofilm. Einzelne Bakterien sind erkennbar, da sie elektronendichter als ihre Umgebung sind. Die Dicke beträgt im Mittel 7000 nm. Die Pellikel ist elektronendichter und es sind homogene Aggregate zu finden. Es handelt sich vermutlich um Proteinaggregate. Eine genaue Beurteilung

der Bakterienspezies ist nicht möglich. Die Ergebnisse der TEM-Bilder decken sich mit denen aus der Literatur [40,78].

5.4.2 Positivkontrolle (CHX)

Für die Positivkontrolle wurde eine 0,2 %ige CHX Lösung verwendet. Eine solche findet bereits seit Jahren Anwendung in der Zahnmedizin und gilt als der Goldstandard [58,79]. In dieser Versuchsreihe zeigte CHX bezogen auf Vitalität und Bedeckung das beste Ergebnis. Bei jedem Probanden zeigt sich ein starker Rückgang, jedoch auch mit individuellen Unterschieden. Die Ergebnisse sind auf die Fähigkeit von CHX, sich an die Pellicel zu binden und so einen langanhaltenden und direkten Effekt zu vermitteln, zurückzuführen. Die REM-Analyse zeigt keinen klar strukturierten Biofilm. Es sind verglichen mit der Negativkontrolle größere Aggregate zu erkennen, die zum Teil keine eindeutige Form aufweisen. Es könnte sich hierbei um Proteinagglomerate handeln. Andererseits ist bekannt, dass CHX mit Proteinen der Pellicel eine Bindung eingeht und diese dann als elektronendichte Strukturen dargestellt werden könnten [78,86,88,89]. Die REM-Aufnahme zeigt den antiadhärenten Effekt von CHX und es ist keine klare Biofilm-Struktur erkennbar. In den TEM-Aufnahmen zeigt sich deutlich die geringe Biofilmdicke. Die Pellicel-Schicht ist elektronendicht verbreitert. Dies könnte auf die Bindung von CHX mit den Pellicel-Proteinen zurückzuführen sein. Die größeren elektronendichten Strukturen zeigen eine kugelähnliche Form, dennoch keine klare Struktur. Vermutlich handelt es sich um Proteinaggregationen. Diese Ergebnisse der TEM-Analyse decken sich mit den Ergebnissen anderer Studien [78].

5.4.3 Natriumfluorid

Natriumfluorid wurde in der Konzentration 500 ppm F⁻ verwendet. Die bakterielle Bedeckung war mit einem Mittelwert von 46 % vergleichsweise hoch. In dieser Versuchsreihe waren allerdings die Unterschiede unter den Probanden am höchsten. So zeigte ein Proband 95 % Bedeckung, während die andern im Mittel bei 20-30 % lagen. Daher hat der Mittelwert geringe Aussagekraft. Diese Abweichung zeigt sich nicht bei der Vitalität, welche bei 58 % lag. Die Vitalität war vergleichbar hoch mit der der Negativkontrolle Wasser. Dies lässt sich darauf zurückzuführen, dass Natriumfluorid geringe bis keine antibakteriellen Eigenschaften aufweist [28,63,89]. Die Ergebnisse lassen sich mit antiadhärenten Eigenschaften von Fluoriden begründen [61,63,77]. Die Abweichung des einen Probanden könnte auf eine fehlerhafte Versuchsdurchführung seitens des Probanden, oder auf einen probandenspezifischen Effekt zurückzuführen sein. Die Ergebnisse des REM sind mit denen der Negativkontrolle vergleichbar. Die

Oberflächenstruktur ähnelt dieser stark. Auch die TEM-Aufnahmen zeigen ein vergleichbares Bild. Lediglich ein Proband hatte keine klar erkennbaren Bakterien oder andere Strukturen. Vermutlich wurden bei diesem Probanden Areale angeschnitten, die vornehmlich keine lebenden Bakterien enthielten. Besondere Veränderungen der Pellicel-Schicht oder der Oberflächenstruktur waren bei keinem der Probanden zu erkennen. Dies deckt sich auch mit den Schlussfolgerungen anderer Studien, nach denen Natriumfluorid allein keinen signifikanten antibakteriellen Effekt zeigt, insbesondere bei der Anwendung auf bereits gebildetem Biofilms. Demnach kann eine verminderte initiale Adhäsion als Erklärung für die Ergebnisse in Betracht gezogen werden kann.

5.4.4 Tanninsäure

Mit Tanninsäure wurde in diesem Versuch in 5 %iger Konzentration gespült. Antibakterielle Eigenschaften der Tanninsäure und deren Gruppenvertreter der Polyphenole sind bereits bekannt. Auch in anderen Studien konnten diese nachgewiesen werden [33,42,56,62,91,92,106]. Auch besteht die Fähigkeit zur Veränderung der Pellicel-Struktur oder Ausfällung von Proteinen [56,57]. Die Ergebnisse der Spülung zeigen eine signifikante Reduktion der bakteriellen Bedeckung auf bis zu 25 % im Mittel. Damit decken sich die Ergebnisse hinsichtlich der anti-adhärenen Wirkung der Tanninsäure mit denen aus der Literatur [46,59]. In vielen dieser Studien konnte der Effekt insgesamt für Polyphenole gezeigt werden [77]. Verglichen mit dieser Versuchsreihe variiert das Studiendesign insgesamt. Die Vitalität konnte auf bis unter 40 % reduziert werden. Die Ergebnisse waren nicht so stark ausgeprägt wie bei der Positivkontrolle mit CHX. Insgesamt konnten relevante Ergebnisse erzielt werden, die sich für einen klinischen Einsatz eignen und die Mundhygiene unterstützen könnten.

Die Aufnahmen des REM decken sich mit denen des FM. Die elektronendichten Strukturen sind vergleichbar mit denen des CHX-Versuches. Auch hier waren Zellreste und lytische Bakterien erkennbar. Veränderungen der Schmelzoberfläche konnten nicht eindeutig beurteilt werden. Aufnahmen des TEM zeigen für Tanninsäure spezifische Ergebnisse. Elektronendichte Aggregate an der Pellicel-Schicht, lytische Bakterien und keine typische Biofilmstruktur zeigen sich auch in vergleichbaren Studien [90,106]. Auffallend waren Alterationen mit einer elektronendichten Erscheinung unterhalb der Schmelzoberfläche. Diese könnten auf erosive Veränderungen des Schmelzes hindeuten. Teilweise sind globuläre Strukturen erkennbar. Das könnte auch auf die hohe Tanninsäure-Konzentration zurückzuführen sein. Während der Spülung könnten sich auch Bakterien und Proteine in den Hohlräumen eingelagert haben. Vergleichbare Studien hatten zum Teil eine deutlich niedrigere Konzentration und konnten daher diese

Ergebnisse nicht zeigen. Dennoch ist zu erwähnen, dass diese erosiven Veränderungen die klinische Anwendbarkeit zur täglichen Mundhygiene reduzieren. Auch extrinsische Zahnverfärbungen wurden bereits beobachtet und sind nicht zu vernachlässigen [83]. Bei der Anwendung von CHX treten diese ebenfalls auf [6,14,94].

5.4.5 Tanninsäure und Natriumfluorid

Ausgangshypothese war die einzelnen Effekte der beiden Wirkstoffe zu kombinieren, um einen kumulativen antibakteriellen Effekt zu erzeugen. Auch im Hinblick auf die erosiven Veränderungen gab es die Überlegung diese Areale zu remineralisieren. Die bakterielle Bedeckung der PK konnte im Vergleich mit reiner Tanninsäure weiter um circa 15 % im Mittel gesenkt werden. Die Vitalität hingegen blieb nahezu unverändert. Das könnte ein Hinweis auf eine mögliche Verstärkung des antiadhärenten Effekt sein [46,61,63]. Zu diesem speziellen Versuchsaufbau sind in der Literatur keine vergleichbaren Studien verfügbar, weshalb dieses Ergebnis nicht eingeordnet werden kann. Sicher ist, dass vier Probanden eine zu geringe Anzahl sind, um konkrete Aussagen abzuleiten. Die Ergebnisse des REM bestätigen dies hinsichtlich der bakteriellen Bedeckung. In der Morphologie unterscheiden sich diese Proben nicht. In den TEM-Aufnahmen zeigt sich ein vergleichbares Bild wie bei reiner Tanninsäure. Dieses ist allerdings weniger elektronendicht. Die Alterationen der Schmelzoberfläche waren weiterhin vorhanden. Daher muss angenommen werden, dass während des erosiven Angriffs der Tanninsäure ($\text{pH} = 2,3$) keine quantifizierbare Remineralisation durch Natriumfluorid erfolgt ist. Auch wurden die typischen Erscheinungen der Tanninsäure nicht abgemildert. Hinweise auf einen kumulativen antibakteriellen Effekt konnten demnach nicht gefunden werden.

5.4.6 Phosphatpuffer

Die Spülösung mit 150 mM Phosphatpuffer wurde als weitere Kontrolllösung eingebracht. Da die erosiven Effekte der Tanninsäure nicht mit Natriumfluorid aufgehoben werden konnten, wurde ein Pilotversuch mit zwei Probanden gestartet. Der pH von 2,3 des Tanninsäure-Versuchs liegt unter dem kritischen pH -Wert des humanen Zahnschmelzes. Daher wurde eine Pufferkonzentration gewählt, die nach Kombination mit Tanninsäure diesen auf ein unkritisches Niveau anhebt. Mit einem 150 mM starken Puffer ($\text{pH} = 7,5$) konnte der pH Wert auf 5,5 erhöht werden. Um unerwünschte und unbekannte Wechselwirkungen auszuschließen, wurde zunächst mit reinem Phosphatpuffer gespült. Zu diesem Versuchsaufbau finden sich keine vergleichbaren Studien, sodass die Ergebnisse nicht mit anderen in den Diskurs gebracht werden können. In den wenigen Studien wurden Pufferlösungen oft als Zugabe zu einer Spülösung,

und damit nicht als reiner Puffer, verwendet [4,67,82,84,105]. Zudem handelt es sich häufig um *in-vitro* Studien.

Die Bedeckung ist vergleichbar mit der Negativkontrolle Wasser, bezogen auf den Mittelwert sogar etwas höher. Möglicherweise ist das darauf zurückzuführen, dass die Pufferlösung mit dem Speichel interagiert. Es könnte den Speichelpuffer beeinflussen, die Proteinadhäsion oder den antibakteriellen Effekt. Die Ergebnisse von zwei Probanden können hier allerdings nur einen Hinweis liefern. Die Zusammenhänge sind weiter zu untersuchen. Die Vitalität war ähnlich zu der Negativkontrolle Wasser. Die REM-Analyse bestätigte diese Ergebnisse. Es zeigten sich keine morphologischen Unterschiede verglichen mit der Negativkontrolle. Die TEM-Aufnahmen zeigten bei einem Probanden eine geringe Dicke des Biofilms. Auch ist der gesamte Biofilm inkonstant und überwiegend nicht elektronendicht. Möglicherweise sind Ablösungsartefakte und Schnittartefakte dafür verantwortlich. Die Ergebnisse sind mit denen der Negativkontrolle Wasser vergleichbar. Ob die hohe Bedeckung des PK auf eine mögliche Interaktion des Puffers zurückzuführen ist oder lediglich ein zufälliger Befund der Probanden ist, lässt sich mit den vorliegenden Daten nicht abschließend klären.

5.4.7 Tanninsäure und Phosphatpuffer

Die Kombination der Tanninsäure und des Phosphatpuffers zeigte bei der Bedeckung ähnliche Ergebnisse wie bei der Spülung mit reiner Tanninsäure. Eine so starke Reduktion wie bei CHX und der Tanninsäure und Natriumfluorid Kombination konnte nicht erzielt werden. Die Vitalität war niedriger als bei reiner Tanninsäure und der Kombination mit Natriumfluorid. Es lässt sich erkennen, dass diese Spülkombination zu einer Reduktion der Vitalität, aber vermehrter Bedeckung geführt hat, verglichen mit den anderen Tanninsäure Spüllösungen. Die vermehrte Bedeckung wurde bereits bei der Kontrolllösung mit Phosphatpuffer beobachtet. Bei dem REM-Ergebnissen konnten die Beobachtungen der FM bestätigt werden. Die Oberflächenmorphologie zeigt zunehmend runde Strukturen im Sinne von Bakterien. Daneben finden sich elektronendichte Areale ohne erkennbare Struktur. Diese ähnelt den Ergebnissen der anderen Tanninsäure-Spüllösungen. Es waren keine Besonderheiten im Vergleich zu erkennen.

Die TEM-Aufnahmen zeigen elektronendichte Strukturen, die für Tanninsäure typisch sind. Sie finden sich auch bei den anderen Versuchen. Bei diesem Versuch erscheinen diese geringfügig weniger elektronendicht, die Pellicel ist schwach hervorgehoben. Es sind sehr wenige intakte Bakterien in den TEM-Aufnahmen zu erkennen, was den Ergebnissen aus FM und REM widerspricht. Der unstrukturierte, maturierte Biofilm ist im direkten Vergleich jedoch dicker.

Auffällig ist, dass nun unterhalb der Schmelzoberfläche keine Veränderungen zu erkennen sind. Verglichen mit den TEM-Aufnahmen der reinen Tanninsäure ist diese durchgängig gleichförmig. Teilweise sind elektronendichtere konzentrierte Areale zu finden. Es könnte sich um Artefakte oder um Proteinaggregation nahe der Pellikel-Schicht und Schmelzoberfläche handeln.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Kombination mit Phosphatpuffer einen positiven Einfluss auf das erosive Verhalten der Tanninsäure hat. Gleichzeitig ist Pufferlösung durch die regelmäßigen Spülungen in erhöhter Konzentration vorhanden, diese könnte möglicherweise einen Säureangriff abpuffern. In der Literatur finden sich hierzu Studien, die sich mit dem Einfluss verschiedener Testlösungen auf den pH-Wert des Biofilm, der Pellikel und des Speichels befassen [26,48,67,81,82,84]. Diese bieten einen Erklärungsansatz. Zum einen könnte der pH-Wert des Speichels schneller wieder erhöht worden sein nach dem Säureangriff. Zum anderen spielt die Pellikel eine wichtige Rolle. Messias *et al.* (2010) konnten zeigen, dass bei Anwendung eines Natriumbicarbonat-Puffers zwar weniger Oberflächenverlust bei erodiertem Schmelz eintrat, die verringerte Härte des Schmelzes aber nicht positiv beeinflusst werden konnte. Somit könnte der Schmelz zwar weiterhin erosiv geschädigt sein, aber nicht stark genug, damit es zu Infiltrationen kommen konnte. Der pH-Wert des Biofilms ist vor allem abhängig vom vorhandenen Säure-Typ und der Pufferkapazität [48].

Daher sind die Ergebnisse bezogen auf Erosion nur für diese *in-situ* Studie anwendbar. In der Realität ist der Schmelz zusätzlichem Säureangriff aus der Nahrung und von Bakterien ausgesetzt. Zumindest in dieser Versuchsreihe mit zwei Probanden konnte gezeigt werden, dass auch mit gepufferter Tanninsäure eine signifikante Bakterienreduktion möglich ist. Da bei zwei Probanden spezifische Effekte deutlicher das Gesamtergebnis beeinflussen, können keine generellen Schlussfolgerungen postuliert werden.

5.5 Schlussfolgerungen

Für die Anwendung als antibakterielle orale Spülösung wird klinisch insbesondere CHX eingesetzt. In der Kariesprävention kommen Fluoridverbindungen zum Einsatz. Tanninsäure gilt als vielversprechendes orales Antiseptikum. Die antibakteriellen und antiadhärenten Wirkungen konnten auch in dieser Studie gezeigt werden. Natriumfluorid allein konnte keine ausreichende antibakterielle Wirkung zeigen und ist daher nicht als solches geeignet. Die Ergebnisse werden von der Literatur gestützt. Die Tanninsäure-Kombination mit Natriumfluorid konnte geringfügig bessere Reduktion der bakteriellen Besiedelung erzielen. Ein kumulativer antiadhärenter Effekt könnte dafür verantwortlich sein. Weitere Versuche mit deutlich mehr

Probanden wären nötig, um dieses Ergebnis zu validieren. Die unerwünschten erosiven Veränderungen der Schmelzoberfläche durch Tanninsäure konnten mit dieser Kombination nicht verhindert werden. Gepufferte Tanninsäure zeigte einen vergleichbar guten antibakteriellen und antiadhärenten Effekt. Die unerwünschten erosiven Veränderungen konnten in diesem Versuch verhindert werden. Die Wirkung konnte ohne den sauren Charakter reproduziert werden, was die gepufferte Tanninsäure zu einem vielversprechenden klinischen Antiseptikum macht. Die genauen Wirkmechanismen, insbesondere des Puffers, sind weiter zu analysieren. In dieser Studie konnten nur mittelfristige Ergebnisse bis 48 h erfasst werden. Es sind im Hinblick auf unerwünschte Nebenwirkungen Untersuchungen über einen längeren Zeitraum nötig. Zudem müssen weitere Studien mit mehr Probanden durchgeführt werden. Auch muss die Probandengruppe erweitert werden, damit das Gesamtbild der Gesellschaft abgebildet werden kann, und um so ein klinisch relevantes Ergebnis zu erhalten. Die sehr gute Wirkung von CHX konnte nicht erreicht oder übertroffen werden, sodass Tanninsäure nicht als vollwertige Alternative zu sehen ist.

6 Literaturverzeichnis

1. Aashique Md, Roy A, Kosuru RY, Bera S (2021) Membrane Depolarization Sensitizes *Pseudomonas aeruginosa* Against Tannic Acid. *Curr Microbiol* 78:713–717
2. Abbas DK, Skjørland KK, Gjermo P, Sønju T (1985) Chemical and morphological studies of the acquired pellicle formed subgingivally on dentin in vivo. *Acta Odontol Scand* 43:31–37
3. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM, Milosevic A (1999) Thickness of Acquired Salivary Pellicle as a Determinant of the Sites of Dental Erosion. *J Dent Res* 78:1821–1828
4. Amaral Silva D, Al-Gousous J, Davies NM, Bou Chakra N, Webster GK, Lipka E, Amidon G, Löbenberg R (2019) Simulated, biorelevant, clinically relevant or physiologically relevant dissolution media: The hidden role of bicarbonate buffer. *Eur J Pharm Biopharm* 142:8–19
5. Ammon HPT, Schubert-Zsilavecz M, Hunnius C, Herausgeber (2014) Hunnius pharmazeutisches Wörterbuch. 11. aktualisierte edition. De Gruyter Verlag, Berlin
6. Andruccioli MCD, Ferreira Amato PA, Kuchler ÉC, Matsumoto MAN, Bergamo AZN, Silva RABD, Silva LABD, Nelson-Filho P (2023) Effect of chlorhexidine mouthwashes on periodontal parameters and extrinsic tooth staining in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 164:855–861
7. 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
8. Auschill TM, Hein N, Hellwig E, Follo M, Sculean A, Arweiler NB (2005) Effect of two antimicrobial agents on early in situ biofilm formation. *J Clin Periodontol* 32:147–152
9. Autio-Gold J (2008) The Role of Chlorhexidine in Caries Prevention. *Oper Dent* 33:710–716
10. Axelsson P, Lindhe J (1981) Effect of controlled oral hygiene procedures on caries and periodontal disease in adults. Results after 6 years. *J Clin Periodontol* 8:239–248
11. Balducci E, Papi F, Capialbi DE, Del Bino L (2023) Polysaccharides' Structures and Functions in Biofilm Architecture of Antimicrobial-Resistant (AMR) Pathogens. *Int J Mol Sci* 24:4030
12. Bennick A (2002) Interaction of plant Polyphenols with salivary Proteins. *Crit Rev Oral Biol Med* 13:184–196

13. Bergmans L, Moisiadis P, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P (2005) Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM. *Int Endodontic J* 38:775–788
14. Bescos R, Ashworth A, Cutler C, Brookes ZL, Belfield L, Rodiles A, Casas-Agustench P, Farnham G, Liddle L, Burleigh M, White D, Easton C, Hickson M (2020) Effects of Chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. *Sci Rep* 10:5254
15. Bogdanova K, Kolar M, Langova K, Dusek M, Mikyska A, Bostikova V, Bostik P, Olsovská J (2018) Inhibitory effect of hop fractions against Gram-positive multi-resistant bacteria. A pilot study. *Biomed Pap* 162:276–283
16. Boulos L, Prevost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R (1999) LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods* 37:77–86
17. Brand H, Tjoe Fat G, Veerman E (2009) The effects of saliva on the erosive potential of three different wines. *Aust Dent J* 54:228–232
18. Brantner A, Grein E (1994) Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 44:35–40
19. Brecx M, Theilade J, Attström R, Glantz P -O. (1987) The effect of chlorhexidine and Octapinol® on early human plaque formation. A light and electron microscopic study. *J Periodontal Res* 22:290–295
20. Brecx M, Brownsfone E, MacDonald L, Gelskey S, Cheang M (1992) Efficacy of Listerine®, Meridol® and chlorhexidine mouthrinses as supplements to regular tooth-cleaning measures. *J Clin Periodontol* 19:202–207
21. Busscher HJ, Van Der Mei HC (1997) Physico-Chemical Interactions in Initial Microbial Adhesion and Relevance for Biofilm Formation. *Adv Dent Res* 11:24–32
22. Cao CF, Sun XP (1998) Herbal medicine for periodontal diseases. *Int Dent J* 48:316–321
23. Castilho ARFD, Salomão PMA, Buzalaf MAR, Magalhães AC (2015) Protective effect of experimental mouthrinses containing NaF and TiF4 on dentin erosive loss in vitro. *J Appl Oral Sci* 23:486–490
24. Chapple ILC, Van Der Weijden F, Doerfer C, Herrera D, Shapira L, Polak D, Madianos P, Louropoulou A, Machtei E, Donos N, Greenwell H, Van Winkelhoff AJ, Eren Kuru B, Arweiler N, Teughels W, Aimetti M, Molina A, Montero E, Graziani F (2015) Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. *J Clin Periodontol* 42:71–76
25. Davies D (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2:114–122

26. Dehghan M, Tantbirojn D, Kymer-Davis E, Stewart CW, Zhang YH, Versluis A, Garcia-Godoy F (2017) Neutralizing salivary pH by mouthwashes after an acidic challenge. *J Invest Clin Dent* 8:e12198
27. Donovan T, Nguyen-Ngoc C, Abd Alraheam I, Irusa K (2021) Contemporary diagnosis and management of dental erosion. *J Esthet Restor Dent* 33:78–87
28. Duschner H, Uchtmann H (1988) Effect of Sodium Fluoride, Stannous Fluoride, Amine Hydrofluoride and Sodium Monofluorophosphate on the Formation of Precipitates Adhering to Bovine Enamel. *Caries Res* 22:65–71
29. Eid Abdelmagyd HA, Ram Shetty DS, Musa Musleh Al-Ahmari DM (2019) Herbal medicine as adjunct in periodontal therapies- A review of clinical trials in past decade. *J Oral Biol Craniofacial Res* 9:212–217
30. Eley BM (1999) Antibacterial agents in the control of supragingival plaque — a review. *Br Dent J* 186:286–296
31. Elumalai M, Bhuminathan S, Tamizhesai B (2014) Herbs Used in Dentistry. *Biomed Pharmacol J* 7:213–214
32. Flemming H-C, Van Hullebusch ED, Neu TR, Nielsen PH, Seviour T, Stoodley P, Wingender J, Wuertz S (2023) The biofilm matrix: multitasking in a shared space. *Nat Rev Microbiol* 21:70–86
33. Flemming J, Meyer-Probst CT, Speer K, Kölling-Speer I, Hannig C, Hannig M (2021) Preventive Applications of Polyphenols in Dentistry—A Review. *Int J Mol Sci* 22:4892
34. Frazier RA, Deaville ER, Green RJ, Stringano E, Willoughby I, Plant J, Mueller-Harvey I (2010) Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *J Pharm Biomed Anal* 51:490–495
35. Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Laverty D, Dietrich T (2017) Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. *J Clin Periodontol* 44:94–105
36. Gold V (2019) The IUPAC Compendium of Chemical Terminology: The Gold Book. 4. edition. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Research Triangle Park, NC
37. Gunjan K, Jalaluddin Md, Purnendu R, Rajat M, Dileep C.L. (2013) Emerging Trends of Herbal Care in Dentistry. *J Clin Diagn Res* 1827–1829
38. Guven Y, Ustun N, Tuna EB, Aktoren O (2019) Antimicrobial Effect of Newly Formulated Toothpastes and a Mouthrinse on Specific Microorganisms: An In Vitro Study. *Eur J Dent* 13:172–177

39. Hannig C, Hannig M, Attin T (2005) Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci* 113:2–13
40. Hannig C, Hannig M, Rehmer O, Braun G, Hellwig E, Al-Ahmad A (2007) Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. *Arch Oral Biol* 52:1048–1056
41. Hannig C, Hannig M (2009) The oral cavity—a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Invest* 13:123–139
42. Hannig C, Sorg J, Spitzmüller B, Hannig M, Al-Ahmad A (2009) Polyphenolic beverages reduce initial bacterial adherence to enamel in situ. *J Dent* 37:560–566
43. Hannig C, Gaeding A, Basche S, Richter G, Helbig R, Hannig M (2013) Effect of Conventional Mouthrinses on Initial Bioadhesion to Enamel and Dentin in situ. *Caries Res* 47:150–161
44. Hattab, Faiez N. (2013) Remineralisation of Carious Lesions and Fluoride Uptake by Enamel Exposed to Various Fluoride Dentifrices In Vitro. *Oral Health Prev Dent* 11:281–290
45. Hellwig E, Schäfer E, Klimek J, Attin T (2018) Einführung in die Zahnerhaltung: Prüfungswissen Kariologie und Parodontologie. 7. überarbeitete edition. Deutscher Ärzteverlag, Köln
46. 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
47. Hertel S, Basche S, Schmidt V, Staszyk C, Hannig C, Sterzenbach T, Hannig M (2023) Erosion behaviour of human, bovine and equine dental hard tissues. *Sci Rep* 13:19617
48. Higham SM, Edgar WM (1989) Human dental plaque pH, and the organic acid and free amino acid profiles in plaque fluid, after sucrose rinsing. *Arch Oral Biol* 34:329–334
49. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N (2009) Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. *J Dent Res* 88:982–990
50. Horn F (2015) Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium. 6., überarbeitete edition. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York
51. Jakubovics NS, Goodman SD, Mashburn-Warren L, Stafford GP, Cieplik F (2021) The dental plaque biofilm matrix. *Periodontol 2000* 86:32–56
52. Jenkins S, Addy M, Wade W (1988) The mechanism of action of chlorhexidine: A study of plaque growth on enamel inserts in vivo. *J Clin Periodontol* 15:415–424

53. Jensen EC (2013) Quantitative Analysis of Histological Staining and Fluorescence Using ImageJ. *Anat Rec* 296:378–381
54. Jeon J-G, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H (2011) Natural Products in Caries Research: Current (Limited) Knowledge, Challenges and Future Perspective. *Caries Res* 45:243–263
55. Jindal R, Singh S (2010) Evaluating the buffering capacity of various soft drinks, fruit juices and tea. *J Conserv Dent* 13:129
56. Joiner A, Muller D, Elofsson UM, Malmsten M, Arnebrant T (2003) Adsorption from black tea and red wine onto *in vitro* salivary pellicles studied by ellipsometry. *Eur J Oral Sci* 111:417–422
57. Joiner A, Muller D, Elofsson UM, Arnebrant T (2004) Ellipsometry analysis of the *in vitro* adsorption of tea polyphenols onto salivary pellicles. *Eur J Oral Sci* 112:510–515
58. Jones CG (1997) Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol 2000* 15:55–62
59. Kaczmarek B (2020) Tannic Acid with Antiviral and Antibacterial Activity as A Promising Component of Biomaterials—A Minireview. *Materials* 13:3224
60. Kala BS, Gunjan C, Disha N, Shobha P (2015) Treatment of Periodontal Disease – A Herbal Approach. *Int J Pharm Sci Res* 33(2):126–136
61. 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
62. Khan NS, Ahmad A, Hadi SM (2000) Anti-oxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. *Chem Biol Interact* 125:177–189
63. Kirsch J, Hannig M, Winkel P, Basche S, Leis B, Pütz N, Kensche A, Hannig C (2019) Influence of pure fluorides and stannous ions on the initial bacterial colonization *in situ*. *Sci Rep* 9:18499
64. Kumar S, Patel S, Tadakamadla J, Tibdewal H, Duraiswamy P, Kulkarni S (2013) Effectiveness of a mouthrinse containing active ingredients in addition to chlorhexidine and triclosan compared with chlorhexidine and triclosan rinses on plaque, gingivitis, supragingival calculus and extrinsic staining. *Int J Dent Hyg* 11:35–40
65. Kuyyakanond T, Quesnel LB (1992) The mechanism of action of chlorhexidine. *FEMS Microbiol Lett* 100:211–215
66. Kwon T, Lamster IB, Levin L (2021) Current Concepts in the Management of Periodontitis. *Int Dent J* 71:462–476

67. Levine RS (1972) Remineralization of human carious dentine in vitro. *Arch Oral Biol* 17:1005–1008
68. Liao C-H, Shollenberger LM (2003) Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline*. *Lett Appl Microbiol* 37:45–50
69. Lindquist B, Lingström P, Fändriks L, Birkhed D (2011) Influence of five neutralizing products on intra-oral pH after rinsing with simulated gastric acid: Neutralisation of intra-oral pH. *Eur J Oral Sci* 119:301–304
70. Löe H (2000) Oral hygiene in the prevention of caries and periodontal disease. *Int Dent J* 50:129–139
71. Luciani L, Stefanetti V, Rampacci E, Gobbi P, Valentini L, Capuozzo R, Passamonti F (2023) Comparison between clinical evaluations and laboratory findings and the impact of biofilm on antimicrobial susceptibility in vitro in canine otitis externa. *Vet Dermatol* 34:586–596
72. Lussi A, Jaeggi T (2008) Erosion—diagnosis and risk factors. *Clin Oral Invest* 12:5–13
73. Lussi A, Megert B, Shellis P (2023) Die erosive Wirkung verschiedener Getränke, Speisen, Genussmittel, Medikamente und Mundspülungen auf den menschlichen Zahnschmelz. *Swiss Dent J* 133:457–471
74. Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Buzalaf MAR, Lussi A (2011) Fluoride in dental erosion. *Monogr Oral Sci* 22:158–170
75. Malhotra R, Kapoor A, Grover V, Saxena D (2011) Comparison of the effectiveness of a commercially available herbal mouthrinse with chlorhexidine gluconate at the clinical and patient level. *J Indian Soc Periodontol* 15:349
76. Marsh PD (2004) Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Res* 38:204–211
77. Marsh PD (2010) Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *J Dent* 38:S11–S15
78. Martínez-Hernández M, Reda B, Hannig M (2020) Chlorhexidine rinsing inhibits biofilm formation and causes biofilm disruption on dental enamel in situ. *Clin Oral Invest* 24:3843–3853
79. Mathur S, Mathur T, Srivastava R, Khatri R (2011) Chlorhexidine: The Gold Standard in Chemical Plaque Control. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol* 1:45–50
80. Max Rubner-Institut (2014) Ernährungsphysiologische Bewertung von Milch und Milchprodukten und ihren Inhaltsstoffen: Bericht für das Kompetenzzentrum für Ernährung, Bayern November 2014. URL:

<https://www.mri.bund.de/fileadmin/MRI/News/Dateien/Ern%C3%A4hrungsphysiolog-Bewertung-Milch-Milchprodukte.pdf> aufgerufen am 20.01.2024

81. Messias DCF, Turssi CP, Hara AT, Serra MC (2010) Sodium bicarbonate solution as an anti-erosive agent against simulated endogenous erosion. *Eur J Oral Sci* 118:385–388
82. Nilner K, Vassilakos N, Birkhed D (1991) Effect of a buffering sugar-free lozenge on intraoral pH and electrochemical action. *Acta Odontol Scand* 49:267–272
83. Nordbås H (1977) Discoloration of dental pellicle by tannic acid. *Acta Odontol Scand* 35:305–310
84. Persson A, Lingström P, Bergdahl M, Claesson R, Dijken JWVV (2007) Buffering effect of a prophylactic gel on dental plaque in institutionalised elderly. *Gerodontology* 24:98–104
85. Poppolo Deus F, Ouanounou A (2022) Chlorhexidine in Dentistry: Pharmacology, Uses, and Adverse Effects. *Int Dent J* 72:269–277
86. Reda B, Hollemeyer K, Trautmann S, Hannig M, Volmer DA (2020) Determination of chlorhexidine retention in different oral sites using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Arch Oral Biol* 110:104623
87. Richards D (2014) Review finds that severe periodontitis affects 11% of the world population: Question: What is the global prevalence and incidence of severe periodontitis (SP)? *Evid Based Dent* 15:70–71
88. Rölla G, Melsen B (1975) On the Mechanism of the Plaque Inhibition by Chlorhexidine. *J Dent Res* 54:57–62
89. Sadat Sajadi F, Moradi M, Pardakhty A, Yazdizadeh R, Madani F (2015) Effect of Fluoride, Chlorhexidine and Fluoride-chlorhexidine Mouthwashes on Salivary *Streptococcus mutans* Count and the Prevalence of Oral Side Effects. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 9:49–52
90. Schestakow A, Hannig M (2020) Effects of Experimental Agents Containing Tannic Acid or Chitosan on the Bacterial Biofilm Formation in Situ. *Biomolecules* 10:1315
91. Schestakow A, Guth MS, Eisenmenger TA, Hannig M (2021) Evaluation of Anti-Biofilm Activity of Mouthrinses Containing Tannic Acid or Chitosan on Dentin In Situ. *Molecules* 26:1351
92. Schestakow A, Meyer-Probst CT, Hannig C, Hannig M (2023) Prevention of Dental Biofilm Formation with Polyphenols: A Systematic Review. *Planta Med* 89:1026–1033

93. Schiffner U (2021) Verwendung von Fluoriden zur Kariesprävention. *Bundesgesundheitsblatt* 64:830–837
94. Schittekk G, Blot S (2024) Chlorhexidine mouthwash reduces halitosis in surgical patients, but is it worth the risk? *Intensive Crit Care Nurs* 80:103563
95. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675
96. Shah R, Gayathri G, Mehta D (2015) Application of herbal products in management of periodontal diseases: A mini review. *Int J Oral Health Sci* 5:38
97. Shinada K, Tagashira M, Watanabe H, Sopapornamorn P, Kanayama A, Kanda T, Ikeda M, Kawaguchi Y (2007) Hop Bract Polyphenols Reduced Three-day Dental Plaque Regrowth. *J Dent Res* 86:848–851
98. Summers RG, Rusanowski PC (1973) A Scanning Electron Microscopic Evaluation of Section and Film Mounting for Transmission Electron Microscopy. *Stain Technol* 48:337–342
99. Sun FC, Engelman EE, McGuire JA, Kosmoski G, Carratello L, Ricci-Nittel D, Zhang JZ, Schemehorn BR, Gambogi RJ (2014) Impact of an Anticaries Mouthrinse on In Vitro Remineralization and Microbial Control. *Int J Dent* 2014:1–11
100. Sutherland I (2001) The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9:222–227
101. Tagashira M, Uchiyama K, Yoshimura T, Shirota M, Uemitsu N (1997) Inhibition by Hop Bract Polyphenols of Cellular Adherence and Water-insoluble Glucan Synthesis of Mutans Streptococci. *Biosci Biotechnol Biochem* 61:332–335
102. Taheri JB, Azimi S, Rafieian N, Akhavan Zanjani H (2011) Herbs in dentistry. *Int Dent J* 61:287–296
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. Thomas A, Hegde A, Mehta LK, Virdi MS (2019) Acidogenic Potential of Packaged Fruit Juices and its Effect on Plaque and Salivary pH. *Int J Clin Pediatr Dent* 12:312–317
105. Venkatasatya SRM, Wang HH, Alluri S, Ciancio SG (2017) Phosphate buffer-stabilized 0.1% chlorine dioxide oral rinse for managing medication-related osteonecrosis of the jaw. *Am J Dent* 30:350–352

106. Xi Q, Hoth-Hannig W, Deng S, Jin X, Fu B, Hannig M (2020) The effect of polyphenol-containing solutions on *in situ* biofilm formation on enamel and dentin. *J Dent* 102:103482
107. 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
108. Yu H, Oho T, Xu LX (1995) Effects of several tea components on acid resistance of human tooth enamel. *J Dent* 23:101–105
109. Zero DT, Lussi A (2005) Erosion — chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. *Int Dent J* 55:285–290
110. Zhang J, Kashket S (1998) Inhibition of Salivary Amylase by Black and Green Teas and Their Effects on the Intraoral Hydrolysis of Starch. *Caries Res* 32:233–238

7 Danksagung

Für die Überlassung des interessanten Themas und die ausgezeichnete Betreuung bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Matthias Hannig. Ich bedanke mich auch bei Herrn Norbert Pütz für die Unterweisung und Betreuung am Rasterelektronenmikroskop. Ebenso möchte ich Frau Vanessa Schmitt für die Erstellung der TEM-Bilder danken.

Frau PD Dr. Johanna Dudek und dem gesamten Forschungslabor danke ich für die vielen Einweisungen, Diskussionen und Hilfestellungen die mir ein sicheres und selbstständiges Arbeiten ermöglicht haben.

Meinen Kommilitonen danke ich für die Bereitschaft an dieser Studie teilzunehmen und sich allen Unannehmlichkeiten zu stellen. Und Frau Amelie Schmitz für das aufwendige Korrekturlesen.

Ganz Besonders möchte ich meiner Familie und meinen Freunden herzlich danken. Die Unterstützung auf seelischer Ebene trug entscheidend zur Motivation und zum Gelingen der Arbeit bei.

8 Lebenslauf

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