

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

Einfluss einer experimentellen Mundspülösung aus der *Fragaria vesca* auf die bakterielle Biofilm- Bildung auf Zahnschmelz *in-situ*

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

2025

vorgelegt von:

Linus Müldner

geb. am: 17.04.1996 in Heidelberg

Tag der Promotion: 27.11.2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. M. Hannig

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. dent. M. Hannig

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. phil. Sören Becker

Widmung

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis:

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1	Zusammenfassung	1
1.2	Abstract.....	3
2	EINLEITUNG	5
2.1	Der orale Biofilm – Einführung.....	5
2.2	Mundspülungen	7
2.3	Ziel der Arbeit / Fragestellung.....	12
3	MATERIAL UND METHODE	13
3.1	Probanden	13
3.2	Herstellung der Prüfkörper	13
3.3	Herstellung der Trageschienen	14
3.4	Herstellung der Prüfsubstanzen	15
3.5	Versuchsablauf	17
3.6	LIVE/DEAD® Bac Light™	19
3.7	Statistik	20
3.8	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	20
3.9	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	21
4	ERGEBNISSE	22
4.1	Proband 1	23
4.2	Proband 2	28

4.3	Proband 3	33
4.4	Proband 4	38
4.5	Proband 5	48
4.6	Zusammenfassung aller Probanden	53
5	DISKUSSION	56
5.1	Diskussion von Material und Methode	56
5.2	Diskussion Ergebnisse	60
5.3	Schlussfolgerungen.....	65
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	66
7	DANKSAGUNG	77
8	LEBENSLAUF	78

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Trageschiene mit montierten Schmelzprüfkörpern im Seitenzahnbereich in der zweiten Versuchreihe.....	14
Abbildung 2: Links: <i>Fragaria vesca</i> vor dem Mahlen; rechts: fertiges Mahlgut	15
Abbildung 3: Fertiges Walderdbeeraublatt-Extrakt.....	16
Abbildung 4: Schema-Zeichnung der Platzierung der Schmelzprüfkörper auf den Kunststoffschienen mit dem Walderdbeeraublatt-Extrakt in der ersten Versuchreihe.....	17
Abbildung 5: Schema-Zeichnung der Platzierung der Schmelzprüfkörper auf den Kunststoffschienen mit dem Walderdbeeraublatt-Extrakt in der zweiten Versuchreihe.....	18
Abbildung 6: Flussdiagramm zum Versuchsablauf.	18
Abbildung 7: Die Biofilm-Bedeckung der Prüfkörperoberfläche und bakterielle Viabilität in [%] von Proband 1.....	24
Abbildung 8: Repräsentative LIVE/DEAD® BacLight™ Bilder von Proband 1.	25
Abbildung 9: REM-Aufnahmen in 1.000- und 20.000-facher Vergrößerung von Proband 1. 27	27
Abbildung 10: Die Biofilm-Bedeckung der Prüfkörperoberfläche und bakterielle Viabilität in [%] von Proband 2.....	29
Abbildung 11: Repräsentative, fluoreszensmikroskopische LIVE/DEAD® BacLight™ Bilder von Proband 2.....	30
Abbildung 12: REM-Aufnahmen der Prüfkörper in 1.000- und 20.000-facher Vergrößerung von Proband 2.....	32
Abbildung 13: Die Biofilm-Bedeckung der Prüfkörperoberfläche und bakterielle Viabilität in [%] von Proband 3.....	34
Abbildung 14: Repräsentative, fluoreszenzmikroskopische LIVE/DEAD® BacLight™ Bilder von Proband 3.....	35
Abbildung 15: REM-Aufnahmen der Prüfkörper in 1.000- und 20.000-facher Vergrößerung von Proband 3.....	37
Abbildung 16: Die Biofilm-Bedeckung der Prüfkörperoberfläche und bakterielle Viabilität in [%] von Proband 4.....	39

Abbildung 17: Repräsentative, fluoreszensmikroskopische LIVE/DEAD® BacLight™ Bilder von Proband 4.....	40
Abbildung 18: REM-Aufnahmen der Prüfkörper in 1.000- und 20.000-facher Vergrößerung von Proband 4.....	42
Abbildung 19: TEM-Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen des Biofilms von Proband 4 im Spülprotokoll 1 nach Anwendung von Wasser (Negativkontrolle).	44
Abbildung 20: TEM-Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen des Biofilms von Proband 4 im Spülprotokoll 2 nach Anwendung von Wasser.....	45
Abbildung 21: TEM-Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen des Biofilms von Proband 4 im Spülprotokoll 1 nach der Anwendung des Walderdbeerblatt-Extrakts.....	46
Abbildung 22: TEM-Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen des Biofilms von Proband 4 im Spülprotokoll 1 nach der Anwendung des Walderdbeerblatt-Extrakts.....	47
Abbildung 23: Die Biofilm-Bedeckung der Prüfkörperoberfläche und bakterielle Viabilität in [%] von Proband 5.....	49
Abbildung 24: Repräsentative, fluoreszensmikroskopische LIVE/DEAD® BacLight™ Bilder von Proband 5.....	50
Abbildung 25: REM-Aufnahmen der Prüfkörper in 1.000 und 20.000-facher Vergrößerung von Proband 5.....	52
Abbildung 26: Die Biofilm-Bedeckung der Prüfkörperoberflächen [%] aller fünf Probanden im Mittelwert und die Standardabweichung.....	54
Abbildung 27: Die Biofilm-Viabilität der Prüfkörperoberflächen [%] aller fünf Probanden im Mittelwert und die Standardabweichung.....	55

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Hintergrund: Der orale Biofilm ist eine komplexe Gemeinschaft von Mikroorganismen, die sich auf den Oberflächen der Mundhöhle ansiedelt und durch Faktoren wie die Ernährung und der Mundhygiene beeinflusst wird. Dieser Biofilm kann zu oralen Erkrankungen wie Karies und Parodontitis führen und auch systemische Auswirkungen auf die Gesundheit haben. Chlorhexidin ist ein weit verbreitetes Antiseptikum zur Kontrolle des Biofilms, welches diverse Nebenwirkungen hat. Es gibt ein zunehmendes Interesse an natürlichen Alternativen, wie Pflanzenextrakten, die ebenfalls antimikrobielle und antiadhäsive Eigenschaften auf den oralen Biofilm aufweisen können.

Material und Methode: An der *in-situ* Studie nahmen fünf gesunde Probanden im Alter von 22 bis 27 Jahren teil. Für die Versuche wurden Schmelzprüfkörper aus den unteren Frontzähnen von Rindern hergestellt, die auf individuellen Kunststoff-Trageschienen mit Silikon befestigt wurden. Die Probanden durchliefen insgesamt vier Versuche mit drei verschiedenen Mundspülösungen: eine Negativkontrolle (Wasser), eine Positivkontrolle (Chlorhexidin) und zwei Versuche mit einem Walderbeerblatt-Extrakt. Die Versuche gingen über 48,5 h und beinhalteten zwei Spülprotokolle. Die Spülzeit betrug jeweils 60 s und erfolgte nach 3 min, 12 h, 24 h, 36 h (Spülprotokoll 1) und zusätzlich nach 48 h (Spülprotokoll 2). Die Entnahme der Prüfkörper im Spülprotokoll 1 erfolgte nach 48 h. Im Spülprotokoll 2 erfolgte die Entnahme nach 48,5 h. Im Anschluss fand eine Analyse der Prüfkörper mittels Fluoreszenzmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie und teilweise mit der Transmissionselektronenmikroskopie statt.

Ergebnisse: Im Durchschnitt ergab sich bei den fünf Probanden bei der Negativkontrolle mit Wasser im Spülprotokoll 1 nach 48 h eine Biofilmbedeckung von 35,93 % und im Spülprotokoll 2 nach 48,5 h von 39,28 %. Bei der Anwendung des Walderbeerblatt-Extrakts betrug die Bedeckung im Spülprotokoll 1 54,83 % (48 h) und im Spülprotokoll 54,44 % (48,5 h). In der zweiten Versuchsrunde, 12 Monate nach der ersten Versuchsrunde, wurde im Spülprotokoll 1 eine Bedeckung von 20,52 % (48 h) und im Spülprotokoll 2 von 24,36% (48,5 h) erreicht. Die Positivkontrolle mit Chlorhexidin führte zu einer Bedeckung von 0,11 % im Spülprotokoll 1 nach 48 h und 0,08 % im Spülprotokoll 2 nach 48,5 h.

Hinsichtlich der Viabilität des Biofilms zeigte sich, dass nach der Anwendung von Wasser die Durchschnittswerte bei 60,85 % im Spülprotokoll 1 und 59,47 % im Spülprotokoll 2 lag. Die Spülung in der ersten Versuchsreihe mit dem Walderbeerblatt-Extrakt reduzierte die Viabilität nach 48 h (Spülprotokoll 1) deutlich von 48,28 % auf 26,31 % nach 48,5 h (Spülprotokoll 2). Die zweite Versuchsreihe verzeichnete im Spülprotokoll 1 eine Viabilität von 33,97 % nach 48 h und im Spülprotokoll 2 28,50 % nach 48,5 h. Bei der Anwendung von CHX lag die Viabilität im Spülprotokoll 1 bei 50,83 % nach 48 h und im Spülprotokoll 2 bei 49,60 % nach 48,5 h. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Walderbeerblatt-Extrakt die Viabilität des Biofilms erheblich reduziert, während die

Bedeckung im Vergleich zur Negativkontrolle und zu CHX erhöht bleibt. Es zeigten sich starke individuelle Unterschiede bei den Probanden.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse zeigen, dass CHX eine konstante antiadhäsive Wirkung aufweist und weiterhin als Goldstandard für die orale Biofilmkontrolle gilt, obwohl es mit den bekannten Nebenwirkungen verbunden ist. Im Gegensatz dazu zeigte der Walderdbeerblatt-Extrakt zwar Potenzial zu Reduktion von Biofilmen, jedoch variierte seine Wirksamkeit stark. Der antibakterielle Effekt des Extraks konnte bei allen Probanden nachgewiesen werden und zeigte sich besonders deutlich durch die Reduktion der Viabilität des vorhandenen Biofilms. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Bedingungen zu optimieren, unter denen der Walderdbeerblatt-Extrakt eine zuverlässige antiadhäsive Wirkung entfalten kann. Erstmals konnte ein antimikrobieller Effekt des Extraks im 48 h Versuch gezeigt werden, was ihn als vielversprechende Mundspülösung erscheinen lässt, die zukünftig möglicherweise als Alternative zu CHX fungieren könnte.

1.2 Abstract

Background: Oral biofilm is a complex community of microorganisms that colonise the surfaces of the oral cavity and is influenced by factors such as diet and oral hygiene. This biofilm can lead to oral diseases such as caries and periodontitis and has systemic effects on health. Chlorhexidine is a widely used antiseptic to control biofilms, but causing various side effects. There is increasing interest in natural alternates, such as plant extracts, which may also have antimicrobial and anti-adhesive properties on the oral biofilm.

Material and Method: Five healthy subjects aged between 22 and 27 years took part in the in-situ study. Enamel specimens were prepared from the lower anterior teeth of cattle, which were attached to individual plastic splints with silicone. The volunteers underwent a total of four tests with three different mouthwash solutions: A negative control (water), a positive control (chlorhexidine) and two trials with the wild strawberry leaf extract. The trials lasted 48.5 h and included two rinsing protocols. The rinsing time was always 60 seconds and took place after 3 min, 12 h, 24 h, 36 h (rinsing protocol 1) and additionally after 48 h (rinsing protocol 2). The test specimens in rinsing protocol 1 were removed after 48 h. In rinsing protocol 2, the samples were removed after 48.5 h. The test specimens were then analysed using fluorescence microscopy, scanning electron microscopy and, in some cases, transmission electron microscopy.

Results: On average, the five volunteers showed a biofilm coverage of 35.93 % in rinsing protocol 1 after 48 h and 39.28 % in rinsing protocol 2 after 48.5 h in the negative control with water. When the wild strawberry leaf extract was used, the coverage was in rinsing protocol 1 54.83 % (48 h) and 54.44 % in rinsing protocol 2 (48.5 h). In the replicate extract trial, a biofilm coverage in rinsing protocol 1 of 20.52 % (48 h) and 24.36 % in rinsing protocol 2 (48.5 h) was achieved. The positive control with chlorhexidine resulted in a coverage of 0.11 % in rinsing protocol 1 after 48 h and 0.08 % in rinsing protocol 2 after 48.5 h.

With regard to the viability of the biofilm, the average values after the application of water were 60.85 % in rinsing protocol 1 after 48 h and 59.47 % in rinsing protocol 2 after 48.5 h. Rinsing with wild strawberry leaf extract significantly reduced the viability from 48.28 % after 48 h to 26.31 % after 48.5 h. The replicate extract experiment recorded a viability of 33.97 % in rinsing protocol 1 after 48 h and 28.50 % in rinsing protocol 2 after 48.5 h. When CHX was used, viability was 50.83 % in rinsing protocol 1 after 48 h and 49.60 % in rinsing protocol 2 after 48.5 h. The results indicate that the wild strawberry leaf extract significantly reduces the viability of the biofilm, while the coverage remains increased, compared to the negative control and CHX. There were strong individual differences present between the test subjects.

Conclusion: The results show that CHX has a consistent anti-adhesive effect and is still considered the gold standard for oral biofilm control, although it is associated with the known side effects. In contrast, wild strawberry leaf extract showed potential for biofilm reduction, but its efficacy varied widely. The

Zusammenfassung

antibacterial effect of the extract was demonstrated in all subjects and was particularly evident in the reduction of the viability of the existing biofilm. Further studies are required to optimise the conditions under which the wild strawberry leaf extract can develop a reliable anti-adhesive effect. For the first time, an antimicrobial effect of the extract was demonstrated in a 48-hour test, which makes it a promising mouth rinse that could possibly serve as an alternative to CHX in the future.

2 Einleitung

2.1 Der orale Biofilm – Einführung

Der orale Biofilm, auch bekannt als Zahnplaque, bildet eine komplexe Gemeinschaft von Mikroorganismen, die sich auf den Oberflächen der Zähne sowie im umgebenden Mundraum ansiedelt. Dieser Biofilm, bestehend aus einer Vielzahl von Bakterien, Pilzen und Viren eingebettet in eine Matrix aus extrazellulären Polymeren, unterliegt ständigen Veränderungen, die durch Faktoren wie Ernährung, Mundhygiene und individuelle physiologische Merkmale beeinflusst werden (Marsh, 2012). Es gibt viele Studien, die sich mit der Bedeutung des oralen Biofilms für die Mundgesundheit befasst haben. Ungleichgewichtige Biofilme können zu verschiedenen oralen Erkrankungen wie Karies, Gingivitis und Parodontitis führen, was lokale Symptome wie Zahnverlust und Zahnfleischbluten verursachen kann. Doch zunehmend wird auch der potenzielle Einfluss des oralen Biofilms auf die Gesundheit des gesamten Organismus diskutiert. Es wird angenommen, dass entzündliche Reaktionen, ausgelöst durch eine gestörte Mundflora, systemische Auswirkungen haben können. Insbesondere der Zusammenhang zwischen parodontalen Erkrankungen und verschiedenen systemischen Erkrankungen wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes mellitus und Atemwegserkrankungen wird intensiv erforscht (Hajishengallis, 2014; Praveen Jayaram, 2016).

2.1.1 Die initiale Biofilmbildung

Die Entstehung des oralen Biofilms ist ein komplexer Prozess, der eine Reihe von Stadien durchläuft und mit der Bildung einer Pellikelschicht beginnt. Die erste Phase der Pellikelbildung startet mit der spontanen Anhaftung von Speichelproteinen auf allen oralen Oberflächen innerhalb weniger Sekunden. Dieser initiale Film, der nur 10-20 nm dick ist, entsteht auf dem Zahnschmelz durch Wechselwirkungen zwischen der Schmelzoberfläche und den Speichelproteinen (M. Hannig & Hannig, 2007). Es sind sogenannte Pellikel-Vorläuferproteine, Phosphoproteine mit hoher Bindungsaffinität zu Hydroxylapatit, die als erste an der Oberfläche der Zähne adsorbieren. Zu diesen Vorläuferproteinen gehören z.B. Statherin, Histatin und prolinreiche Proteine. Diese Interaktion zwischen den Vorläuferproteinen und der Oberfläche wird durch eine ionische Schicht aus Kalzium und Phosphat, welche aus dem Speichel gelöst an der Zahnoberfläche existent ist, vermittelt. Neben den ionischen Wechselwirkungen tragen auch Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Interaktionen zur Bildung der Pellikel bei (C. Hannig & Hannig, 2009). In der initialen Pellikelschicht sind eine große Vielzahl an unterschiedlichen Proteinen, darunter auch Amylasen, Cystatine, Lysozyme, Carboanhydrasen und Lactoferrin nachgewiesen worden (Trautmann et al., 2020).

Nach der schnellen ersten Phase der Pellikelbildung folgt eine zweite langsamere Phase, die durch die kontinuierliche Adsorption von Biomolekülen aus dem Speichel gekennzeichnet ist. Während dieses

Prozesse treten Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den bereits adsorbierten Proteinen, die in der Pellicel-Schicht immobilisiert sind, sowie Proteinaggregaten aus dem Speichel auf. Die mizellenartigen Protein-Agglomerate im Speichel, die sowohl hydrophobe als auch hydrophile Bereiche enthalten sowie die heterotypischen Komplexe aus Proteinen und Enzymen, fungieren als supramolekulare Pellicel-Präkursoren und spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Biofilmen (M. Hannig & Joiner, 2006). Diese, nach 30-60 Minuten vorhandene Pellicelschicht ist 100-700 nm dick. Anschließend wird innerhalb von 90-120 Minuten ein Plateau erreicht, was ein Gleichgewicht zwischen der Adsorption und Desorption von Speichelproteinen auf der Zahnoberfläche bedeutet. Die Pellicelschicht besteht nun aus einer äußeren wenig elektronendichten Schicht mit globulärer Ultrastruktur. Die innere Schicht ist eine elektronendichte und homogen feinkörnig strukturierte Basalschicht (M. Hannig, 1999; M. Hannig et al., 2005; M. Hannig & Hannig, 2007).

Die Rolle der Pellicel ist ambivalent. Eine wesentliche Funktion der Pellicel ist die Protektion gegen Erosionen, indem sie als semipermeable Diffusionsbarriere fungiert, die den Austausch von Kalzium- und Phosphat-Ionen reguliert. Des Weiteren besitzt die Pellicelschicht bestimmte antibakterielle Proteine wie Lactoferrin, Cystatin und Lysozym, welche schützenden Eigenschaften haben. Auch das Vorhandensein von Immunglobulin A wurde in der Pellicelschicht nachgewiesen. Auf der anderen Seite bietet die Pellicel auch Rezeptoren für die bakterielle Anhaftung und fungiert so als Basis für die Bildung des bakteriellen Biofilms, der in der Lage ist, sich zu einem pathogenem Biofilm zu differenzieren. Dazu gehören verschiedene Pellicel-Komponenten wie Amylase, prolinreiche Proteine, Mucin MG 2, Fibrinogen und Lysozym, die als spezifische Rezeptoren für die Bakterienadhäsion gelten (M. Hannig et al., 2004; M. Hannig & Hannig, 2007; M. Hannig & Joiner, 2006).

2.1.2 Bakterielle Biofilmbildung

Der bakterielle Biofilm entsteht auf Basis der Pellicel. Im ersten Schritt kommt es zu einem passiven Transport von Bakterien an die Zahnoberfläche vor allem über den Speichel. Die Bindung, verursacht durch schwache physikalisch-chemische Wechselwirkungen (z.B. Van-der-Waals Kräften) zwischen der mikrobiellen Zelloberfläche und dem pellicelbeschichteten Zahn, ist zufällig und reversibel (M. Hannig & Hannig, 2007; Marsh, 2004). Weitere Faktoren, die hierbei eine Rolle spielen sind die Oberflächenenergie und Rauheit der Zahnoberfläche sowie Scherkräfte, die durch Speichel und durch die Aufnahme von Nahrung entstehen (C. Hannig & Hannig, 2009; Quirynen & Bollen, 1995).

In diesem ersten Schritt der Biofilmbildung binden vor allem die frühen Kolonisatoren, u.a. Streptokokken (z.B. *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*) an die Pellicelschicht (Wolff et al., 2014). Anschließend können starke, kurzreichweitige Wechselwirkungen zwischen spezifischen Molekülen, den Adhäsinen, und komplementären Rezeptoren auf der Zelloberfläche in der Pellicelschicht zu einer irreversiblen Anhaftung führen. Dann kommt es zu einer Co-Adhäsion späterer Kolonisatoren (z.B. *Neisseria species*, *Rothia*, *Actinomyces* oder *Veillonella*) an bereits verbundenen frühen Kolonisatoren. In diesem Stadium kommt es auch zu spezifischen

interbakteriellen Adhäsin-Rezeptor-Interaktionen. Bekannte Adhäsine umfassen Amylase-bindende Proteine, verschiedene Antigenkomplexe, Glykosyltransferasen, Lektine, Proteine mit kohlenhydratbindenden Eigenschaften, verschiedene Lipoproteine, Lipoteichonsäure und Lysozyme (Deimling et al., 2007; Marsh, 2006; Rosan & Lamont, 2000; Sterzenbach et al., 2020).

Im weiteren Verlauf beginnt die Teilung der Bakterien. Diese führt zu einem kontinuierlichen Wachstum und letztendlich zur Bildung eines dreidimensionalen Biofilms, der sowohl räumlich als auch funktional organisiert ist und aus einer Vielzahl von Mikroorganismen besteht. Die Bakterien produzieren Polymere, was zur Bildung einer komplexen extrazellulären Matrix (EPS) führt, die sich aus bakterieller DNA, Proteinen, Glykolipiden und Polysacchariden zusammensetzt. Sie können zwischen 10 und 20 % des Trockengewichtes der dentalen Plaque ausmachen. Diese Matrix aus extrazellulären Polysachariden ist ein gemeinsames Merkmal von Biofilmen und spielt eine entscheidende Rolle für deren strukturelle Integrität und allgemeine Widerstandsfähigkeit gegen externe Einflüsse (Marsh, 2004; Wolff et al., 2014). Ein weiteres Merkmal der EPS ist ihr Einfluss auf die Pathogenität des Biofilms, indem sie die Kariogenität des Biofilms erhöht (Flemming et al., 2007; Marsh, 2004).

2.2 Mundspülungen

Mundspülungen sind Flüssigkeiten, die eine Vielzahl von Wirkstoffen enthalten und dazu dienen, die Biofilmbildung zu verringern, Munderkrankungen, wie z.B. Gingivitis und Karies vorzubeugen und zu behandeln, sowie Mundgeruch zu bekämpfen (Abdulkarim et al., 2019; McGrath et al., 2023). Die Praxis des Mundspülens wird seit über 2000 Jahren von Menschen angewendet und wurde erstmals um 2700 v. Chr. dem chinesischen Kulturkreis zugeschrieben. Seit dieser Zeit haben verschiedene Zivilisationen, darunter die Römer und Griechen, Mundspülungen zur Behandlung von gesundheitlichen Beschwerden einschließlich Zahnfleischerkrankungen, sowie zur Förderung der Mundhygiene eingesetzt (Moran, 2008). Bei Menschen mit Behinderungen oder älteren Menschen, die motorische Einschränkungen haben, ist es nicht immer möglich, eine effektive mechanische Plaquekontrolle durchzuführen. In solchen Situationen kann die Verwendung von Mundspülösungen zur chemischen Plaquekontrolle empfohlen werden, obwohl ihre Wirksamkeit nicht mit einer effektiven mechanischen Plaquekontrolle vergleichbar sind (Brecx et al., 1992). Chlorhexidin (CHX) gilt zur chemischen Plaquekontrolle als Goldstandard (Jones, 1997).

2.2.1 Chlorhexidin (CHX)

Mundspülungen, die CHX enthalten, gehören zu den am weitesten verbreiteten antimikrobiellen Lösungen, die sowohl von Zahnärzten als auch im Rahmen der Individualprophylaxe genutzt werden, unabhängig davon, ob Mundprobleme vorliegen oder nicht. Ihr Zweck besteht darin, die Anzahl der Bakterien in der Mundhöhle zu reduzieren, was wiederum zur Vorbeugung und Behandlung von Mundkrankheiten beiträgt (Brookes et al., 2021).

CHX ist ein Bisbiguanid, welches in den 1940er Jahren im Vereinigten Königreich synthetisiert wurde und anschließend als breit einsetzbares Desinfektionsmittel vertrieben wurde. In den 1970er Jahren wurde erstmals festgestellt, dass Chlorhexidin eine Wirksamkeit gegen Plaque aufweist, daraufhin war es ab 1976 als Mundspülung erhältlich (Löe et al., 1970; Poppolo Deus & Ouanounou, 2022).

Die Summenformel von CHX ist $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$. Der systematische Name ist 1,1'-Hexamethylenbis-[5-(4-Chlorphenyl)biguanid]. Das CHX-Molekül besteht aus zwei symmetrisch angeordneten 4-Chlorphenol-Ringen und zwei Guanidin-Gruppen, die zentral durch eine Hexamethylen-Kette verbunden sind (Łukomska-Szymańska et al., 2017).

Die breite antibakterielle Wirkung von CHX beruht auf seiner Fähigkeit, dank seiner positiven Ladung unter physiologischem pH-Wert an die negativ geladenen Oberflächenstrukturen von Bakterienzellen zu binden. In niedrigen Konzentrationen führt diese Bindung zu einer Veränderung der Zellmembranintegrität, was dazu führt, dass bestimmte Bestandteile wie Kalium aus den Zellen austreten. Dies hat eine hemmende Wirkung auf das Bakterienwachstum. In höheren Konzentrationen bewirkt CHX eine Koagulation und Ausfällung von zytoplasmatischen Bestandteilen der Bakterien, was letztendlich zu ihrem Absterben führt. Auf diese Weise zeigt CHX eine Vielseitigkeit in seiner antibakteriellen Wirkung, die es zu einem effektiven Mittel gegen ein breites Spektrum von Bakterien macht (Reda et al., 2020). CHX hat neben der bakteriziden Wirkung eine plaquehemmende Wirkung. Neben der Bindung an Bakterien haftet CHX auch an den verschiedenen anderen Oberflächen in der Mundhöhle, den Zähnen, der Schleimhaut und an Speichelkomponenten. Zum Beispiel bleibt der Speichel selbst nach einer einzigen Anwendung von CHX über einen Zeitraum von bis zu 5 Stunden antibakteriell aktiv. Die Wirkung an den Oberflächen im Mund hält sogar noch länger an und unterdrückt die Bakterienzahl im Speichel für mehr als 12 Stunden. CHX ist in der Lage, sich an verschiedene negativ geladene Elemente in der Mundhöhle zu binden, und behält so seine antibakterielle Aktivität über mehrere Stunden bei (Jones, 1997; Rolla et al., 1975).

CHX ist in der Zahnmedizin nicht nur als Mundspülung erhältlich. Es gibt neben der Mundspülung noch Gelvarianten und in CHX getränkte Chips, die hauptsächlich in der Parodontisttherapie ihre Anwendung finden (Brookes et al., 2020).

Die langfristige Anwendung von CHX als Mundspülung wird trotz seiner starken antimikrobiellen und Anti-Plaque-Eigenschaften durch lokale Nebenwirkungen begrenzt. Eine der Hauptnebenwirkungen ist die extrinsische Verfärbung der Zähne, die oft schon nach einer kurzen Anwendungszeit von wenigen Tagen auftritt. Die genaue Ursache dieser Verfärbungen ist nicht vollständig verstanden, aber es wird diskutiert, dass Proteine, Kohlenhydrate, Aminosäuren und weitere Bestandteile der Pellicelschicht über verschiedene chemische Reaktionen mit CHX abgebaut werden und dadurch die Verfärbungen bilden. Eine weitere Nebenwirkung ist eine vorübergehende Beeinträchtigung des Geschmackssinns oder eine Geschmacksveränderung, wobei der Salzgeschmack besonders betroffen ist. Zusätzlich kann es aufgrund der Verwendung von Chlorhexidin-Mundspülösungen zu einer erhöhten Bildung von

Zahnstein oberhalb des Zahnfleischrandes kommen. Dies liegt daran, dass CHX die Ausfällung von Proteinen im Speichel auf der Zahnoberfläche fördert, was wiederum die Dicke des Pellikelfilms erhöht und die Ablagerung anorganischer Salze auf diesem Film begünstigt. Zusammenfassend lässt sich über die Wirkung sagen, dass CHX zwar die Bildung von Plaque verhindert, jedoch ist seine Wirkung nicht darauf ausgelegt, bereits vorhandene Plaque effizient von der Zahnoberfläche zu entfernen. Daher wird es oft als Ergänzung zur mechanischen Plaquekontrolle verwendet (Mathur et al., 2011). Neben den beiden oben aufgeführten häufigsten Nebenwirkungen wird auch immer öfter von allergischen Reaktionen auf CHX berichtet (Mueller-Wirth et al., 2020). Ein möglicher Nachteil von CHX könnte in einem Auftreten von Resistenzen gegen Mikroorganismen in der Mundhöhle bestehen, die durch eine Spülung mit CHX verursacht werden (Bartsch et al., 2024). Aufgrund der genannten Nachteile von CHX werden Alternativen in natürlichen Mundspülungen gesucht.

2.2.2 Experimentelle Naturextrakte als Mundspülung

In Anbetracht der wachsenden Unwirksamkeit herkömmlicher Methoden zur Beseitigung von oralen Biofilmen hat das Interesse an innovativen, von der Natur inspirierten Behandlungen in letzter Zeit zugenommen. Bisher wurden zahlreiche natürliche Pflanzenextrakte auf ihre antimikrobielle Wirksamkeit gegen planktonische Mikroorganismen und Biofilme untersucht (Karygianni et al., 2016).

Die meisten Untersuchungen der Wirkung von Naturextrakten als Mundspülung auf den oralen Biofilm und auf den Schmelz, wurden mittels *in-vitro*, *ex-vivo* und *in-situ* Modellen durchgeführt. *In vitro* wurden z.B. Cranberrysaft oder die chinesische Gallussäure untersucht (Xie et al., 2008; Yamanaka et al., 2007). *Ex-vivo* wurden u.a. die Pflanze *Caffea canephora* untersucht (Antonio et al., 2011).

In der Literatur finden sich einige Studien, die sich auf die Untersuchung des oralen Biofilms mit *in situ*-Modellen konzentrieren. Untersucht wurde unter anderem die Wirkung der Gerbsäure (Hertel et al., 2017; Xi et al., 2020), des Cistus Tees (C. Hannig et al., 2008), der Zaubernuss (*Hamamelis virginiana L.*) oder der Blutwurz (*Potentilla erecta Raeusch*) (Kirsch et al., 2020), des Branntweinessigs (Liu & Hannig, 2020) sowie verschiedener Speiseöle (C. Hannig, Kirsch, et al., 2013). Alle Studien zeigten auf den reifen oralen Biofilm oder die Pellikel eine antibakterielle und/oder antiadhäsive Wirkung. Auch andere Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit Naturextrakten als Mundspülösung. Eine Gruppe beschäftigte sich mit der Wirkung des Myrtengewächses *Melaleuca alternifolia*. In diesem Versuch wurde eine Nanopartikellösung aus dem Öl der *M. alternifolia* hergestellt und ein antibakterieller Effekt auf einen *in-situ* gebildeten Biofilm nachgewiesen (de Souza et al., 2017). Brighenti et al. wiesen mit einem Blattextrakt aus der *Psidium cattleianum*, auch bekannt als Erdbeer-Guave, einen antikariösen Effekt nach (Brighenti et al., 2012). In einer Studie mit dem Klebalant *Inula viscosa* konnte ein antibakterieller Effekt auf die anfängliche Biofilmbildung nachgewiesen werden (Hertel et al., 2016). Aufgrund dieser vielversprechenden Ansätze natürlicher Mundspülösungen sind weitere Untersuchungen polyphenolhaltiger Substanzen sinnvoll.

2.2.3 Polyphenole

Polyphenole sind eine heterogene Gruppe organischer Verbindungen, die in einer breiten Palette von Pflanzen vorkommen und aufgrund ihrer potenziellen gesundheitlichen Vorteile von großem Interesse sind. Diese Verbindungen spielen eine wichtige Rolle in der Pflanzenabwehr gegen Krankheiten, UV-Strahlung und oxidativen Stress. Chemisch betrachtet sind Polyphenole durch das Vorhandensein von mindestens einer Phenolgruppe gekennzeichnet, die an ein aromatisches Ringsystem gebunden ist. Laut der Definition von *Quideau et al.* sind Polyphenole pflanzliche Sekundärmetaboliten, die von dem Shikimat-Weg abgeleiteten Phenylpropanoiden oder dem Polyketid-Weg stammen (Quideau et al., 2011). Diese Verbindungen enthalten demnach mehr als einen phenolischen Ring. Die Vielfalt der Polyphenole wird durch ihr aromatisches System und den Grad der Hydroxylierung bestimmt, welche auch ihre unterschiedlichen Eigenschaften beeinflussen. Die Polyphenole umfassen verschiedene Klassen von Verbindungen, darunter Flavonoide, Phenolsäuren und Stilbene, von denen jede ihre eigenen einzigartigen Strukturen und biologischen Aktivitäten aufweist. Die Flavonoide stellen eine der am häufigsten vorkommenden und vielfältigsten Klassen von Polyphenolen dar. Untergruppen sind die Flavonole, Flavone, Flavanone, Flavanole, Anthocyane, Isoflavone und Catechine. Sie bestehen aus einem Grundgerüst von 15 Kohlenstoffatomen, das aus zwei aromatischen Ringen (A- und B-Ring) und einem pyranischen C-Ring besteht. Zu den bekannten Flavonoiden gehören Quercetin, Kaempferol, Luteolin und Rutin. Diese Verbindungen sind reichlich in Obst, Gemüse, Tee und Rotwein vorhanden und werden für ihre antioxidativen, entzündungshemmenden und potenziell krebshemmenden Eigenschaften geschätzt (Pandey & Rizv, 2009; Quideau et al., 2011; Scalbert et al., 2005).

Phenolsäuren sind eine weitere wichtige Klasse von Polyphenolen, die durch das Vorhandensein einer Carboxylgruppe (-COOH) an einem aromatischen Ring charakterisiert sind. Bekannte Phenolsäuren sind Zimtsäuren (z.B. Kaffeesäure und Ferulasäure) und Hydroxybenzoësäuren (z.B. Gallussäure und Vanillinsäure). Sie tragen nicht nur zur Bitterkeit einiger Lebensmittel bei, sondern werden auch aufgrund ihrer antioxidativen und entzündungshemmenden Eigenschaften geschätzt. Phenolsäuren sind reichlich in Obst, Gemüse und Getränken vorhanden (Di Lorenzo et al., 2021; Schestakow et al., 2022). Stilbene sind eine kleinere, aber dennoch bedeutende Klasse von Polyphenolen. Stilbene sind durch ein 1,2-Diphenylethylen-Grundgerüst charakterisiert und werden über den Phenylpropanoid-Stoffwechselweg synthetisiert. Ihre Bildung erfolgt durch die Stilbenynthase, die CoA-Ester von Zimtsäurederivaten mit drei Molekülen Malonyl-CoA umsetzt. Anschließend können Stilbene durch Modifikationen wie Glykosylierung, Methylierung oder Prenylierung zu komplexeren Strukturen umgewandelt werden (Flemming et al., 2021). Das bekannteste Stilben ist Resveratrol. Resveratrol, chemisch als 3,4',5-Trihydroxystilben bekannt, ist ein gut untersuchtes, natürliches Stilben, das hauptsächlich in Weintrauben und daraus hergestellten Produkten vorkommt. Resveratrol wird intensiv aufgrund seiner antioxidativen und potenziell kardioprotektiven Eigenschaften untersucht (Rana et al., 2022).

2.2.4 Die Walderdbeere – *Fragaria vesca*

Die Walderdbeere (*Fragaria vesca*) gehört zur Gattung der Erdbeere (*Fragaria*) und Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*). Die Walderdbeere kommt in den gemäßigten Zonen von Asien, Amerika und Europa vor. Die Blätter der *Fragaria vesca* (*Fragariae herba folium*) werden als eine Teedroge vertrieben (Flemming et al., 2021). Generell weist die Gattung der Erdbeere eine antioxidative, antikanzerogene und antithrombotische Wirkung auf. Die positiven Effekte, die hauptsächlich den phenolischen Verbindungen in Erdbeerfrüchten zugeschrieben werden, sind gut dokumentiert. Insbesondere die Walderdbeere zeichnet sich durch eine deutlich höhere antioxidative Kapazität aus als die gängige kultivierten Erdbeersorten (z.B. *Fragaria ananassa*). Allerdings beziehen sich die meisten Untersuchungen auf die Frucht der Walderdbeere und nicht auf die Blätter (Dias et al., 2016; Mudnic et al., 2009). Die Früchte der Walderdbeere enthalten Kohlenhydrate wie Saccharose, lösliche Ballaststoffe und mehrfach ungesättigte Fettsäuren, insbesondere Linolsäure und Linolensäure. Sie sind zudem reich an weiteren Inhaltsstoffen wie Zitronensäure, Bernsteinsäure sowie den Vitaminen B9 und E. Die untersuchten Früchte wiesen höhere Konzentrationen an phenolischen Verbindungen auf, vor allem Ellagsäurederivate und Dihydroflavonol Taxifolin-3-O-arabinofuranosid (Dias et al., 2016). Den Beeren der *Fragaria vesca* werden verschiedene gesundheitsfördernde Eigenschaften zugeschrieben, darunter ihre Fähigkeit, freie Radikale abzufangen, ihre antioxidative Wirkung und ihre entzündungshemmenden Eigenschaften (Liberal et al., 2014). Auch in den Wurzeln der Walderdbeere wurden verschiedene phenolische Verbindungen gefunden. Hierzu gehörten die Flavan-3-ole, Catechin-Derivate, Ellagsäurederivate, Flavonole und Dihydroflavonole. Die Wurzeln der wilden Erdbeere werden traditionell verwendet, um Abkochungen und Aufgüsse herzustellen, die z.B. bei der Behandlung von Husten oder Harnwegsinfektionen eingesetzt werden (Dias et al., 2015). Die Blätter sind für ihren hohen Gehalt an bioaktiven Verbindungen bekannt, insbesondere Polyphenole, wie Ellagitannine, Proanthocyanidine, Quercetin- und Kaempferol-Derivate, wobei Ellagitannine die bedeutendsten sind. Aus diesen Inhaltsstoffen der Blätter ergeben sich verschiedene biologische Eigenschaften, wie beispielsweise gerinnungshemmende Aktivitäten (D'Urso et al., 2018; Pawlaczyk-Graja et al., 2019). Zubereitungen aus den Blättern von *Fragaria vesca* werden äußerlich als Antiseptikum, Weichmacher und Hautschutzmittel verwendet sowie zur Behandlung von Entzündungen der Haut- und Schleimhautoberflächen (Neves et al., 2009). Internistisch findet dieses pflanzliche Arzneimittel Anwendung bei Atemwegserkrankungen wie Husten, Schnupfen und Halsschmerzen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, einschließlich der Senkung von Blutdruck und Herzfrequenz, Harnwegserkrankungen und als ergänzende Behandlung bei Diabetes mellitus (Popović et al., 2014). In der Volksmedizin ist es auch bei der Behandlung von Magen-Darm-Erkrankungen sehr beliebt, insbesondere wegen seiner adstringierenden, antidiarrhöischen und antidiysenterischen Eigenschaften (Liberal et al., 2014).

Neben der Untersuchung zur allgemeinen Wirkung der *Fragaria vesca* wurde bereits mittels *in-situ* Versuchen gezielte Untersuchungen zur Beeinflussung des oralen Biofilms durchgeführt. Nach einer Pellicelbildungszeit von einer Minute spülten zwölf gesunde Probanden mit dem Walderdbeerblatt-

Extrakt (8 ml) für zehn Minuten, während Wasser und CHX als Negativ- bzw. Positivkontrolle dienten. Anschließend wurden die Schienen für acht Stunden über Nacht getragen, um eine *in-situ* Biofilmbildung zu ermöglichen. Die Prüfkörper wurden in dieser Studie mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie und der Transmissionselektronenmikroskopie analysiert. Das Extrakt der Walderbeerblätter zeigte eine deutliche Reduktion der bakteriellen Anhaftung sowie in der Ultrastruktur eine erhöhte Elektronendichte der Pellicel, die auf eine verstärkte Schutzfunktion hinweist. Diese Ergebnisse legen nahe, dass das Walderbeerblatt-Extrakt eine vielversprechende Rolle in der Prävention von Karies und biofilmassoziierten Erkrankungen spielen könnte (Kirsch et al., 2020).

2.3 Ziel der Arbeit / Fragestellung

Wie zuvor beschrieben wiesen Vorläuferstudien einen antiadhäsiven Effekt der experimentellen Walderbeerblattspülung bei einem 8-h *in-situ* Versuch nach (Kirsch et al., 2020). Das Ziel der hier vorliegenden *in-situ*-Studie war es, die antibakterielle und antiadhärente Wirkung von einer experimentellen Mundspülösung aus Walderbeerblatt-Extrakt auf den oralen Biofilm im Spülprotokoll 1 (48 h) und Spülprotokoll 2 (48,5 h) zu untersuchen. Die experimentelle Spülösung wurde dazu mit CHX (Positivkontrolle), dem Goldstandard der Mundspülungen (Jones, 1997) und mit Wasser (Negativkontrolle) verglichen. Zur Beurteilung der Wirkung dieser Mundspülösungen hinsichtlich antiadhäsiver und antibakterieller Effekte wurde die Fluoreszenzmikroskopie genutzt. Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie und der Transmissionselektronenmikroskopie wurde der über 48 und 48,5 Stunden *in-situ* entstandene Biofilm zusätzlich auf seine Morphologie und Schichtdicke hin untersucht.

3 Material und Methode

3.1 Probanden

An der Studie beteiligten sich insgesamt fünf Probanden (3 weibliche und 2 männliche) im Alter von 22 bis 27 Jahren, die alle Zahnmedizinstudierende waren. Sie wiesen ein kariesfreies Gebiss auf und waren parodontal gesund. In den letzten 12 Monaten hatten die Probanden keine Antibiotika eingenommen. Es bestand weder eine Dauermedikation noch litten sie an Erkrankungen der Speicheldrüsen oder der Mundschleimhaut. Zudem waren alle Probanden Nichtraucher. Eine ausführliche Aufklärung der Probanden ist erfolgt. Das positive Votum der Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes für die durchgeführten *in-situ* Versuche lag vor (AZ 21/54).

3.2 Herstellung der Prüfkörper

Die Prüfkörper wurden aus den unteren Frontzähnen der zweiten Dentition von Rindern hergestellt. Mit einer Trennschleifmaschine (WOCO 50 P, Conrad GmbH, Clausthal, Deutschland) wurden aus den Labialflächen rechteckige Rohlinge hergestellt. Im nächsten Schritt wurden diese Rohlinge mit Nassschleifpapier (Waterproof Silicon Carbide Paper, Struers GmbH, Willich, Deutschland) zu einer rechteckigen Form zurecht geschliffen. Dies erfolgte mit der Körnung P320. Die Schmelzseite machte 2/3 und die des Dentins 1/3 der Gesamtschichtstärke aus. Die Mindestschichtstärke der Prüfkörper betrug 1 mm, um die spätere Retention in der Silikonmasse zu gewährleisten. Anschließend erfolgte aufsteigend die Politur bis zur Körnung P 2500. Ab der Extraktion wurden die Zähne zu jedem Zeitpunkt bei 4 °C in 0.1% Thymollösung (Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg, Deutschland) gelagert und konnten auf Vorrat hergestellt werden.

Die fertigen Prüfkörper besitzen nach der Politur eine oberflächliche Schmierschicht und wurden vor dem Versuch wie folgt aufbereitet: Lagerung für 2 min in einer Schale gefüllt mit 3% NaOCL (Natriumhypochlorit-Lösung 3% DAC 500ml, Hedinger, Stuttgart, Deutschland) auf dem Schüttler (Rocky®, Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau, Deutschland), anschließend Spülung der Prüfkörper mit Vollentsalztem-Wasser (VE-Wasser) und Einlage in ein Ultraschallbad (Sonorex Super RK 100 H, Bandelin, Berlin, Deutschland) mit VE-Wasser für 5 min. Dann erfolgte eine Einlage in 70 % Isopropylalkohol (Isopropylalkohol 70 %, Hedinger, Stuttgart, Deutschland) für 15 min; anschließend die Rehydrierung in steriles Wasser (Ampuwa®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) bei 4 °C für mindestens 6 h. Die Lagerung der aufbereiteten Pürfkörper betrug max. drei Tage.

3.3 Herstellung der Trageschienen

Für alle fünf Probanden wurden individuelle Trageschienen aus Kunststoff hergestellt. Hierzu erhielten die Probanden eine Abformung des Oberkiefers mit Alginat (Alginat Blueprint, Dentsply De Trey GmbH, Konstanz, Deutschland), aus dem ein Hartgipsmodell (Die-Stone, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) hergestellt wurde. Auf diesem Modell wurde mit Hilfe des Tiefziehverfahrens die individuelle Kunststoffschiene (DURAN®, Scheu Dental GmbH, Iserlohn, Deutschland) hergestellt. Die Schiene verläuft im ersten Quadranten von Zahn 13 bis Zahn 17 und im zweiten Quadranten von Zahn 23 bis Zahn 27. Zusätzlich wurden an der Schiene zum besseren mechanischen Halt der Silikonmasse Perforationen angebracht.

Zur Prüfkörpermontage wurde das Silikon (President light body, Coltène/Whaledent GmbH und Co.KG, Langenau, Deutschland) auf die Schiene mittels Mischpistole aufgetragen und anschließend wurden die Prüfkörper mit einer Pinzette positioniert.



Abbildung 1: Trageschiene mit montierten Schmelzprüfkörpern im Seitenzahnbereich in der zweiten Versuchreihe.

3.4 Herstellung der Prüfsubstanzen

3.4.1 Walderdbeereblatt-Extrakt

Zur Herstellung des Walderbeer-Extrakts wurden Blätter der Firma Kräuter Schulte aus Gernsbach/Deutschland (Ch.B. 83648) verwendet. Insgesamt wurden pro Versuch 60 ml des Walderbeerextrakts für einen Probanden hergestellt. Zu jedem Versuch wurde das Extrakt frisch hergestellt. Als erster Schritt erfolgte die Herstellung des Mahlguts. Hierzu wurden 3 g der Blätter in ein 40 ml fassendes Mahlgefäß aus Kunststoff mit der Waage (CP 423S, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland) abgewogen. Nun erfolgte die erste Runde des Mahlens (IKA Tube Mill 100, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) bei 10.000 rpm für 1 min. Anschließend erfolgte eine optische Kontrolle des Mahlguts nach Steinchen oder größeren Stängeln, die aussortiert wurden. Zum Abschluss wurde das Mahlgut nochmals bei 20.000 rpm für 2 min gemahlen.



Abbildung 2: Links: *Fragaria vesca* vor dem Mahlen; rechts: fertiges Mahlgut

Der zweite Schritt beinhaltet die eigentliche Herstellung der Spüllösung. Es wurden vom Mahlgut 2,67 g mit der Feinwaage (ABJ-NM/ABS-N, KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland) in ein 50 ml fassendes, konisches Zentrifugenröhrchen abgewogen. In das konische Zentrifugenröhrchen wurden 33,375 ml destilliertes Wasser (Ampuwa®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) gegeben. Es folgte die Homogenisierung für 2 min mittels Vortexer (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA). Dann kam das konische Zentrifugenröhrchen für 30 min bei 20 °C Wassertemperatur in das Ultraschallbad (Sonorex Super RK 100 H, Bandelin, Berlin, Deutschland). Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 2576 g für 20 min. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml fassendes, konisches Zentrifugenröhrchen überführt. In das Zentrifugenröhrchen mit dem Mahlgut wurden erneut 33,375 ml

dest. Wasser gegeben und der erste Durchgang (Homogenisierung, Ultraschallbad und Zentrifugation) wurde erneut durchgeführt. Beide Überstände wurden nun vereinigt und es folgte ein Auffüllen auf das Endvolumen von 81,4 ml mit dest. Wasser.

Der dritte Schritt umfasste die Filterung des Extrakts mit Spritzenvorsatzfiltern. Hierzu wurden die Spritzenvorsatzfilter in absteigender Filtergröße von 5 μm (CHROMAFIL® Xtra PES-500/25, MACHEREY-NAGEL GmbH & und Co. KG, Düren, Deutschland), 0,45 μm (Minisart RC, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) und 0,2 μm (HPLC-Spritzenfilter RC, neoLab®, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Zuletzt erfolgte die Abfüllung von 10 ml des Extrakts in 15 ml fassende, konische Zentrifugenröhren.

Das Extrakt ist nun bei 4 °C für 7 Tage haltbar.



Abbildung 3: Fertiges Walderdbeerblatt-Extrakt

3.4.2 Wasser und Chlorhexidin

Wasser (Ampuwa®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) und Chlorhexidin (0.2 %) (Apotheke Universitätsklinikum des Saarlandes) lagen als verbrauchsfertige Substanzen vor.

3.5 Versuchsablauf

Vor Versuchsbeginn wurden alle Probanden über das Mundhygieneverhalten während des Versuches aufgeklärt. Hierzu gehörte während der gesamten Tragedauer der Verzicht auf Zahnpasta oder sonstige Mundspülösungen beim Zähneputzen, ausschließliches Trinken von Wasser sowie der Verzicht auf Mahlzeiten von 2 h vor bis 4 h nach Versuchsbeginn. Zu den Mahlzeiten wurden die Schienen in einer Dose mit nassen Papiertüchern gelagert. Insgesamt wurden vier Versuche bei jedem Probanden durchgeführt. Zwischen den Versuchen lagen mindestens 7 Tage. Es wurde ein Versuch mit Wasser (Negativkontrolle), ein Versuch mit Chlorhexidin (Positivkontrolle) und zwei Versuchsreihen mit dem Walderdbeer-Extrakt durchgeführt. Die zweite Versuchsreihe mit dem Walderdbeerblatt-Extrakt erfolgte 12 Monate nach der ersten Versuchsreihe und wurde zum einen als Replikatversuch für die Fluoreszenzmikroskopie und zum anderen für die zusätzliche Beurteilung der Morphologie des Biofilmes mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) und der Ultrastruktur mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) durchgeführt. Die Spülung erfolgte jeweils mit 10 ml Spülösung über eine Dauer von 60 Sekunden. Die Spülzeitpunkte lagen bei 3 min, 12 h, 24 h und 36 h (Spülprotokoll 1) sowie bei 48 h (Spülprotokoll 2). In der ersten Versuchsreihe (Extrakt) befanden sich pro Seite jeweils zwei Prüfkörper auf der bukkalen Seite für die Analyse mit *Live/Dead Staining* (s. Abbildung 4). Die Prüfkörper 1 und 2 wurden gemäß Spülprotokoll 1 nach 48 h, die Prüfkörper 3 und 4 gemäß Spülprotokoll 2 nach 48,5 h entnommen.

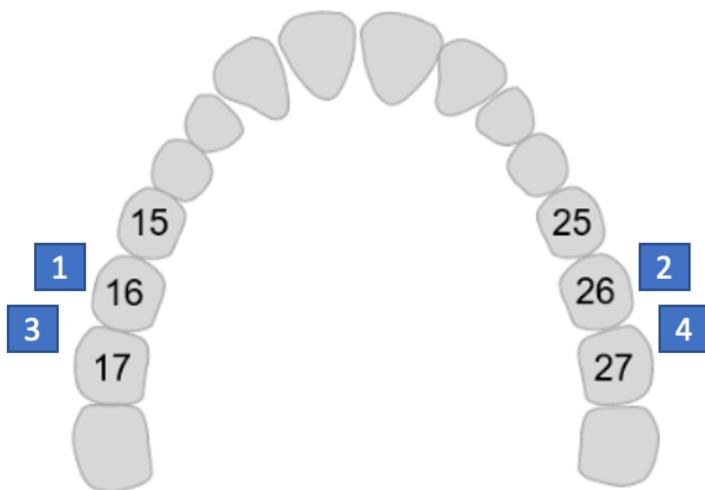


Abbildung 4: Schema-Zeichnung der Platzierung der Schmelzprüfkörper auf den Kunststoffschienen mit dem Walderdbeerblatt-Extrakt in der ersten Versuchsreihe. Die blauen Quadrate stellen die Schmelzprüfkörper dar, während die grauen Formen den Zahnbogen im Oberkiefer abbilden.

In der zweiten Versuchsreihe (Extrakt-Replikat) befanden sich pro Seite bukkal jeweils 4 Prüfkörper. Die Prüfkörper 1 und 2 (Spülprotokoll 1) sowie Prüfkörper 5 und 6 (Spülprotokoll 2) waren für die Analyse mit *Live/Dead Staining*, die Prüfkörper 3 und 4 (Spülprotokoll 1) sowie die Prüfkörper 7 und 8 (Spülprotokoll 2) waren für die Analyse mittels Rasterelektronenmikroskopie bestimmt (s. Abbildung 5).

Bei Proband 4 befanden sich in der zweiten Versuchsreihe noch vier zusätzliche Prüfkörper für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) auf den Schienen.

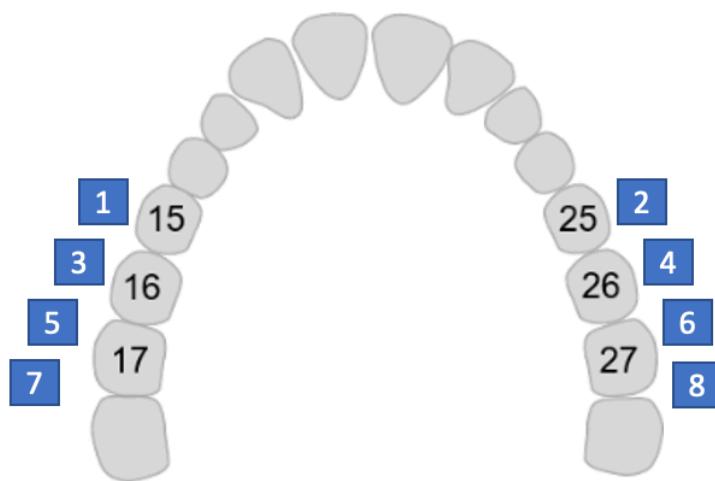


Abbildung 5: Schema-Zeichnung der Platzierung der Schmelzprüfkörper auf den Kunststoffschienen mit dem Walderbeerblatt-Extrakt in der zweiten Versuchsreihe. Die blauen Quadrate stellen die Schmelzprüfkörper dar, während die grauen Formen den Zahnbogen im Oberkiefer abbilden.

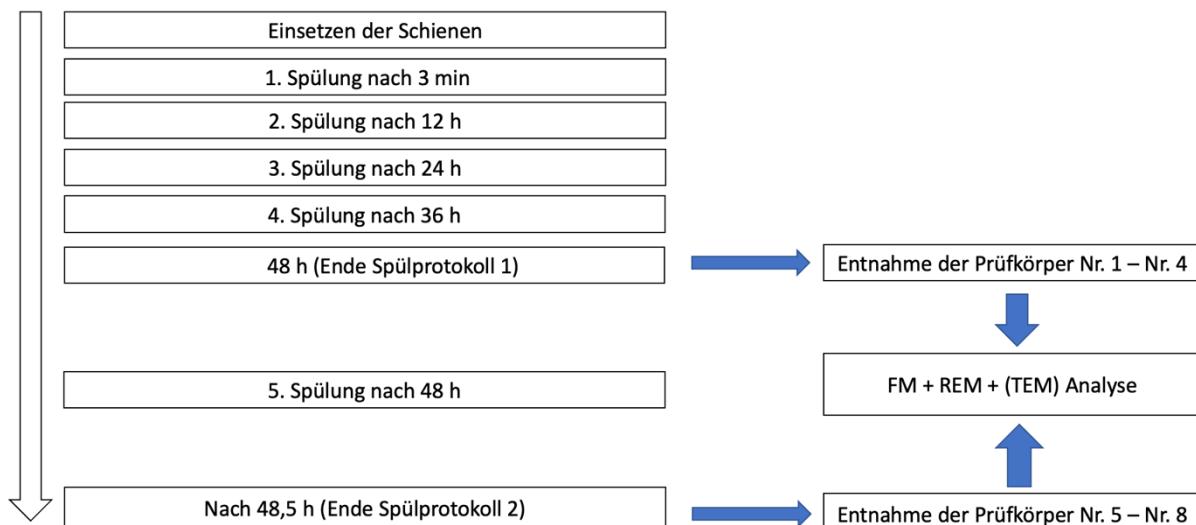


Abbildung 6: Flussdiagramm zum Versuchsablauf. Bei beiden Spülprotokollen erfolgte die erste Spülung nach jeweils 3 min, dann jeweils nach 12 h, 24 h und 36 h. Die Prüfkörper Nr. 1 – Nr. 4 wurden nach 48 h von der Trageschiene entfernt (Spülprotokoll 1). Es folgte die letzte Spülung und die Entnahme nach 48,5 h der Prüfkörper Nr. 5 - Nr. 8 (Spülprotokoll 2). Es folgten die Analysen mittels Fluoreszenzmikroskopie (FM), Rasterelektronenmikroskopie (REM) und teilweise mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).

3.6 LIVE/DEAD® Bac Light™

Der Biofilm auf den Prüfkörpern wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie (FM) untersucht. Zur Färbung der Bakterien wurde das LIVE/DEAD BacLight TM Bacterial Viability Kit L 7012 verwendet, welches die Aliquots SYTO 9 und Propidiumiodid sowie das BacLight Mounting Oil enthält. Diese Aliquots unterscheiden sich durch unterschiedliche optische Eigenschaften und haben jeweils eine spezifische Eignung zum Eindringen in Bakterien. Der grün fluoreszierende Farbstoff SYTO 9, der zur Nukleinsäureerkennung benutzt wird, kann in Bakterien eindringen, unabhängig davon, ob ihre Membran beschädigt oder intakt ist. Propidiumiodid wiederum, ein roter Farbstoff, der ebenfalls Nukleinsäuren nachweist, kann ausschließlich in Bakterien mit beschädigter Membran eindringen. Wenn sowohl SYTO 9 als auch Propidiumiodid in der Zelle vorhanden sind, führt dies dazu, dass SYTO 9 durch Propidiumiodid verdrängt wird. Dies führt dazu, dass lebende Bakterien mit intakter Membran grün fluoreszieren, während tote Bakterien mit geschädigter Membran rot fluoreszieren. Während beide Ausgangslösungen bei Temperaturen unter -20 °C und lichtgeschützt bis zu einem Jahr aufbewahrt werden können, bleibt das BacLight Mounting Oil unbegrenzt haltbar. Für die Herstellung der Farblösung wurden 1 µl jeder der beiden Farbstoffe in 1000 µl 0.9 % NaCl-Lösung gegeben und anschließend mit dem Vortexgerät gründlich durchmischt. Diese Farblösung kann in einem undurchsichtigen Eppendorfgefäß für einen Monat bei 4 °C gelagert werden. Nach dem Versuchsende und der Entfernung der Prüfkörper von der Schiene, wurden diese sorgfältig mit destilliertem Wasser gereinigt und in einer 6-Well-Platte feucht gelagert. Vor der Fluoreszenzmikroskopie wurden den Prüfkörpern auf der Schmelzseite unter dem Lichtmikroskop mit einer spitzen Kanüle sechs Markierungen eingeritzt. Anschließend erfolgte mit der Pipette die Bedeckung der Schmelzoberfläche mit 10 µl der Farblösung. Die Inkubationszeit in der Dunkelkammer betrug 10 min. Nach der Inkubationszeit wurde die Farblösung mit einem fuselfreien Tuch aufgesaugt. Der Prüfkörper wurde in drei verschiedenen Fächern der 6-Well-Platte mit 0.9 % NaCL-Lösung gewaschen. Vor der Positionierung des Prüfkörpers in Putty-Masse wurde dieser noch mit einem fuselfreien Tuch getrocknet, um eine spätere Schmierschicht bei Kontakt mit dem Mounting Oil zu verhindern. Die Positionierung der Schmelzseite erfolgte parallel zur Tischembene, sodass ein gleicher Fokus beim Mikroskopieren gewährleistet ist. Danach wird der Prüfkörper leicht in die Putty-Masse reingedrückt und die Oberfläche mit 5 µl BacLight Mounting Oil benetzt. Zum Schluss wird ein Deckglas aufgelegt, welches den Prüfkörper nicht berühren darf. Eingeschlossene Luft zwischen dem Prüfkörper und Deckglas muss vor dem Mikroskopieren entfernt werden. Anschließend erfolgt die Fluoreszenzmikroskopie (Axio Vision SE64 Rel.4.9, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland). Unter Verwendung eines Fluoresceindiacetat-Filters wird Licht mit einer Wellenlänge von 480 nm erzeugt. Dies dient zur Anregung des Aliquot SYTO 9, das grünes Licht mit einer Wellenlänge von 500 nm abgibt. Das Aliquot Propidiumiodid wird durch einen Filter aus Ethidiumbromid, bei einer Wellenlänge von 490 nm angeregt. Nach der Anregung bei 490 nm emittiert Propidiumiodid rotes Licht mit einer Wellenlänge von 635 nm. Durch die Verwendung der unterschiedlicher

Anregungswellenlängen werden die Aufnahmen der grün und rot fluoreszierende Bakterien in getrennten Schritten erfasst. Danach werden die vorliegenden Aufnahmen zu einem farbigen Bild zusammengefügt. Pro Prüfkörper wurden sechs Bilder in 1000-facher Vergrößerung angefertigt. Der Aufnahmeort auf dem Prüfkörper lag jeweils rechts neben den zu Beginn angebrachten Markierungen.

3.7 Statistik

Die Auswertung der FM-Bilder erfolgte mit den Programmen MatLab für die Viabilität des Biofilms und ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, USA) für die Bedeckung der Prüfkörper.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Lebend-Tod-Rate wurden grundsätzlich sechs Aufnahmen von jeder Probe angefertigt. Um die Bedeckung der Prüfkörperoberfläche sowie die Viabilität des Biofilms bewerten können, wurden die einzelnen Aufnahmen mittels ImageJ und MatLab ausgewertet. Anschließend wurde deren Mittelwerte gebildet.

Die sechs aufgenommen Bilder pro Prüfkörper wurden einzeln auf die Viabilität und Bedeckung des Biofilms analysiert. Die Mittelwerte der einzelnen Probanden sind im Ergebnisteil deskriptiv dargestellt. Von allen fünf Probanden wurde ein weiterer Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt, um eine genrelle Aussage über die Wirkungen der Spülösungen zu treffen.

3.8 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Zur Durchführung des Replikat-Versuches in der zweiten Versuchsreihe wurden zusätzlich zu den FM-Prüfkörpern links und rechts noch zwei Prüfkörper an der Schiene für die REM befestigt (s. Abb. 5). Dies diente der Beurteilung der Morphologie des Biofilms und der Verfizierung der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung. Für die REM-Auswertung müssen die Prüfkörper fixiert und getrocknet sein. Die Fixierung wurde mithilfe einer Fixierlösung, welche Glutaraldehyd (Glutaraldehyd, 50 %-Lösung in Wasser, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) und Cacodylat-Puffer (Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) enthält, durchgeführt. Nach dem Abspülen der Prüfkörper mit destilliertem Wasser wurden diese hierzu für 1h bei 4 °C in die Fixierlösung (1 ml) gelegt. Dies erfolgte in einer 24-Well-Platte. Auf diese Weise wurde die Struktur der Mikroorganismen erhalten. Es folgten bei Raumtemperatur und unter dem Abzug drei aufeinanderfolgende Waschungen der Prüfkörper für 10 min in 0,1 M Cacodylat-Puffer jeweils in einem neuen Fach der 24-Well-Platte. Anschließend begann die Entwässerung der Prüfkörper, um potenzielle Artefakte bei der REM-Analyse zu verhindern. Die Entwässerung lief nach folgendem Protokoll ab:

- zweimal für 5 min in 50%igem vergälltem Ethanol
- 5 min in 70%igem vergälltem Ethanol
- 5 min in 80%igem vergälltem Ethanol

- 5 min in 90%igem vergälltem Ethanol
- zweimal für 10 min in 100%igem nicht vergälltem Ethanol
- Übersetzen in das letzte Wallet und Lufttrockung unter dem Abzug über Nacht bei Raumtemparatur.

Nach der Trocknung wurden die Prüfkörper auf einem Träger aus Aluminium mit doppelseitiger Klebefolie befestigt. Mit dem Rasterelektronenmikroskop (XL 30 ESEM FEG, FEI Company, Eindhoven, Niederlande) wurden nun Bilder in bis zu 20.000-facher Vergrößerung aufgenommen.

3.9 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Nach Abschluss der Versuchsdurchführung wurden die Prüfkörper mit dest. Wasser abgesprüht und anschließend zur Fixierung in einem 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml TEM-Fixierlösung gelagert. Diese Fixierlösung bestand aus 1% Glutaraldehyd, 1% Paraformaldehyd und 0,1 M Cacodylatpuffer. In dieser Fixierlösung sind die Proben unbegrenzt bis zu Weiterverarbeitung lagerbar. Im nächsten Schritt wurden die Prüfkörper für 24 Stunden in 0,1 M Cacodylatpuffer gelegt.

Die Einbettung der Prüfkörper erfolgte über einen Zeitraum von mehreren Tagen. Am ersten Tag wurden die Proben durch sukzessive Dehydratisierung in Ethanol (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) in Konzentrationen von 50 % bis 100 % und anschließend in Aceton vorbereitet. Sie wurden dann über Nacht in einer Mischung aus Araldit CY212 (Agar Scientific Ltd, Essex, United Kingdom), 2-Dodecenyldbernsteinsäureanhydrid (DDSA) (Agar Scientific Ltd, Essex, United Kingdom), 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (SERVA Electrophoreses GmbH, Heidelberg, Deutschland) und Aceton gelagert.

Anschließend wurden die Präparate in ein acetonfreies Araldit-Gemisch transferiert und abschließend mit einer rechteckigen Silikonform in Araldit eingebettet. Zur Aushärtung des Araldits wurde die Silikonform für zwei Tage bei 65 °C im Brutschrank belassen.

Die vollständig ausgehärteten Araldit-Quader wurden an der Schleifmaschine getrimmt und poliert, bis der Prüfkörper freigelegt war, der untersucht werden sollte. Mithilfe eines Ultramikrotoms (Ultracut Leica EM UC7, Wetzlar, Deutschland) mit einem Diamantmesser (Microstar 45 °, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden Ultradünnschnitte mit einer Dicke von etwa 65 nm hergestellt und auf ein Kupfernetz (Grid) mit den Abmessungen 1 x 2 mm gezogen, das mit einem Pioloform-Film überzogen war. Danach erfolgte eine Kontrastierung der Ultradünnschnitte mittels UranyLess (Delta Microscopies, Mauressac, Frankreich) und Bleicitrat (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Proben wurden mithilfe eines Transmissionselektronenmikroskops (Tecnai 12, FEI, Eindhoven, Niederlande) mit Vergrößerungen zwischen 1000- und 98.000-fach untersucht. Hierbei kam das Bildanalyseprogramm iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions, Olympus, Tokio, Japan) zum Einsatz.

4 Ergebnisse

Die folgenden Ergebnisse wurden mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie (FM, LIVE/DEAD® *BacLight*™), der Rasterelektronenmikroskopie (REM) und der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) erzielt.

Die FM wurde durchgeführt, um die Auswirkung des Walderdbeerblatt-Extrakts, im Vergleich zu Wasser und Chlorhexidin (CHX), auf das Ausmaß der Biofilmbildung (Bedeckung der Prüfkörperoberfläche mit Biofilm) und der Viabilität des Biofilms im Spülprotokoll 1 (48 h) und im Spülprotokoll 2 (48,5 h) zu analysieren.

Um die Ergebnisse der FM im Hinblick auf die Bedeckung der Prüfkörperoberfläche mit Biofilm zu verifizieren und zusätzlich die Morphologie des Biofilms zu beurteilen, wurden REM-Analysen durchgeführt. Die Aufnahmen der TEM-Analysen dienen der Beurteilung der Morphologie und der Schichtdicke des Biofilms. Es wurden mit allen drei Mikroskopen Aufnahmen vom Spülprotokoll 1 (48 h) und Spülprotokoll 2 (48,5 h) angefertigt.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt für jeden Proband zunächst einzeln, da sich in den Ergebnissen hinsichtlich der Wirkung der Spüllösungen große individuelle Unterschiede zeigten. Im Anschluss wurde der Mittelwert und die Standardabweichung für alle fünf Probanden gebildet, um eine generelle Aussage zur Effektivität des Walderdbeerblatt-Extrakts in Form einer regelmäßigen Mundspüllösung treffen zu können.

4.1 Proband 1

4.1.1 LIVE/DEAD® *BacLight*™ - Bedeckung und Viabilität

Die Analyse der Lebend-Tod-Rate mittels Fluoreszensmikroskopie resultierte bei Proband 1 in folgenden Werten:

Nach der Spülung mit Wasser (Negativkontrolle) wiesen die Prüfkörper im Spülprotokoll 1 (48 h) eine Bedeckung von 44 % und im Spülprotokoll 2 (48,5 h) eine Bedeckung von 27,5 % auf (Abb. 7). Bei der Spülung mit dem Walderdbeerblatt-Extrakt betrug die Bedeckung der Prüfkörper 90,8 % (48 h) und 55,54 % (48,5 h) (Abb. 7).

Beim Replikat-Versuch betrug die Bedeckung 17,7 % (48 h) und 25,66 % (48,5) (Abb. 7).

Bei der Spülung mit CHX als Positivkontrolle betrug die Bedeckung 0,044 % (48 h) und 0,011 % (48,5 h) (Abb. 7).

Abbildung 7 zeigt die Mittelwerte der Bedeckung der Prüfkörperoberfläche aus 12 Aufnahmen als ausgefüllte Fläche im Balkendiagramm.

Die Viabilität des Biofilms betrug nach der Wasserspülung 68,46 % (48 h) und 53,51 % (48,5 h) (Abb.7).

Nach der Spülung mit dem Walderdbeerblatt-Extrakt betrug die Viabilität 53,66 % (48 h) und 27,78 % (48,5 h) (Abb. 7).

Im Replikat-Versuch betrug die Viabilität 8,39 % (48 h) und 6,58 % (48,5 h) (Abb. 7).

Bei der Spülung mit CHX betrug die Viabilität 0,02 % (48 h) und 0,003 % (48,5h) (Abb.7).

Abbildung 7 zeigt die Mittelwerte der Viabilität der Prüfkörperoberfläche aus 12 Aufnahmen als schraffierte Fläche im Balkendiagramm.

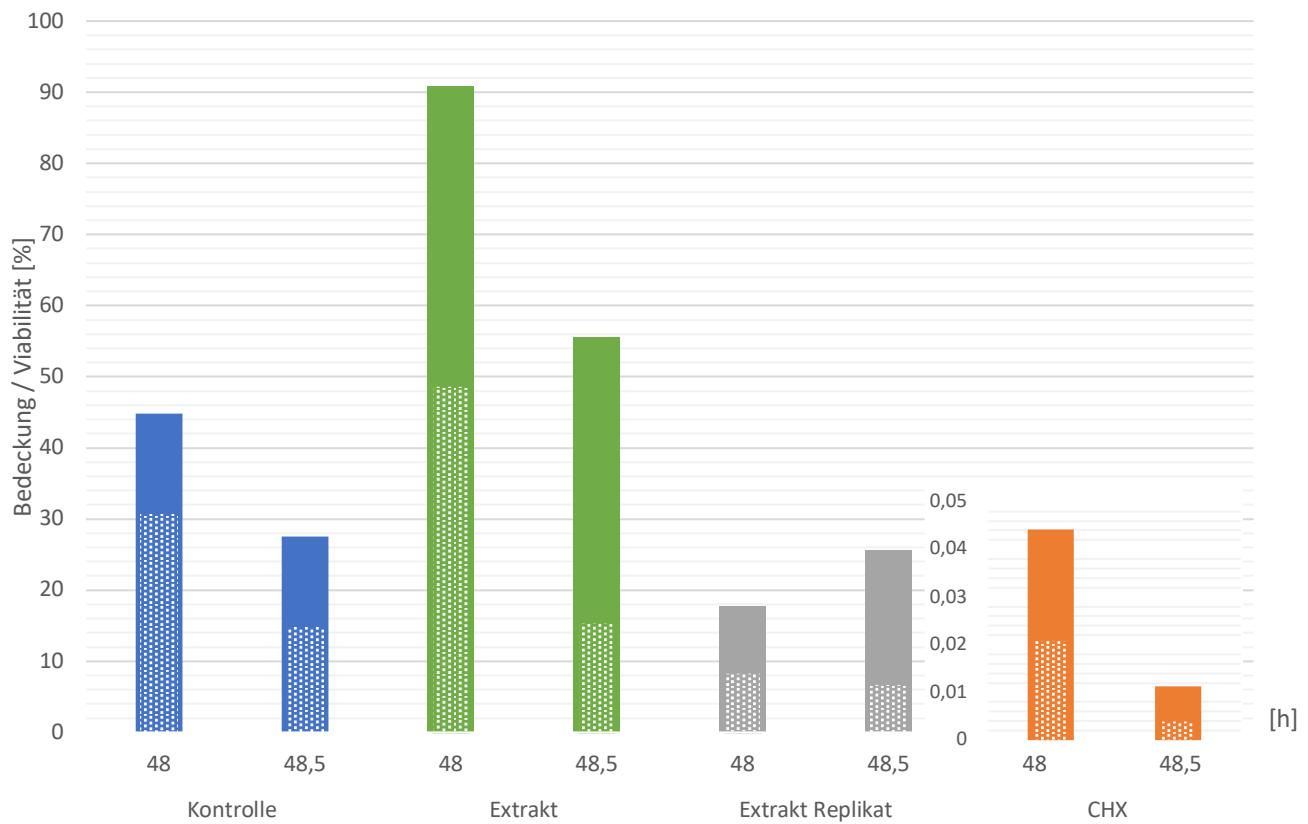


Abbildung 7: Die Biofilm-Bedeckung der Prüfkörperoberfläche und bakterielle Viabilität in [%] von Proband 1. Das Maß der Biofilm-Bedeckung der Prüfkörperoberfläche wird durch die ausgefüllte Fläche dargestellt. Die Viabilität wird durch die schraffierte Fläche prozentual zur Bedeckung angegeben. Die Höhe der Balken entspricht dem Mittelwert der 12 Aufnahmen. Nach 48 h (Spülprotokoll 1) und 48,5 h (Spülprotokoll 2) wurde die Wirkung des Walderdbeerblatt-Extrakts auf den oralen Biofilm untersucht.

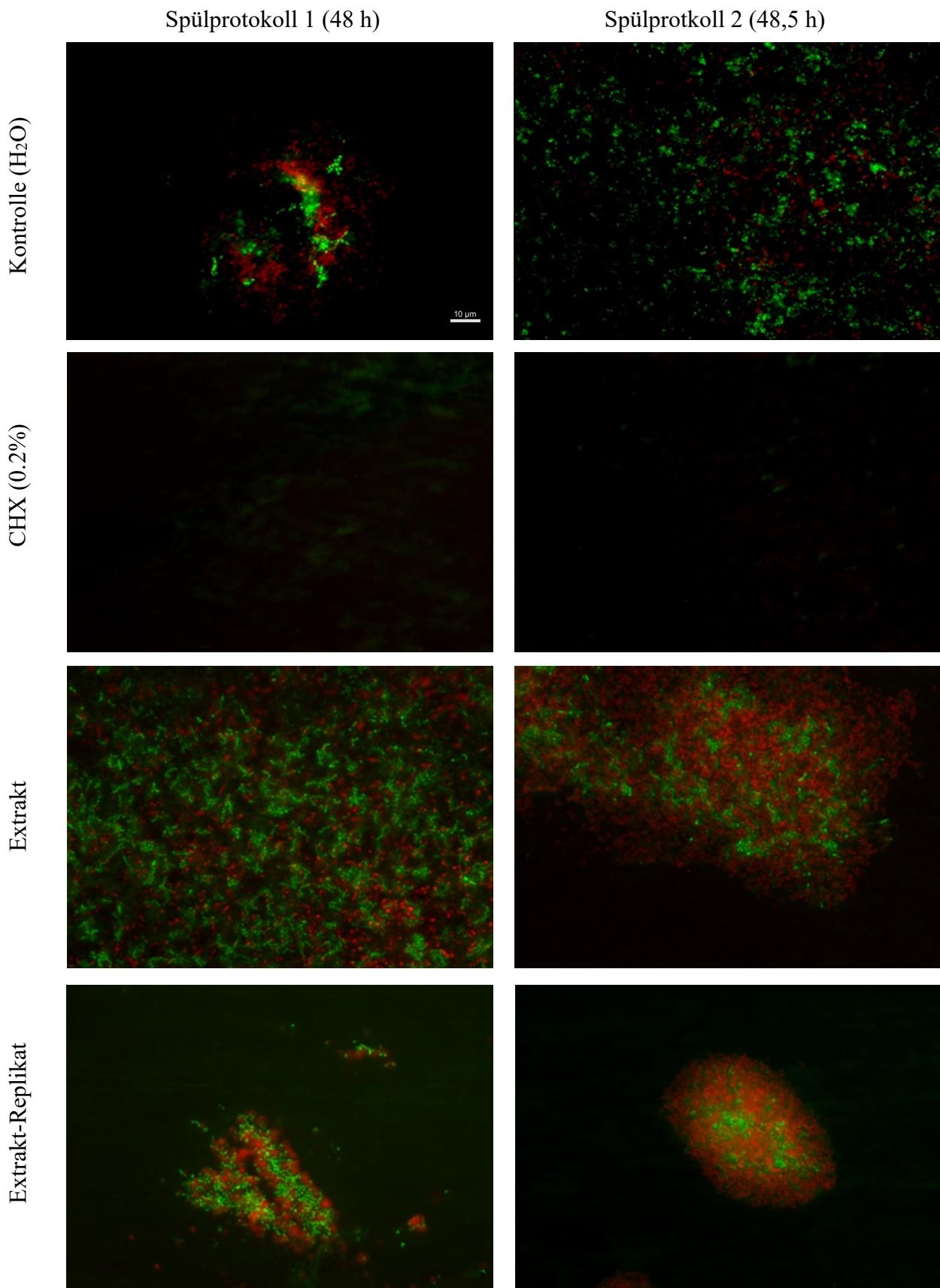


Abbildung 8: Repräsentative LIVE/DEAD® BacLight™ Bilder von Proband 1. Nach 48 h sowie 48,5 h erfolgte die ex-vivo Untersuchung mit einem Fluoreszenzmikroskop. Hierzu wurde der Biofilm mit LIVE/DEAD® BacLight™ gefärbt. Die lebenden Bakterien fluoreszieren grün und die toten Bakterien rot.

4.1.2 Rasterelektronenmikroskopie Proband 1

Die Schmelzprüfkörper wurden zunächst in einer Übersichtsaufnahme mit 24-facher Vergrößerung betrachtet. Anschließend wurden sie schrittweise mit Vergrößerungen von 500-, 1000-, 2000-, 5000-, 10.000- bis hin zu 20.000-fach untersucht.

Die zur Verifizierung der Fluoreszenzmikroskopie-Daten sowie der Analyse der Biofilm-Morphologie durchgeführte REM zeigt bei Proband 1 nach regelmäßiger Spülung mit H₂O sowohl bakterienfreie als auch Bereiche mit Bakterien. In höherer Vergrößerung (20.000x) sind Bakterien mit einer intakten Morphologie und die Pellikelschicht mit teilweise bakterienfreien Arealen zu erkennen (Abb. 9 a und b).

Die Prüfkörper der CHX-Spülung sind in beiden Vergrößerungen bakterienfrei und zeigen eine veränderte Pellikelstruktur (Abb. 9 c und d).

Die REM-Bilder der mit Extrakt gespülten Prüfkörper zeigen im Spülprotokoll 1 (48 h) in geringer Vergrößerung (1000x) eine Schmelzoberfläche mit sporadisch verteilten, kleinen Bakterienclustern (Abb. 9 e). In hoher Vergrößerung (20.000x) sieht man im Spülprotokoll 1 eine Biofilmmatrix und kokkoide Bakterien, deren Struktur unverändert erscheint (Abb. 9 f). Im Spülprotokoll 2 (48,5 h) erkennt man in geringer Vergrößerung einen teilweise mit Biofilm bedeckten Prüfkörper (Abb. 9 g). In hoher Vergrößerung sieht man einen bakterienfreien Prüfkörper und die Biofilmstruktur ist verändert (Abb. 9 h).

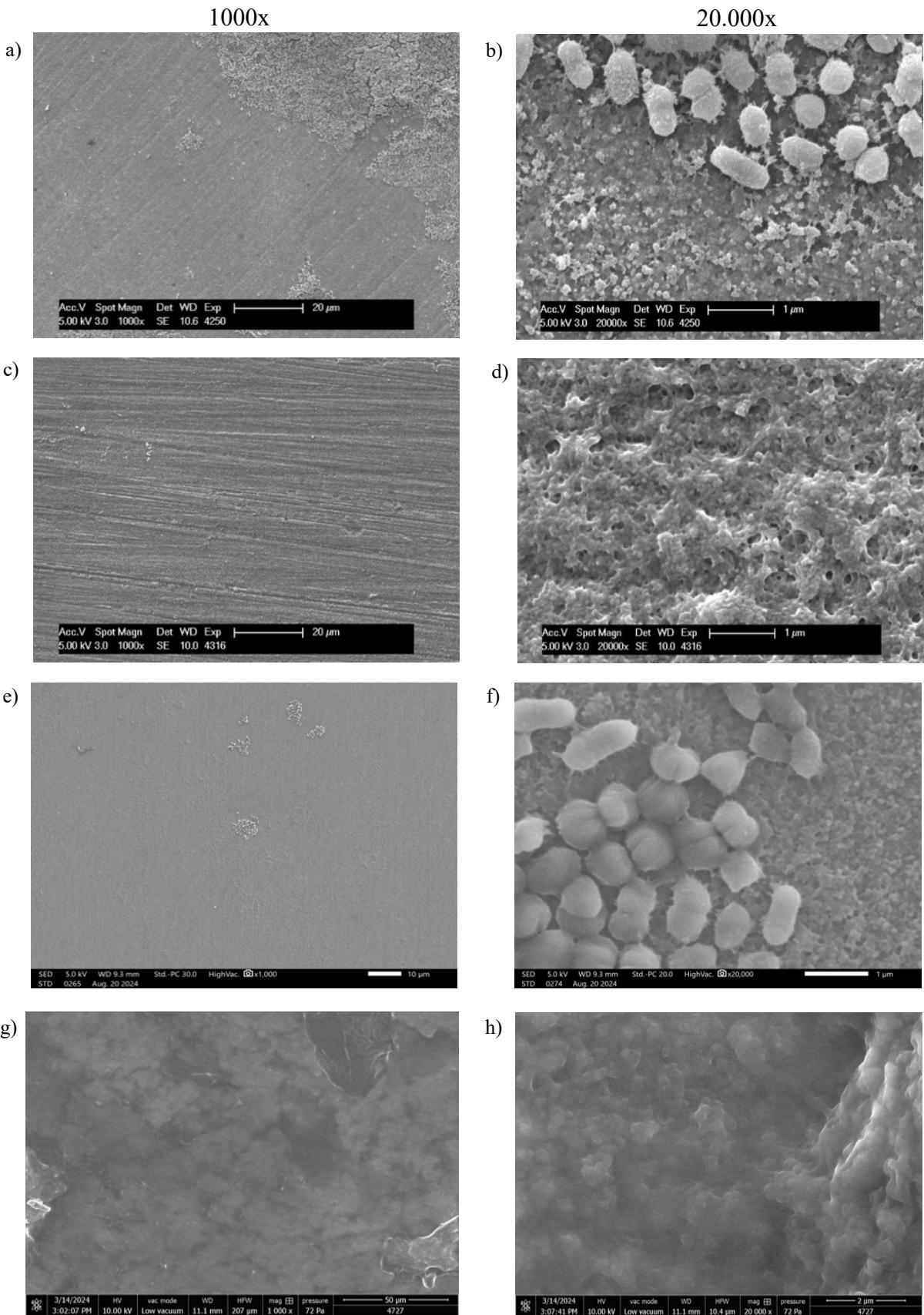
Kontrolle (H_2O) 48 h

Abbildung 9: REM-Aufnahmen in 1.000- und 20.000-facher Vergrößerung von Proband 1. 9 a und b zeigen die Negativkontrolle (Wasser), 9 c und d die Positivkontrolle (CHX 0.2 %), 9 e und f die Ergebnisse des Spülprotokolls 1 (48 h) und 9 g und h die Ergebnisse des Spülprotokolls 2 (48,5 h) des Walderdbeerblatt-Extrakts.

4.2 Proband 2

4.2.1 LIVE/DEAD® BacLight™ - Bedeckung und Viabilität

Die Analyse der Lebend-Tod-Rate mittels Fluoreszensmikroskopie resultierte bei Proband 2 in folgenden Werten:

Nach dem Spülprotokoll 1 mit Wasser (Negativkontrolle) wiesen die Prüfkörper nach 48 h eine Bedeckung von 25 % und nach dem Spülprotokoll 2 (48,5 h) eine Bedeckung von 49,16 % auf (Abb. 10).

Bei der Spülung mit dem Walderdbeerblatt-Extrakt betrug die Bedeckung 65,71 % (48 h) und 65,37 % (48,5 h) (Abb. 10).

Beim Replikat Versuch betrug die Bedeckung 24,24 % (48 h) und 3,32 % (48,5 h) (Abb. 10).

Bei der Spülung mit CHX als Positivkontrolle betrug die Bedeckung 0,003 % (48 h) und 0,01 % (48,5 h) (Abb. 10).

Abbildung 10 zeigt die Mittelwerte der Bedeckung der Prüfkörperoberfläche aus 12 Aufnahmen als ausgefüllte Fläche im Balkendiagramm.

Die Viabilität des Biofilms betrug nach der Wasserspülung im Spülprotokoll 1 (48 h) 44,48 % und nach dem Spülprotokoll 2 (48,5 h) 42,23 % (Abb. 10).

Nach der Spülung mit dem Walderdbeerblatt-Extrakt betrug die Viabilität 60,65 % (48 h) und 6,79 % (48,5 h) (Abb. 10).

Im Replikat-Versuch betrug die Viabilität 17,6 % (48 h) und 20,03 % (48,5 h) (Abb 10).

Bei der Spülung mit CHX betrug die Viabilität 0,001 % (48 h) und 0,003 % (48,5 h) (Abb. 10).

Abbildung 10 zeigt die Mittelwerte der Viabilität der Prüfkörperoberfläche aus 12 Aufnahmen als schraffierte Fläche im Balkendiagramm.

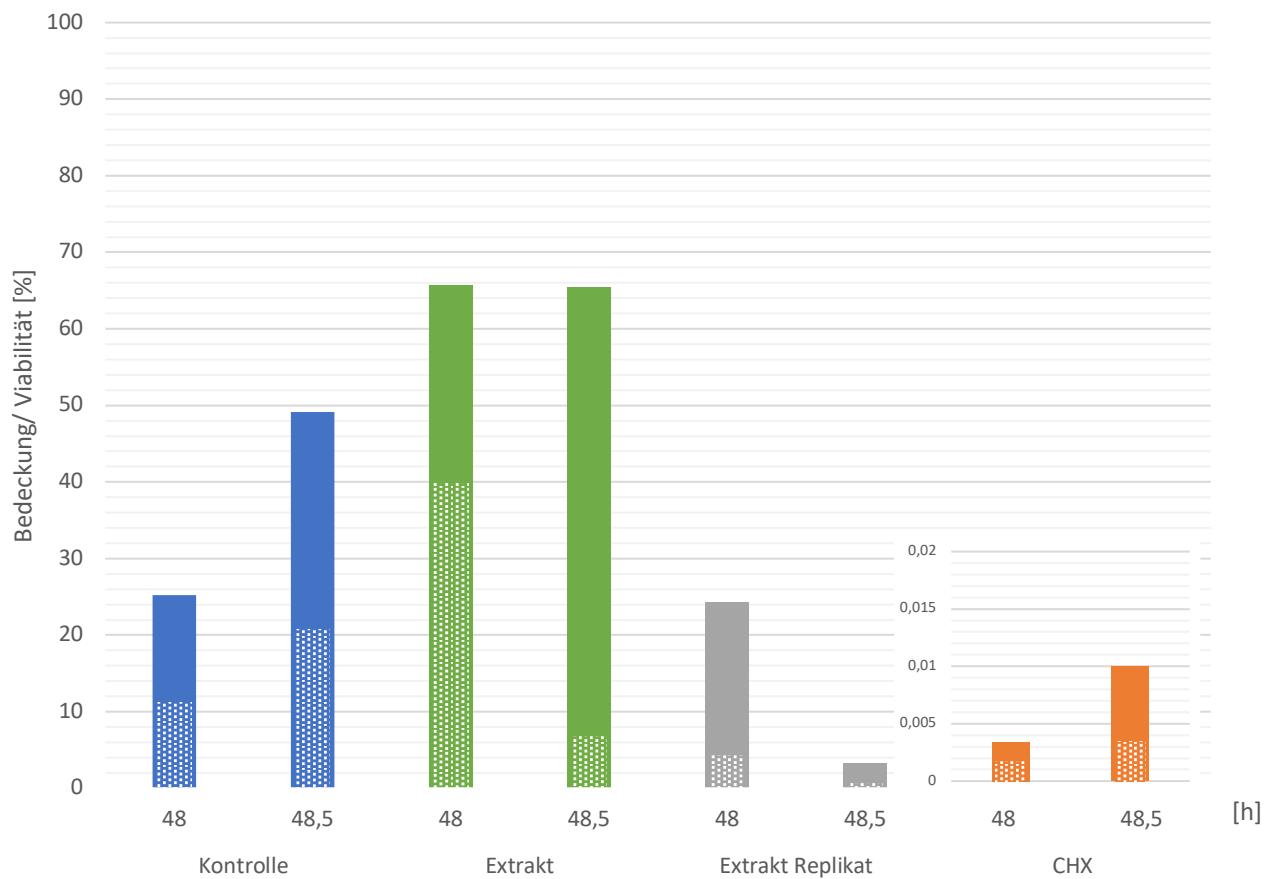


Abbildung 10: Die Biofilm-Bedeckung der Prüfkörperoberfläche und bakterielle Viabilität in [%] von Proband 2. Das Maß der Biofilm-Bedeckung der Prüfkörperoberfläche wird durch die ausgefüllte Fläche dargestellt. Die Viabilität wird durch die schraffierte Fläche prozentual zur Bedeckung angegeben. Die Höhe der Balken entspricht dem Mittelwert der 12 Aufnahmen. Nach 48 h (Spülprotokoll 1) und 48,5 h (Spülprotokoll 2) wurde die Wirkung des Walderdbeereblatt-Extrakts auf den oralen Biofilm untersucht.

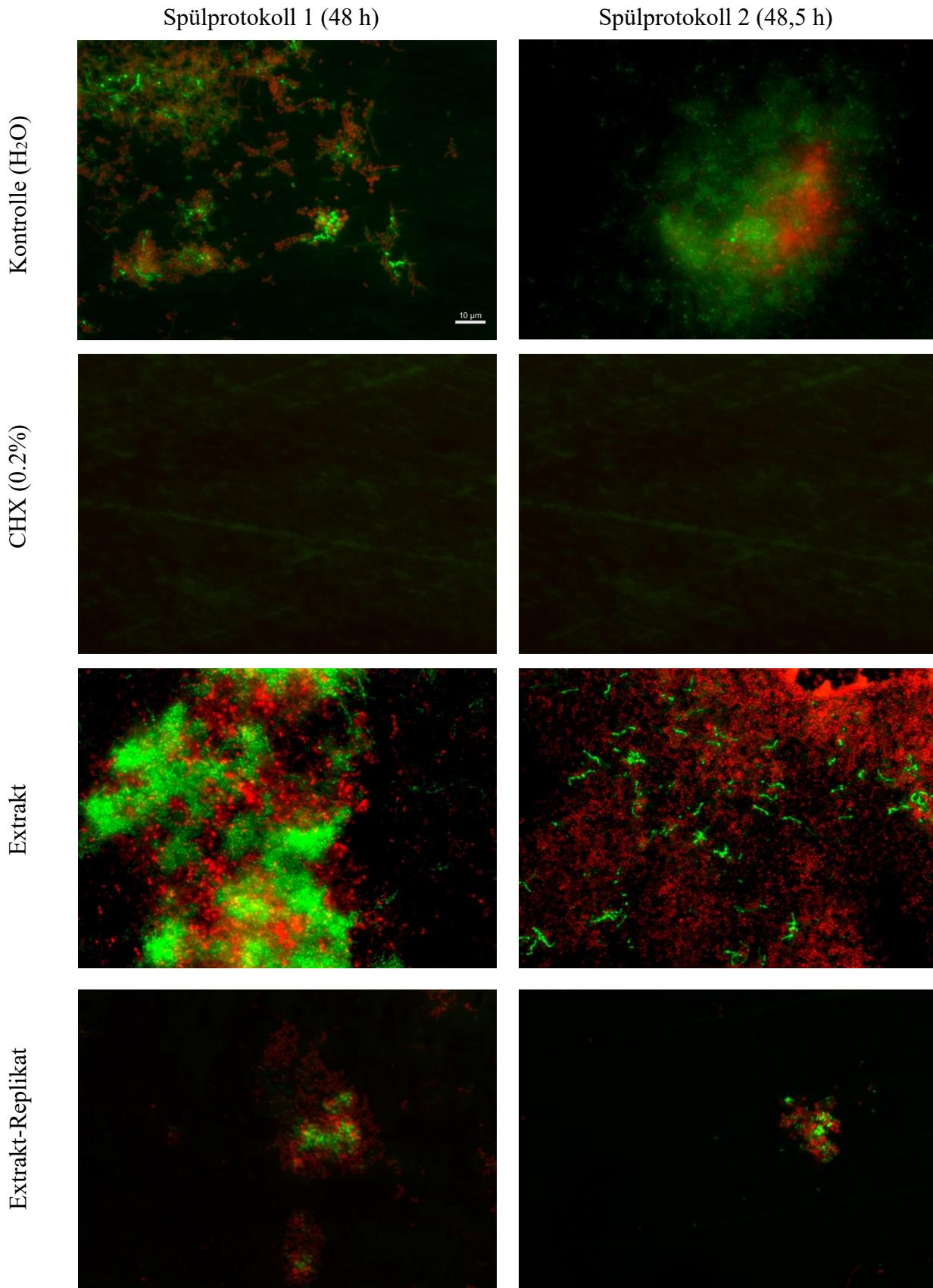


Abbildung 11: Repräsentative, fluoreszensmikroskopische LIVE/DEAD® BacLight™ Bilder von Proband 2. Nach 48 h sowie 48,5 h erfolgte die ex-vivo Untersuchung mit einem Fluoreszenzmikroskop. Hierzu wird der Biofilm mit LIVE/DEAD® BacLight™ gefärbt. Die lebenden Bakterien fluoreszieren grün und die toten Bakterien rot.

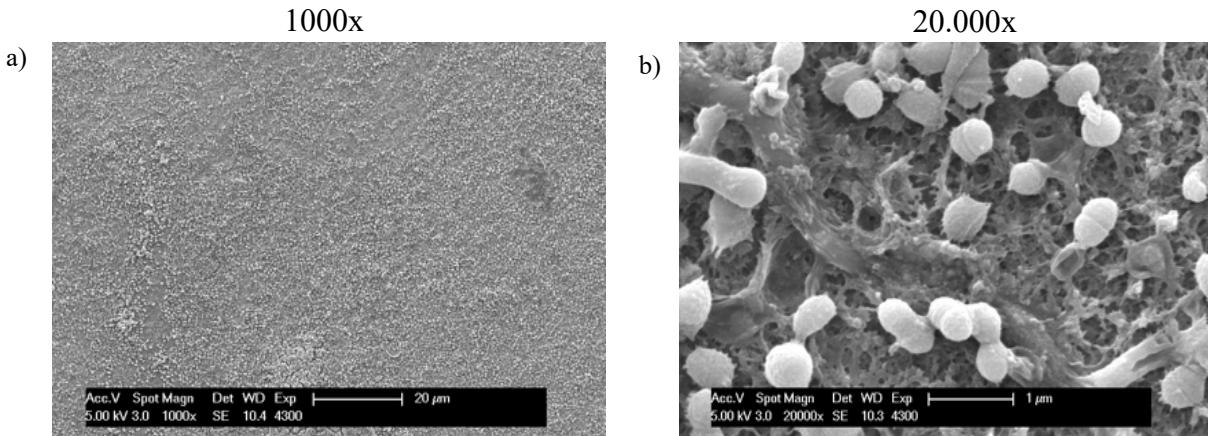
4.2.2 Rasterelektronenmikroskopie Proband 2

Die zur Verifizierung der Fluoreszenzmikroskopie-Daten sowie der Analyse der Biofilm-Morphologie durchgeführte REM zeigt bei Proband 2 in geringer Vergrößerung (1000x) nach regelmäßiger Spülung mit H₂O einen mit Biofilm bedeckten Prüfkörper (Abb. 12 a). In höherer Vergrößerung (20.000x) sind kokkoide und stäbchenförmige Bakterien mit einer intakten Morphologie in einer Biofilmmatrix zu sehen (Abb. 12 b).

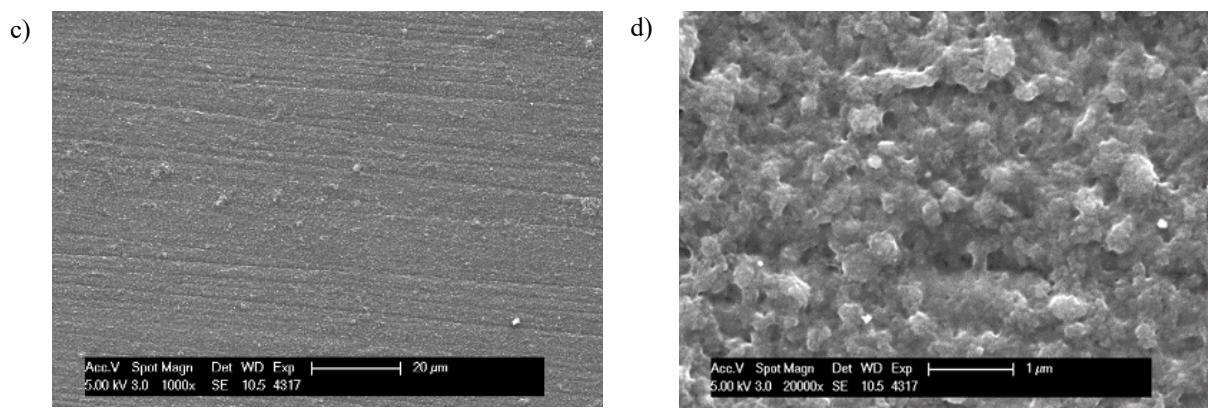
Die Prüfkörper der CHX-Spülung sind bakterienfrei und zeigen eine veränderte Biofilmmatrix sowie Pellikelstruktur (Abb. 12 c und d).

Im Replikat-Versuch zeigt sich sowohl im Spülprotokoll 1 (48 h) als auch im Spülprotokoll 2 (48,5 h) in geringer Vergrößerung eine teilweise mit Biofilm bedeckte Schmelzoberfläche (Abb. 12 e und g). In höherer Vergrößerung zeigen sich im Spülprotokoll 1 (48 h) eine veränderte Bakterienmorphologie sowie teilweise bakterienfreie Areale (Abb. 10 f). Im Spülprotokoll 2 (48,5 h) zeigen sich eine veränderte Pellikel- und Biofilmstruktur und vereinzelte Bakterien mit veränderter Morphologie (Abb. 12 h).

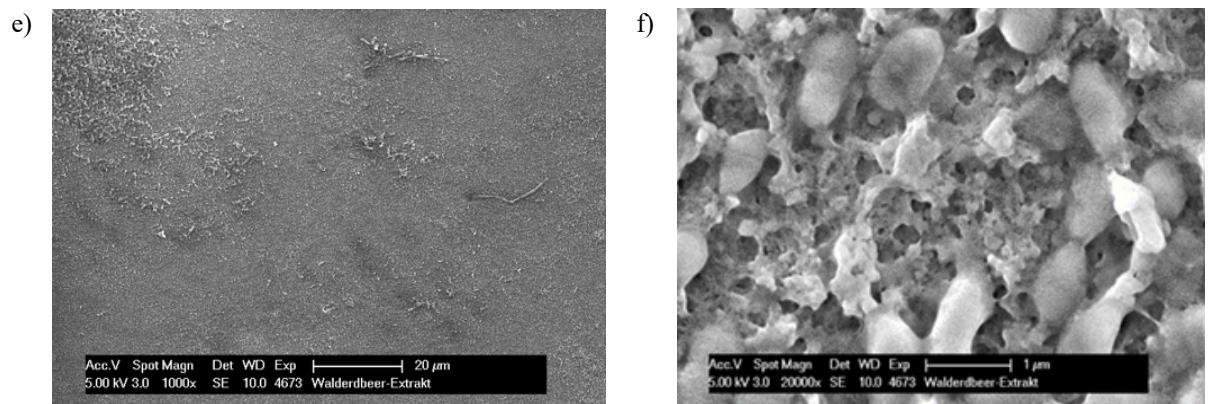
Kontrolle (H_2O) 48 h



CHX (0.2 %) 48 h



Extrakt-Replikat 48 h



Extrakt-Replikat 48,5 h

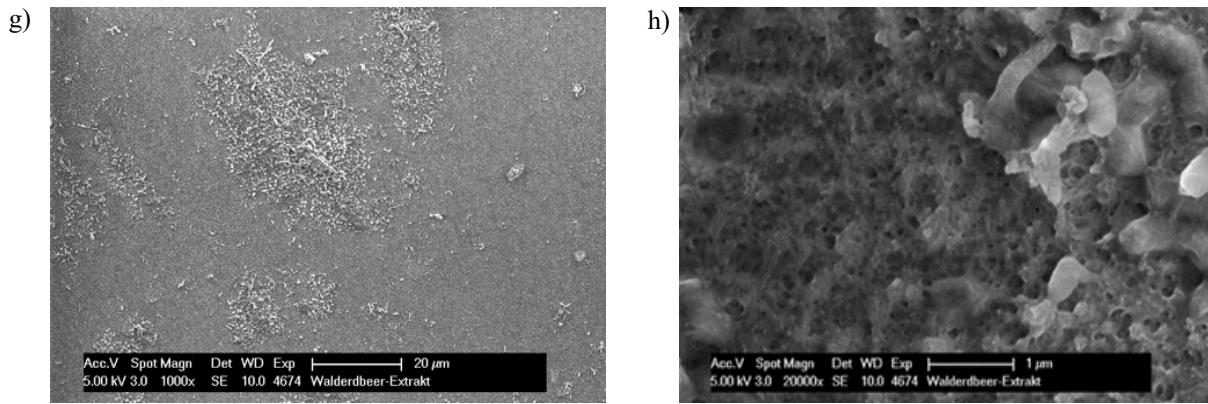


Abbildung 12: REM-Aufnahmen der Prüfkörper in 1.000- und 20.000-facher Vergrößerung von Proband 2. 12 a und b zeigen die Negativkontrolle (Wasser), 12 c und d die Positivkontrolle (CHX 0.2 %), 12 e und f die Ergebnisse des Spülprotokolls 1 (48 h) und 12 g und h des Spülprotokolls 2 (48,5 h) des Walderbeerblatt-Extrakts.

4.3 Proband 3

4.3.1 LIVE/DEAD® BacLight™ - Bedeckung und Viabilität

Die Analyse der Lebend-Tod-Rate mittels Fluoreszensmikroskopie resultierte bei Proband 3 in folgenden Werten:

Nach dem Spülprotokoll 1 (48 h) wiesen die Prüfkörper mit Wasser (Negativkontrolle) eine Bedeckung von 22,43 % und nach dem Spülprotokoll 2 (48,5 h) eine Bedeckung von 32,41 % auf (Abb. 13). Bei der Spülung mit dem Walderbeerblatt-Extrakt betrug die Bedeckung 61,95 % (48 h) und 83,35 % (48,5 h) (Abb. 13).

Beim Replikat-Versuch betrug die Bedeckung 19,91 % (48 h) und 31,18 % (48,5 h) (Abb. 13).

Bei der Spülung mit CHX als Positivkontrolle betrug die Bedeckung 0,35 % (48 h) und 0,19 % (48,5 h) (Abb. 13).

Abbildung 13 zeigt die Mittelwerte der Bedeckung der Prüfkörperoberfläche aus 12 Aufnahmen als ausgefüllte Fläche im Balkendiagramm.

Die Viabilität des Biofilms betrug nach der Wasserspülung im Spülprotokoll 1 18,9 % (48 h) und im Spülprotokoll 2 30,23 % (48,5 h) (Abb. 13).

Nach der Spülung mit dem Walderbeerblatt-Extrakt betrug die Viabilität 22,93 % (48 h) und 37,36 % (48,5 h) (Abb. 13).

Im Replikat-Versuch betrug die Viabilität 6,08 % (48 h) und 12,62 % (48,5 h) (Abb. 13).

Bei der Spülung mit CHX betrug die Viabilität 0,14 % (48 h) und 0,008 % (48,5 h) (Abb. 13).

Abbildung 13 zeigt die Mittelwerte der Viabilität der Prüfkörperoberfläche aus 12 Aufnahmen als schraffierte Fläche im Balkendiagramm.

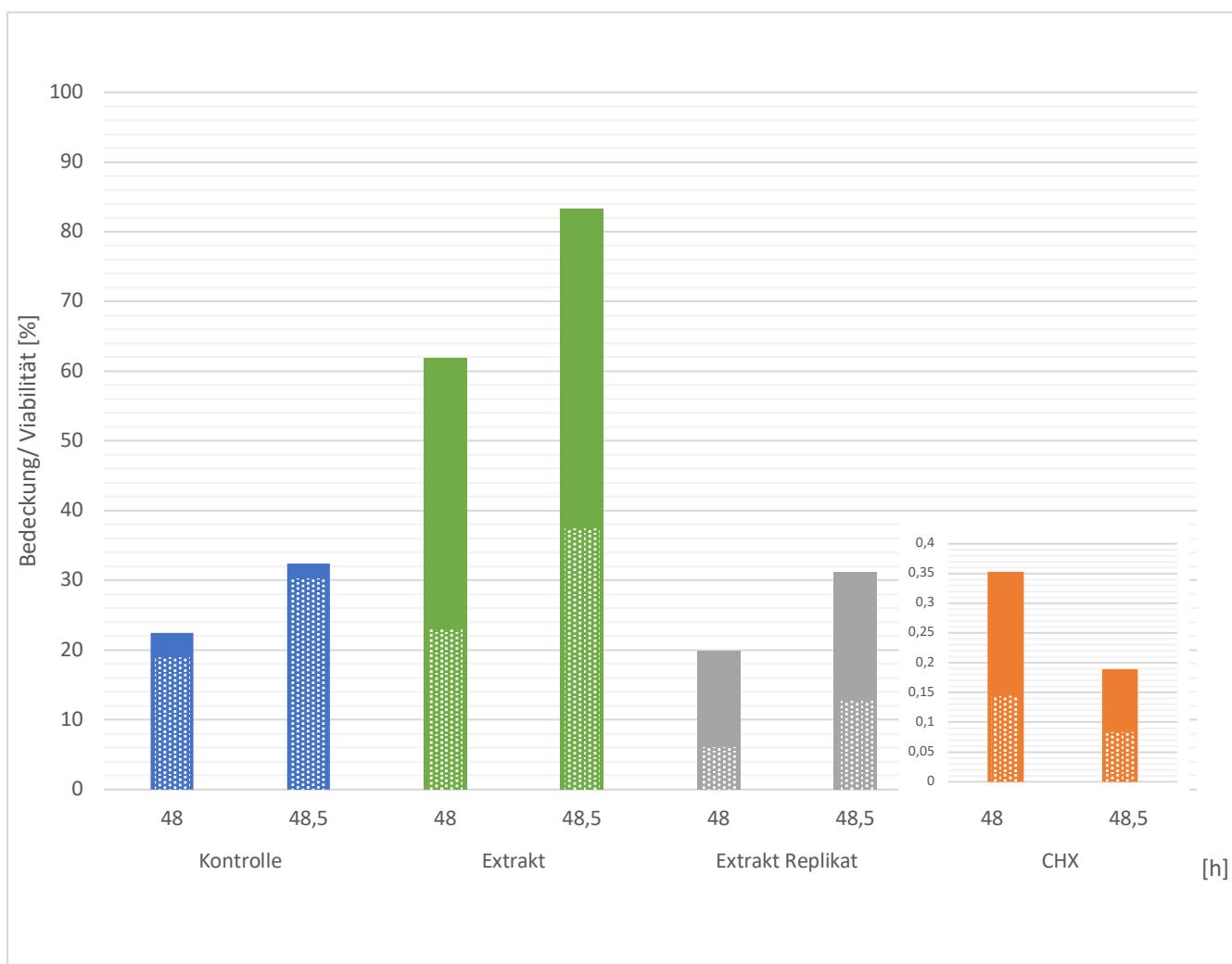


Abbildung 13: Die Biofilm-Bedeckung der Prüfkörperoberfläche und bakterielle Viabilität in [%] von Proband 3. Das Maß der Biofilm-Bedeckung der Prüfkörperoberfläche wird durch die ausgefüllte Fläche dargestellt. Die Viabilität wird durch die schraffierte Fläche prozentual zur Bedeckung angegeben. Die Höhe der Balken entspricht dem Mittelwert der 12 Aufnahmen. Nach 48 h (Spülprotokoll 1) und 48,5 h (Spülprotokoll 2) wurde die Wirkung des Walderdbeerblatt-Extrakts auf den oralen Biofilm untersucht.

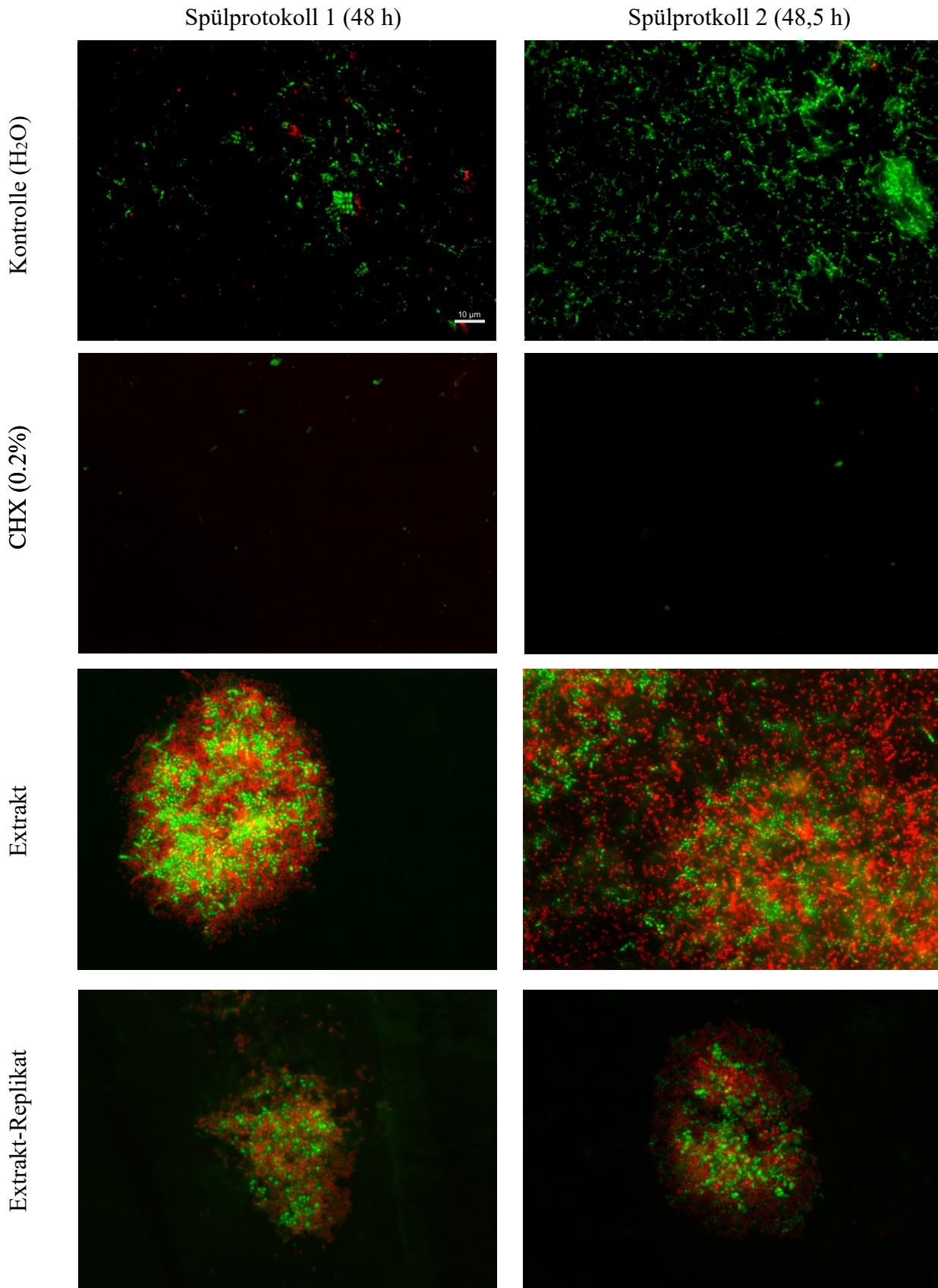


Abbildung 14: Repräsentative, fluoreszenzmikroskopische LIVE/DEAD® BacLight™ Bilder von Proband 3. Nach 48 h sowie 48,5 h erfolgte die ex-vivo Untersuchung mit einem Fluoreszenzmikroskop. Hierzu wird der Biofilm mit LIVE/DEAD® BacLight™ gefärbt. Die lebenden Bakterien fluoreszieren grün und die toten Bakterien rot.

4.3.2 Rasterelektronenmikroskopie Proband 3

Auch bei Proband 3 wurden zur Verifizierung der FM-Aufnahmen REM-Aufnahmen angefertigt.

Die Kontrolle mit H₂O zeigt in geringer Vergrößerung (1000x) einen Schmelzprüfkörper der komplett mit Biofilm bedeckt ist. In hoher Vergrößerung (20.000x) sieht man kokkoide und stäbchenförmige Bakterien mit einer intakten Morphologie sowie die Pellikelschicht mit teilweise bakterienfreien Arealen (Abb. 15 a und b).

Nach der CHX Spülung ist der Prüfkörper bakterienfrei und zeigt eine veränderte Pellikel- und Biofilmstruktur (Abb. 15 c und d).

Im Spülprotokoll 1 (48 h) mit dem Extrakt sieht man in beiden Vergrößerungen bakterienfreie Areale sowie Bakterien mit einer intakten Morphologie (Abb. 15 e und f). In Abb. 15 e ist ein Artefakt zu erkennen.

Im Spülprotokoll 2 (48,5 h) sieht man in geringer Vergrößerung (1000x) weniger mit Biofilm bedeckte Areale des Schmelzprüfkörpers. In hoher Vergrößerung (20.000x) ist eine veränderte Biofilmmatrix zu erkennen. Zudem haben die Bakterien eine veränderte Morphologie (Abb. 15 g und h).

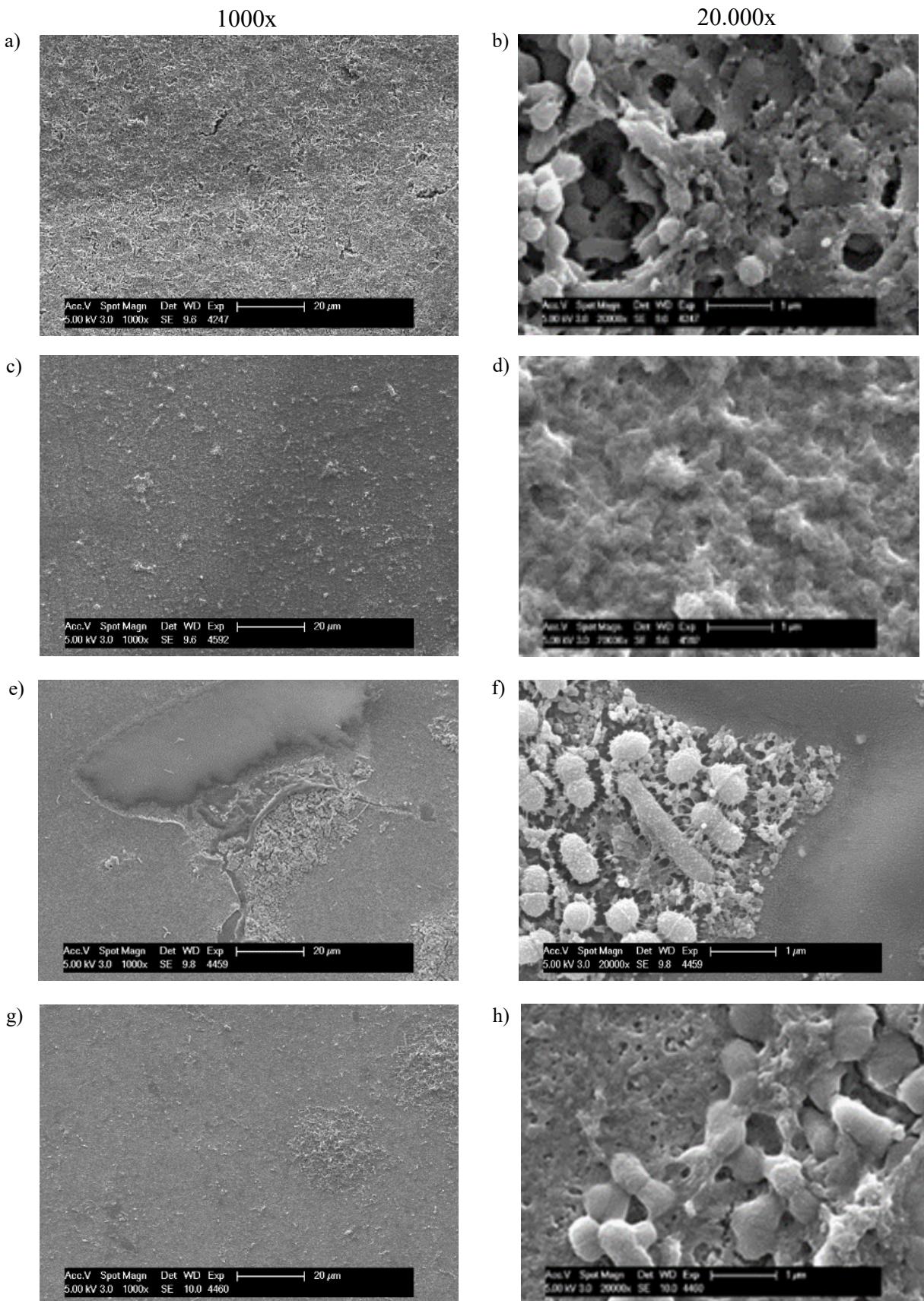
Kontrolle (H_2O) 48 h

Abbildung 15: REM-Aufnahmen der Prüfkörper in 1.000- und 20.000-facher Vergrößerung von Proband 3. 15 a und b zeigen die Negativkontrolle (Wasser), 15 c und d die Positivkontrolle (CHX 0.2 %), 15 e und f die Ergebnisse des Spülprotokolls 1 und 15 g und h des Spülprotokolls 2 des Walderdbeerblatt-Extrakts.

4.4 Proband 4

4.4.1 LIVE/DEAD® BacLight™ - Bedeckung und Viabilität

Die Analyse der Lebend-Tod-Rate mittels Fluoreszensmikroskopie resultierte bei Proband 4 in folgenden Werten:

Nach der Spülung mit Wasser (Negativkontrolle) wiesen die Prüfkörper nach dem Spülprotokoll 1 (48 h) eine Bedeckung von 29,14 % und nach dem Spülprotokoll 2 (48,5 h) eine Bedeckung von 26,83 % auf (Abb. 16).

Bei der Spülung mit dem Walderdbeerblatt-Extrakt betrug die Bedeckung 50,14 % (48 h) und 52,84 % (48,5 h) (Abb. 16).

Beim Replikat-Versuch betrug die Bedeckung 38,42 % (48 h) und 48,93 % (48,5 h) (Abb. 16).

Bei der Spülung mit CHX als Positivkontrolle betrug die Bedeckung 0,015 % (48 h) und 0,002 % (48,5 h) (Abb. 16).

Abbildung 16 zeigt die Mittelwerte der Bedeckung der Prüfkörperoberfläche aus 12 Aufnahmen als ausgefüllte Fläche im Balkendiagramm.

Die Viabilität des Biofilms betrug nach der Wasserspülung 16,75 % (48 h) und 19,9 % (48,5 h) (Abb. 16).

Nach der Spülung mit dem Walderdbeerblatt-Extrakt betrug die Viabilität 33,36 % (48 h) und 8,03 % (48,5 h) (Abb. 16).

Im Replikat-Versuch betrug die Viabilität 11,96 % (48 h) und 11,01 % (48,5 h) (Abb. 16).

Bei der Spülung mit CHX betrug die Viabilität 0,013 % (48 h) und 0,001 % (48,5 h) (Abb. 16).

Abbildung 16 zeigt die Mittelwerte der Viabilität der Prüfkörperoberfläche aus 12 Aufnahmen als schraffierte Fläche im Balkendiagramm.

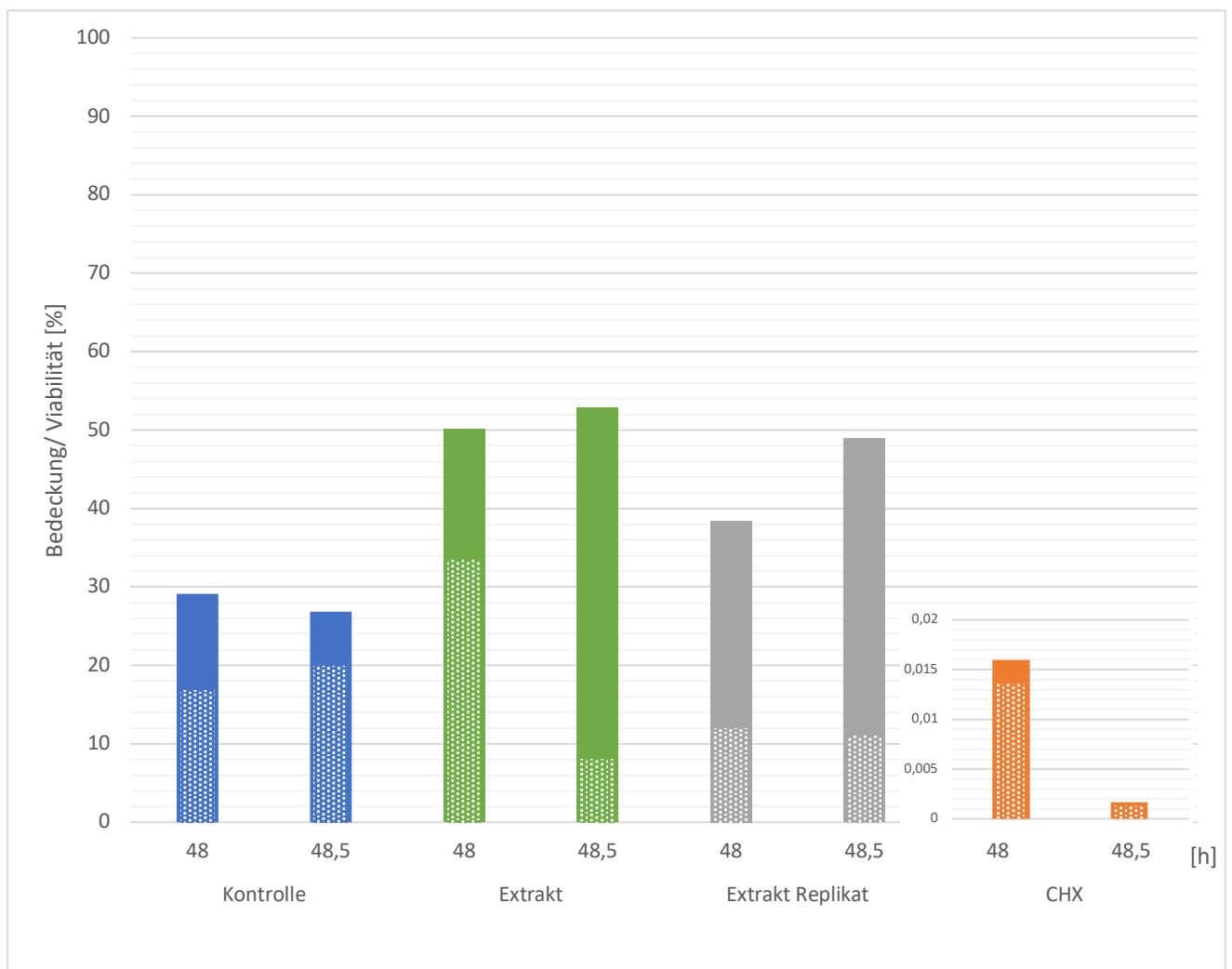


Abbildung 16: Die Biofilm-Bedeckung der Prüfkörperoberfläche und bakterielle Viabilität in [%] von Proband 4. Das Maß der Biofilm-Bedeckung der Prüfkörperoberfläche wird durch die ausgefüllte Fläche dargestellt. Die Viabilität wird durch die schraffierte Fläche prozentual zur Bedeckung angegeben. Die Höhe der Balken entspricht dem Mittelwert der 12 Aufnahmen. Nach 48 h (Spülprotokoll 1) und 48,5 h (Spülprotokoll 2) wurde die Wirkung des Walderdbeerblatt-Extrakts auf den oralen Biofilm untersucht.

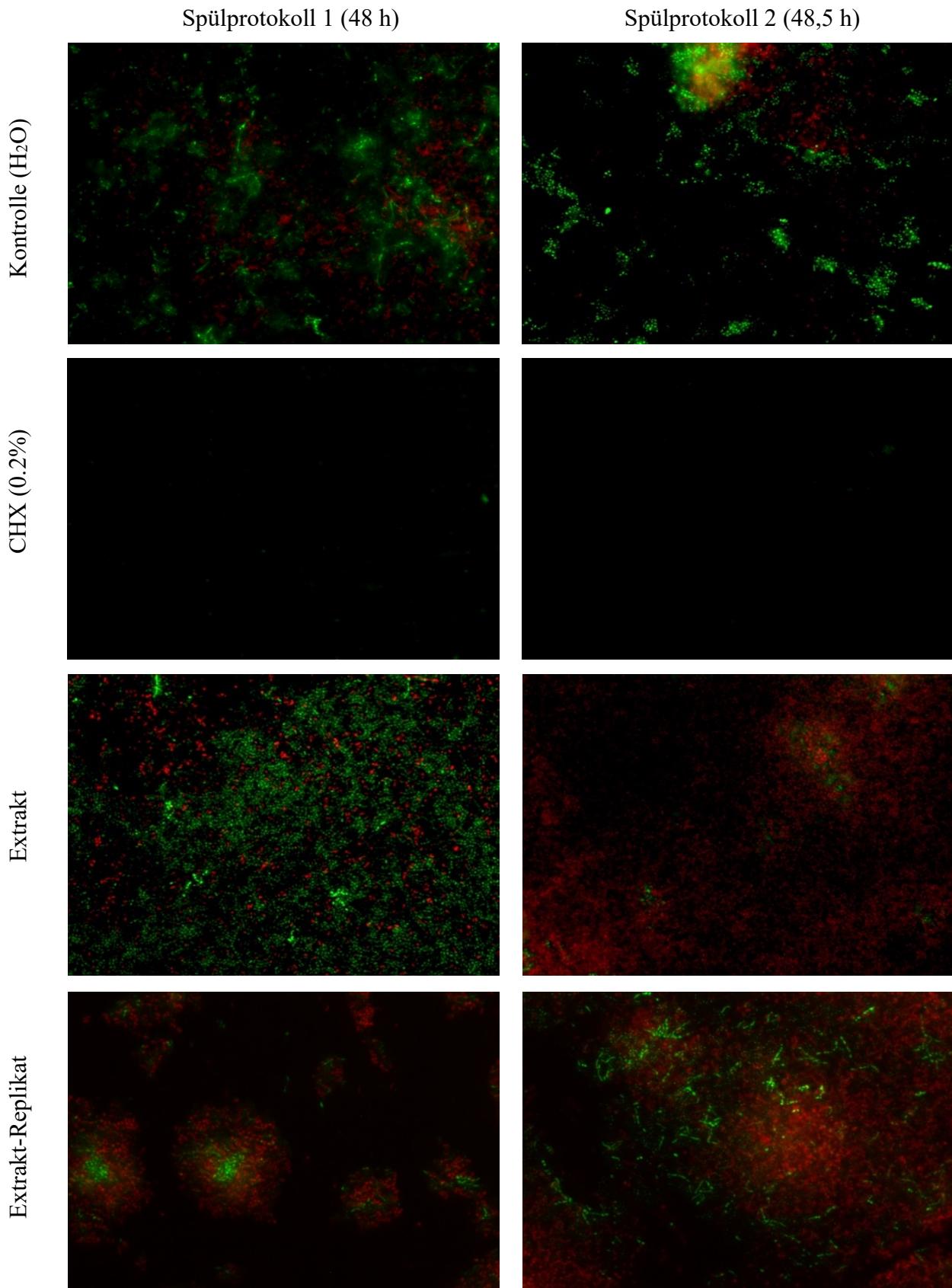


Abbildung 17: Repräsentative, fluoreszensmikroskopische LIVE/DEAD® BacLight™ Bilder von Proband 4. Nach 48 h sowie 48,5 h erfolgte die ex-vivo Untersuchung mit einem Fluoreszenzmikroskop. Hierzu wird der Biofilm mit LIVE/DEAD® BacLight™ gefärbt. Die lebenden Bakterien fluoreszieren grün und die toten Bakterien rot.

4.4.2 Rasterelektronenmikroskopie Proband 4

Die durchgeführte Rasterelektronenmikroskopie zur Verifizierung der FM-Ergebnisse zeigt bei Proband 4 in der Negativkontrolle in geringer Vergrößerung eine Schmelzoberfläche mit sporadisch verteilten Bakterien, die nur einen kleinen Teil der Oberfläche bedecken (Abb. 18 a). In hoher Vergrößerung sind eine Biofilmmatrix sowie intakte kokkoide Bakterien zu erkennen. (Abb. 18 b)

Die Prüfkörper des CHX-Versuchs haben eine bakterienfreie Oberfläche und zeigen eine veränderte Biofilmmatrix und Pellikelstruktur (Abb. 18 c und d).

Die REM-Bilder des Replikat-Versuchs zeigen in geringer Vergrößerung (1000x) nach dem Spülprotokoll 1 (48 h) eine mit Biofilm bedeckte Oberfläche (Abb. 18 e). Nach dem Spülprotokoll 2 (48,5 h) sieht man eine bedeckte Oberfläche mit vereinzelten Bakterien (Abb. 18 g).

In hoher Vergrößerung (20.000x) sieht man nach dem Spülprotokoll 1 (48 h) vereinzelte kokkoide Bakterien, die in der Biofilmmatrix eingebettet sind. Ihre Morphologie erscheint unverändert (Abb. 18 f). Nach dem Spülprotokoll 2 (48,5 h) weist die vorhandene Biofilmmatrix eine veränderte Struktur auf (Abb. 18 h).

Kontrolle (H_2O) 48 h

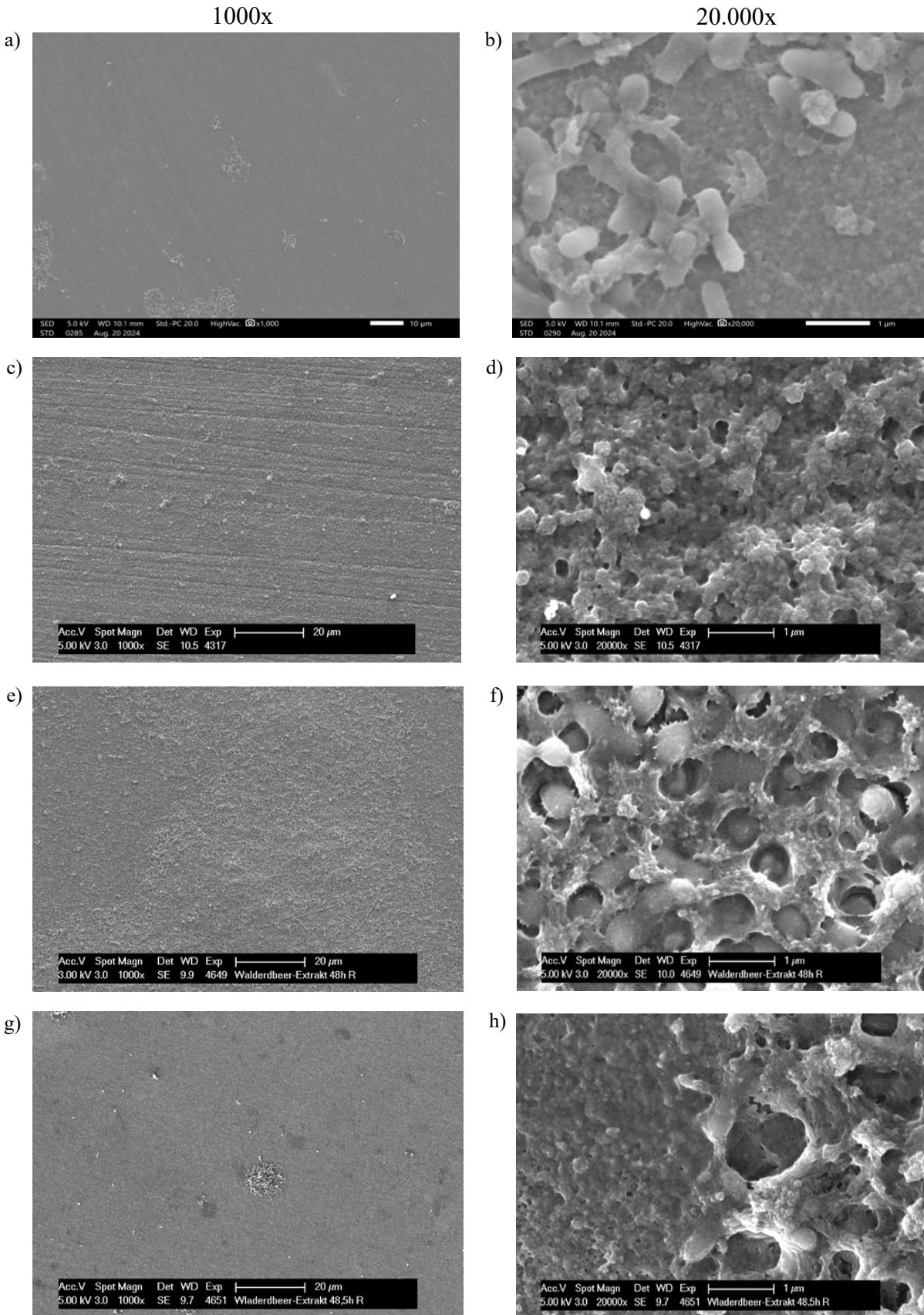


Abbildung 18: REM-Aufnahmen der Prüfkörper in 1.000- und 20.000-facher Vergrößerung von Proband 4. 18 a und b zeigen die Negativkontrolle (Wasser), 18 c und d die Positivkontrolle (CHX 0.2 %), 18 e und f die Ergebnisse des Spülprotokolls 1 (48 h) und 18 g und h des Spülprotokolls 2 (48,5 h) des Walderbeerblatt-Extrakts.

4.4.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Bei Proband 4 wurden neben den REM-Aufnahmen auch noch transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Diese dienen dem Einblick in die Ultrastruktur des Biofilms.

Repräsentative TEM-Bilder in verschiedenen Vergrößerungen zeigen die Biofilmstruktur der Wasserkontrolle und bei Spülung mit dem Walderdbeerblatt-Extrakt. Auf die Anfertigung von TEM-Aufnahmen nach der CHX-Spülung wurde verzichtet, da die antibakteriellen und antiadhärenten Eigenschaften von Chlorhexidin in früheren Studien bereits umfassend dokumentiert worden sind (Martínez-Hernández et al., 2020; Schestakow, Pütz, et al., 2022).

Abbildung 19 a und b (Spülprotokoll 1) und Abbildung 20 (Spülprotokoll 2) zeigen repräsentative TEM-Bilder nach der Anwendung von Wasser als Spüllösung (Negativkontrolle).

Deutlich erkennbar ist das Pellikel als wenige Nanometer dünne, elektronendichte Schicht, die sich an der ehemaligen Schmelzseite (schwarzer Stern) befindet (s. Abb. 19 b und 20). An die Pellikelschicht schließt sich die Biofilmmatrix an. Innerhalb dieser Biofilmstruktur sind kokkoiden Bakterien zu erkennen, deren Morphologie in allen Schichten intakt ist. (s. Abb. 19 a und 20). Die Dicke des Biofilms beträgt an einer repräsentativen Messstelle ca. 9,5 μm (s. Abb. 20).

In den repräsentativen TEM-Aufnahmen des Walderdbeerblatt-Extrakts im Spülprotokoll 1 (48 h) sieht man ebenfalls, wie bei der Negativkontrolle, die typische Biofilmstruktur, bestehend aus der Pellikelschicht, der Biofilmmatrix und aus kokkoiden Bakterien. Im Vergleich zur Negativkontrolle hat der Biofilm im Walderdbeerblatt-Extrakt Versuch eine deutlich geringere Schichtstärke. An einer repräsentativen Messstelle beträgt die Dicke ca. 3 μm (s. Abb. 21 a). Die kokkoiden Bakterien sind im Vergleich zur Negativkontrolle weniger homogen verteilt (s. Abb. 21 a und b). Die Biofilmmatrix erscheint deutlich dichter als in der Negativkontrolle (s. blauer Pfeil Abb. 21 b). Zudem ist ein lytisches Verhalten der Bakterien zu erkennen (s. schwarze Pfeile Abb. 21 a). Die schwarzen Balken innerhalb des Biofilms sind Artefakte (s. Abb. 21 a und b). Des Weiteren erkennt man eine elektronendichtere Pellikelschicht als in der Negativkontrolle (s. Abb. 21 c).

Im Spülprotokoll 2 (48,5 h) sieht man eine deutliche Reduktion der Schichtdicke des Biofilms (s. Abb. 22 a). Des Weiteren ist auch hier ein lytisches Verhalten der kokkoiden Bakterien im Vergleich zur Wasserkontrolle zu erkennen (s. Pfeil Abb. 22 a). Die Pellikelschicht erscheint weniger homogen als in der Negativkontrolle (s. Abb. 22 b und c).

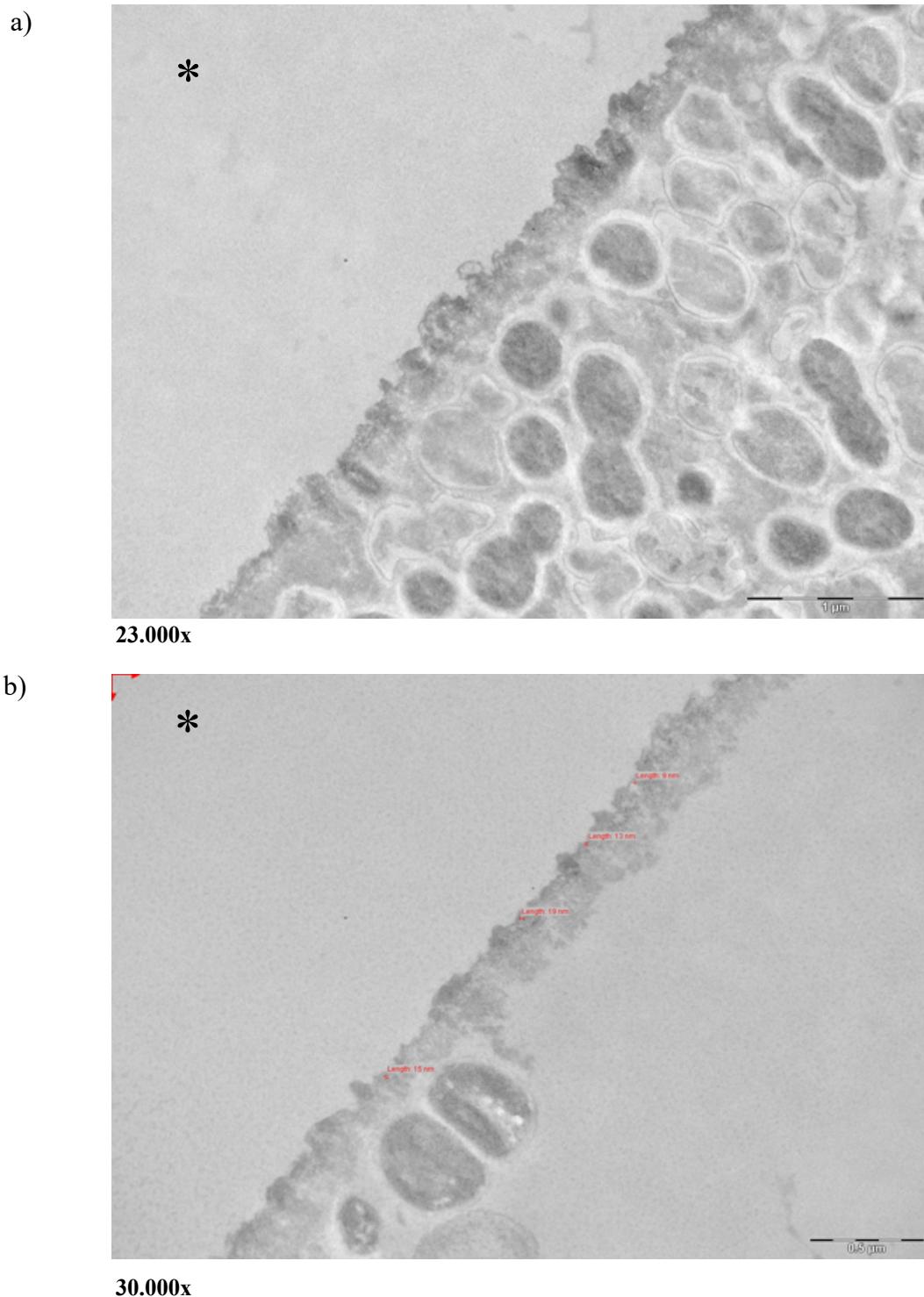
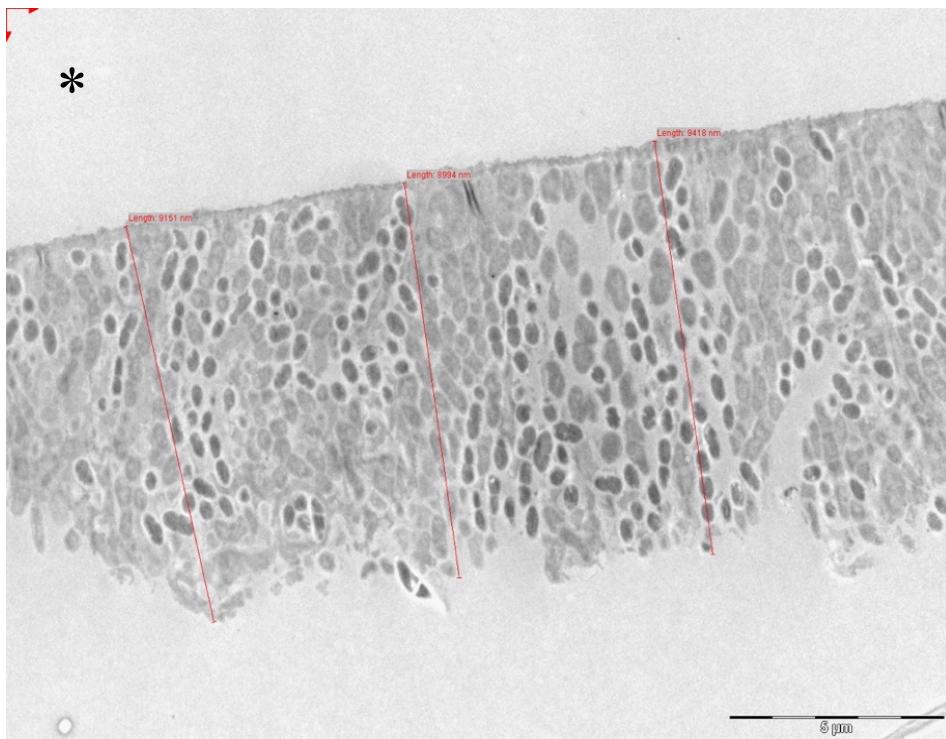


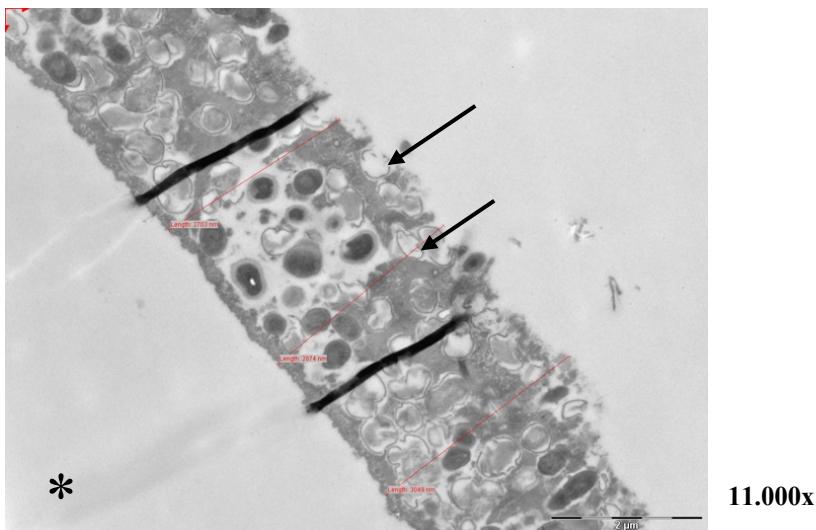
Abbildung 19: TEM-Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen des Biofilms von Proband 4 im Spülprotokoll 1 nach Anwendung von Wasser (Negativkontrolle). Der Stern markiert die ehemalige Schmelzseite.



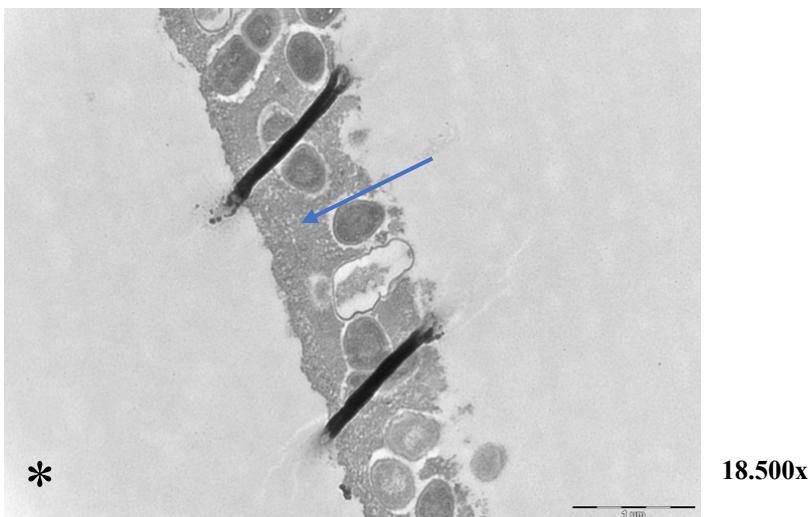
4.800x

Abbildung 20:TEM-Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen des Biofilms von Proband 4 im Spülprotokoll 2 nach Anwendung von Wasser. Der Stern markiert die ehemalige Schmelzseite.

a)



b)



c)

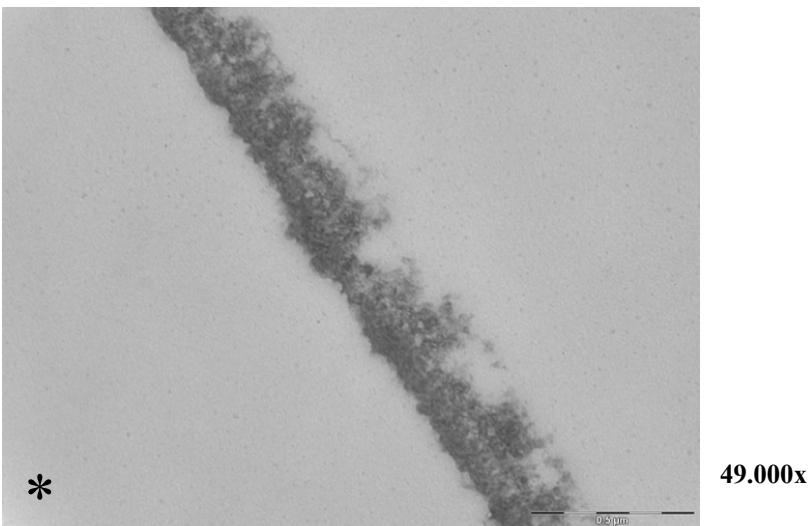


Abbildung 21: TEM-Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen des Biofilms von Proband 4 im Spülprotokoll 1 nach der Anwendung des Walderbeerblatt-Extrakts. Der Stern markiert die ehemalige Schmelzseite. Die schwarzen Pfeile zeigen das lytische Verhalten der Bakterien. Der blaue Pfeil zeigt die dichtere Biofilmmatrix als in der Negativkontrolle.

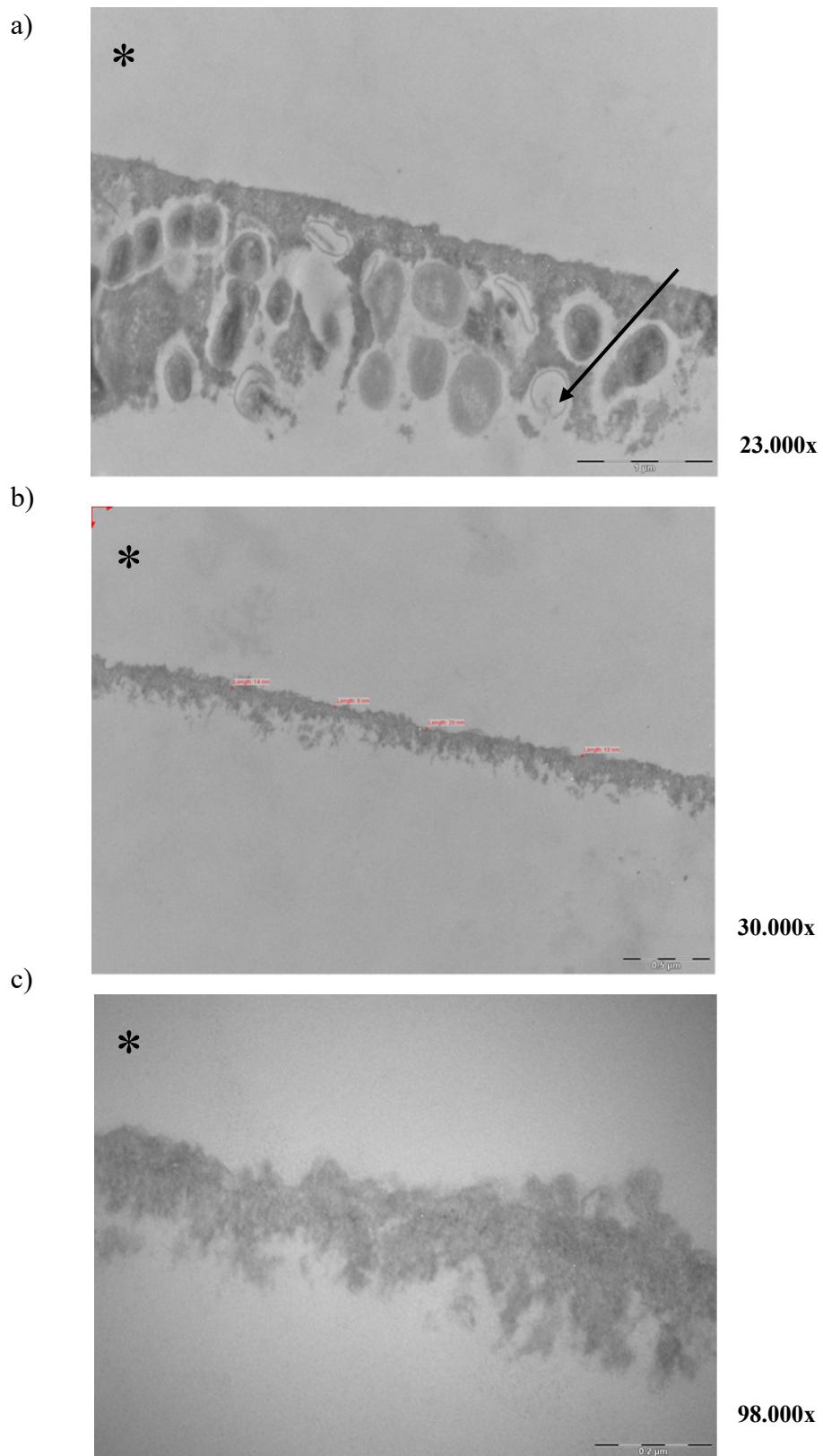


Abbildung 22: TEM-Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen des Biofilms von Proband 4 im Spülprotokoll 2 nach der Anwendung des Walderbeerblatt-Extrakts. Der Stern markiert die ehemalige Schmelzseite. Der schwarze Pfeil zeigt das lytische Verhalten der Bakterien.

4.5 Proband 5

4.5.1 LIVE/DEAD® BacLight™ - Bedeckung und Viabilität

Die Analyse der Lebend-Tot-Rate mittels Fluoreszensmikroskopie resultierte bei Proband 4 in folgenden Werten:

Nach der Spülung mit Wasser (Negativkontrolle) wiesen die Prüfkörper im Spülprotokoll 1 (48 h) eine Bedeckung von 58,02 % und im Spülprotokoll 2 (48,5 h) eine Bedeckung von 60,48 % auf (Abb. 23). Bei der Spülung mit dem Walderdbeerblatt-Extrakt betrug die Bedeckung 5,54 % (48 h) und 15,65 % (48,5 h) (Abb. 23).

Beim Replikat-Versuch betrug die Bedeckung 2,35 % (48 h) und 12,73 % (48,5 h) (Abb. 23). Bei der Spülung mit CHX als Positivkontrolle betrug die Bedeckung 0,14 % (48 h) und 0,19% (48,5 h) (Abb. 23).

Abbildung 23 zeigt die Mittelwerte der Bedeckung der Prüfkörperoberfläche aus 12 Aufnahmen als ausgefüllte Fläche im Balkendiagramm.

Die Viabilität des Biofilms betrug nach der Wasserspülung 28,75 % (48 h) und 20,68 % (48,5 h) (Abb. 23).

Nach der Spülung mit dem Walderdbeerblatt-Extrakt betrug die Viabilität 1,3 % (48 h) und 5,21 % (48,5 h) (Abb. 23).

Im Replikat-Versuch betrug die Viabilität 1,01 % (48 h) und 4,31 % (48,5 h) (Abb. 23).

Bei der Spülung mit CHX betrug die Viabilität 0,04 % (48 h) und 0,11 % (48,5 h) (Abb. 23).

Abbildung 23 zeigt die Mittelwerte der Viabilität der Prüfkörperoberfläche aus 12 Aufnahmen als schraffierte Fläche im Balkendiagramm.

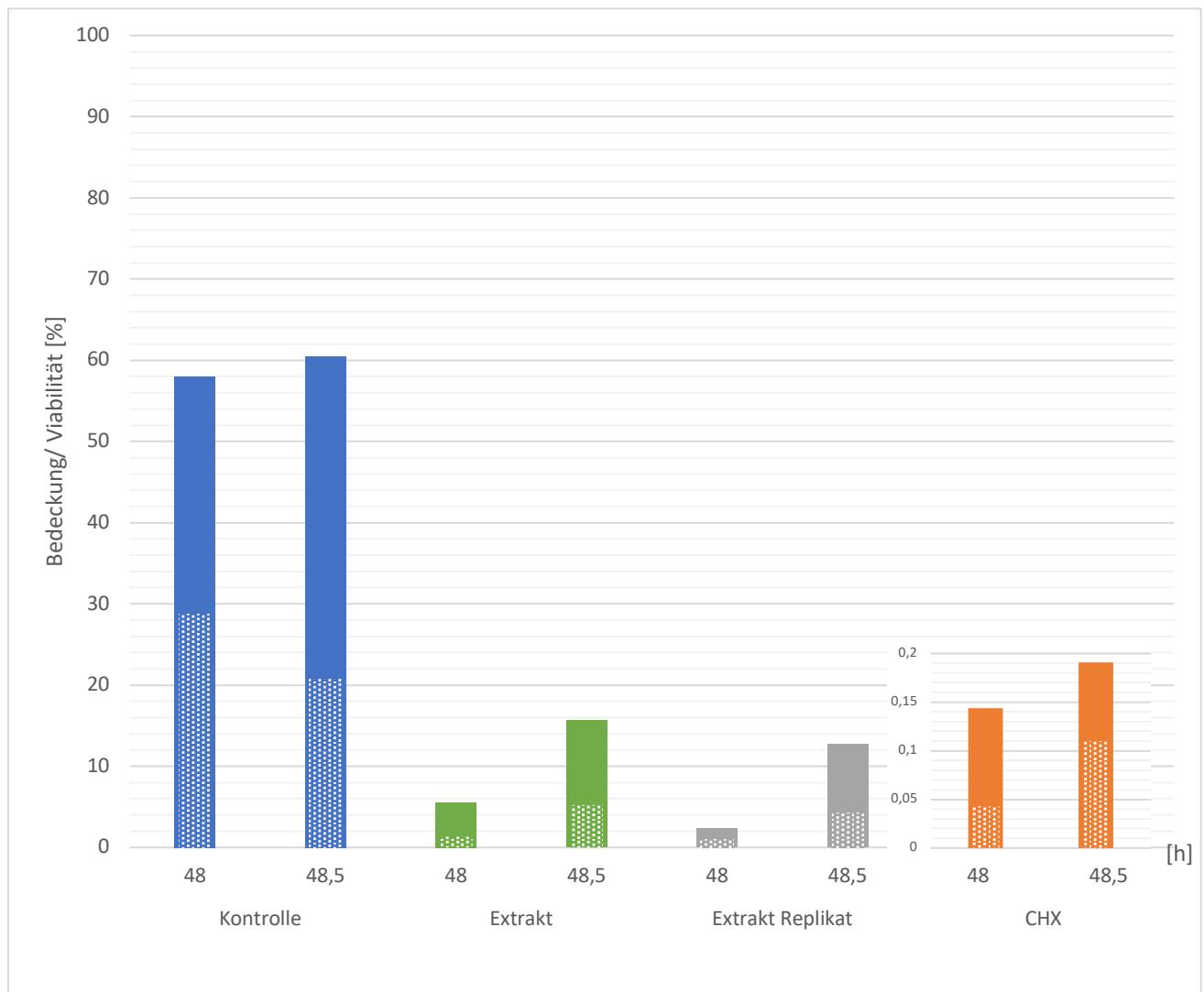


Abbildung 23: Die Biofilm-Bedeckung der Prüfkörperoberfläche und bakterielle Viabilität in [%] von Proband 5. Das Maß der Biofilm-Bedeckung der Prüfkörperoberfläche wird durch die aus gefüllte Fläche dargestellt. Die Viabilität wird durch die schraffierte Fläche prozentual zur Bedeckung angegeben. Die Höhe der Balken entspricht dem Mittelwert der 12 Aufnahmen. Nach 48 h (Spülprotokoll 1) und 48,5 h (Spülprotokoll 2) wurde die Wirkung des Walderdbeerblatt-Extrakts auf den oralen Biofilm untersucht.

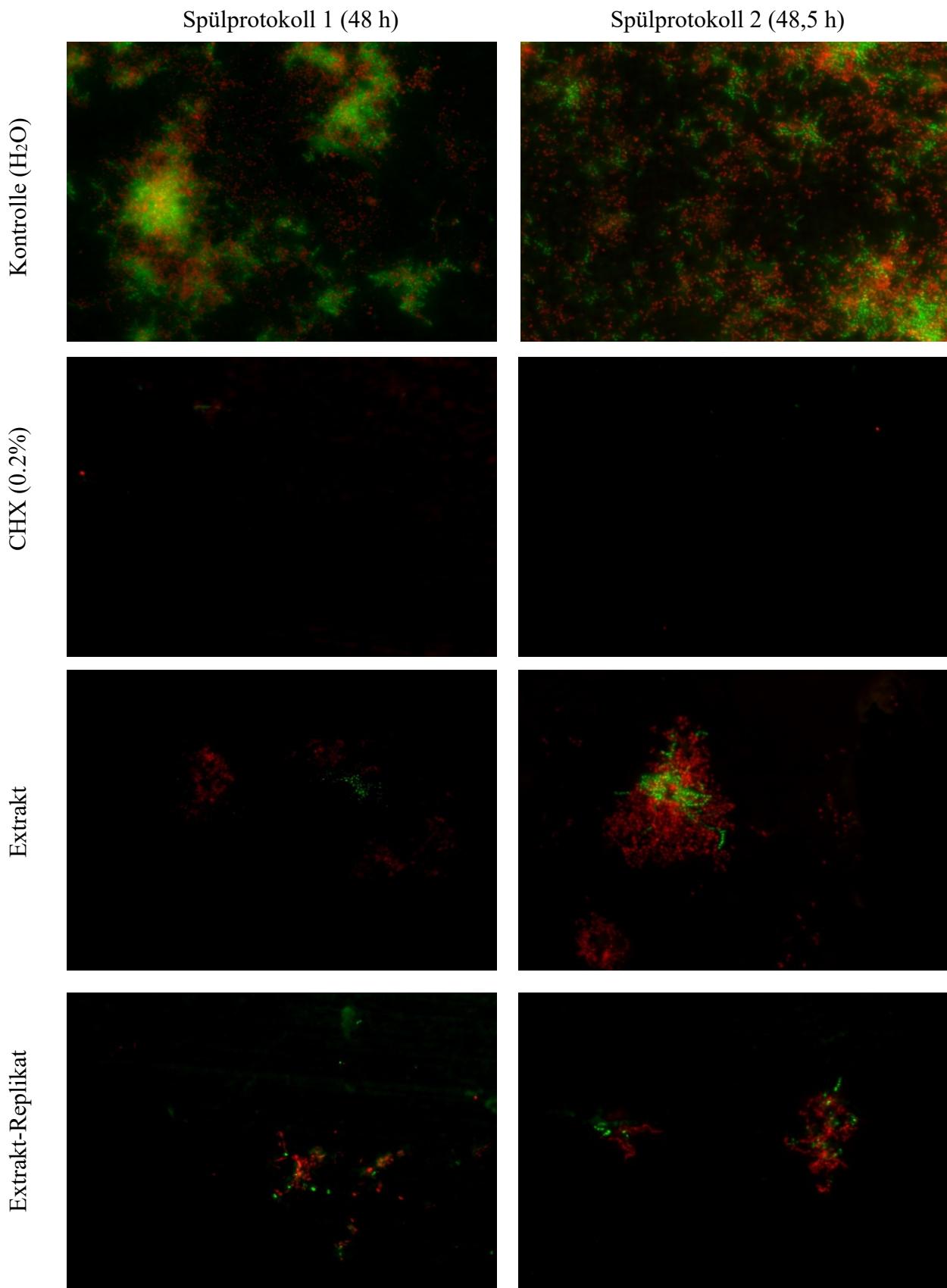


Abbildung 24: Repräsentative, fluoreszensmikroskopische LIVE/DEAD® BacLight™ Bilder von Proband 5. Nach 48 h sowie 48,5 h erfolgte die ex-vivo Untersuchung mit einem Fluoreszenzmikroskop. Hierzu wird der Biofilm mit LIVE/DEAD® BacLight™ gefärbt. Die lebenden Bakterien fluoreszieren grün und die toten Bakterien rot.

4.5.2 Rasterelektronenmikroskopie Proband 5

Die REM-Aufnahmen von Proband 5 zeigen in geringer Vergrößerung (1000x) beim Kontrollversuch einen teilweise von Biofilm bedeckten Prüfkörper (Abb. 25 a). In hoher Vergrößerung (20.000x) sieht man eine Biofilmstruktur sowie kokkoide Bakterien mit einer intakten Morphologie (Abb. 25 b).

Die Prüfkörper des CHX-Versuchs haben eine bakterienfreie Oberfläche und zeigen eine veränderte Biofilmmatrix und Pellicelstruktur (Abb. 25 c und d).

Die REM-Bilder des Replikat-Versuches zeigen in geringer Vergrößerung (1000x) im Spülprotokoll 1 (48 h) eine wenig bedeckte Oberfläche und vereinzelten Bakterien (Abb. 25 e). In hoher Vergrößerung (20.000x) sieht man im Spülprotokoll 1 vereinzelte kokkoide und stäbchenförmige Bakterien, die in der Biofilmmatrix eingebettet sind. Ihre Morphologie erscheint sowohl intakt als auch verändert (Abb. 25 f).

Im Spülprotokoll 2 (48,5 h) sieht man in geringer Vergrößerung ebenfalls eine vereinzelt mit Bakterien bedeckte Oberfläche (Abb. 25 g). Im Spülprotokoll 2 (48,5 h) ist der Prüfkörper bakterienfrei und die vorhandene Biofilmmatrix weist eine veränderte Struktur auf (Abb. 25 h).

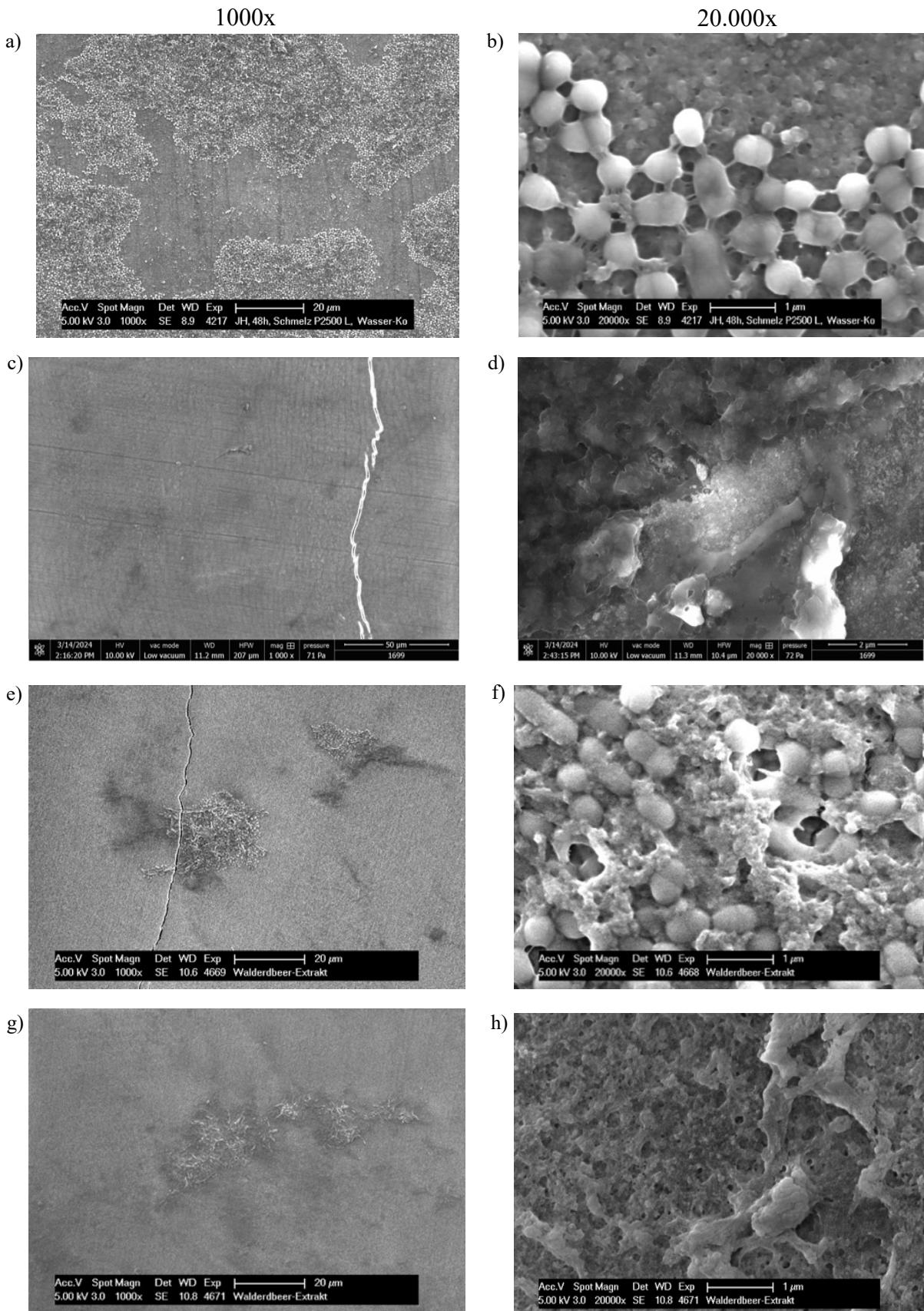
Kontrolle (H_2O) 48 h

Abbildung 25: REM-Aufnahmen der Prüfkörper in 1.000 und 20.000-facher Vergrößerung von Proband 5. 25 a und b zeigen die Negativkontrolle (Wasser), 25 c und d die Positivkontrolle (CHX 0.2 %), 25 e und f die Ergebnisse des Spülprotokolls 1 (48 h) und 25 g und h des Spülprotokolls 2 (48,5 h) des Walderdbeerblatt-Extrakts.

4.6 Zusammenfassung aller Probanden

Um den generellen Effekt der regelmäßigen Anwendung der Walderbeerblatt-Extrakt-Spülung auf den 48 h Biofilm bewerten zu können, wurde der Mittelwert und die Standardabweichung aus den individuellen Analysen gebildet und in Abb. 26 und 27 dargestellt. Beim Spülprotokoll 1 erfolgte die Entnahme nach 48 h und beim Spülprotokoll 2 nach 48,5 h.

Bedeckung des Prüfkörpers mit Biofilm:

Hierbei wiesen die Prüfkörper nach der Spülung mit Wasser (Negativkontrolle), nach 48 h eine Bedeckung von 35,93 % und nach 48,5 h von 39,28 % auf (Abb. 26).

Bei der Spülung mit dem Walderbeerblatt-Extrakt betrug die Bedeckung in der ersten Versuchsreihe 54,83 % (48 h) und 54,44 % (48,5 h) (Abb. 26).

In der zweiten Versuchsreihe (Extrakt Replikat) beträgt die Bedeckung 20,52 % (48h) und 24,36 % (48,5 h) (Abb. 26).

Bei der Spülung mit CHX als Positivkontrolle betrug die Bedeckung 0,11 % (48 h) und 0,08 % (48,5h) (Abb. 26).

Viabilität des Biofilms:

Die Viabilität nach der Spülung mit Wasser beträgt 60,85 % (48 h) und 59,47 % (48,5 h) (Abb. 27).

Die Viabilität nach der Spülung mit dem Walderbeerblatt-Extrakt beträgt in der ersten Versuchsreihe 48,28 % (48 h) und 26,31 % (48,5 h) (Abb. 27).

Die Viabilität in der zweiten Versuchreihe (Extrakt Replikat) beträgt 33,97 % (48 h) und 28,50 % (48,5 h) (Abb. 27).

Die Viabilität nach der Spülung mit CHX beträgt 50,83 % (48 h) und 49,60 % (48,5 h) (Abb. 27).

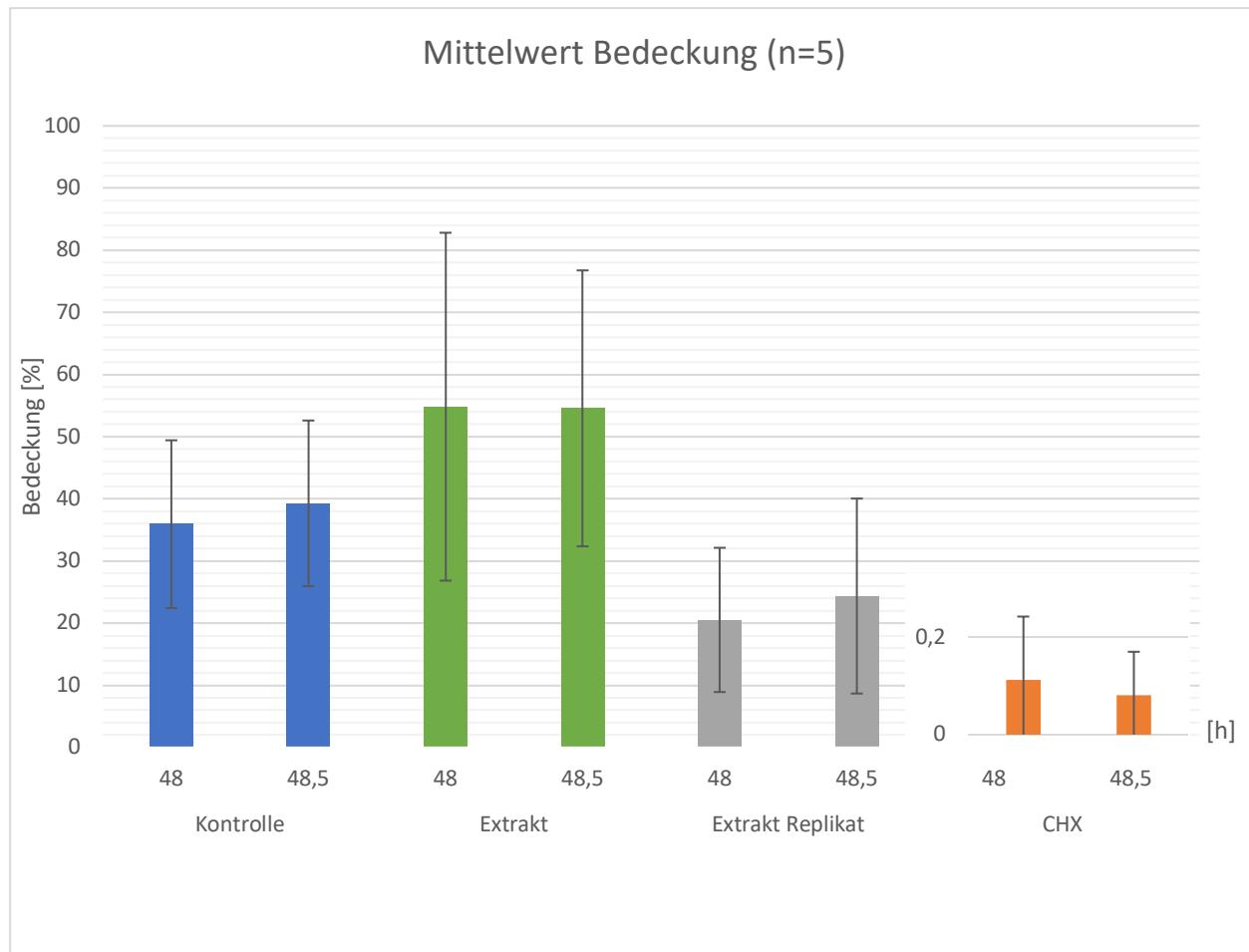


Abbildung 26: Die Biofilm-Bedeckung der Prüfkörperoberflächen [%] aller fünf Probanden im Mittelwert \pm Standardabweichung. Das Maß der Biofilm-Bedeckung der Prüfkörperoberfläche wird durch die ausgefüllte Fläche dargestellt. Die Höhe der Balken entspricht dem Mittelwert der fünf Probanden. Nach 48 h (Spülprotokoll 1) und 48,5 h (Spülprotokoll 2) wurde die Wirkung des Walderbeerblatt-Extrakts auf den oralen Biofilm untersucht.

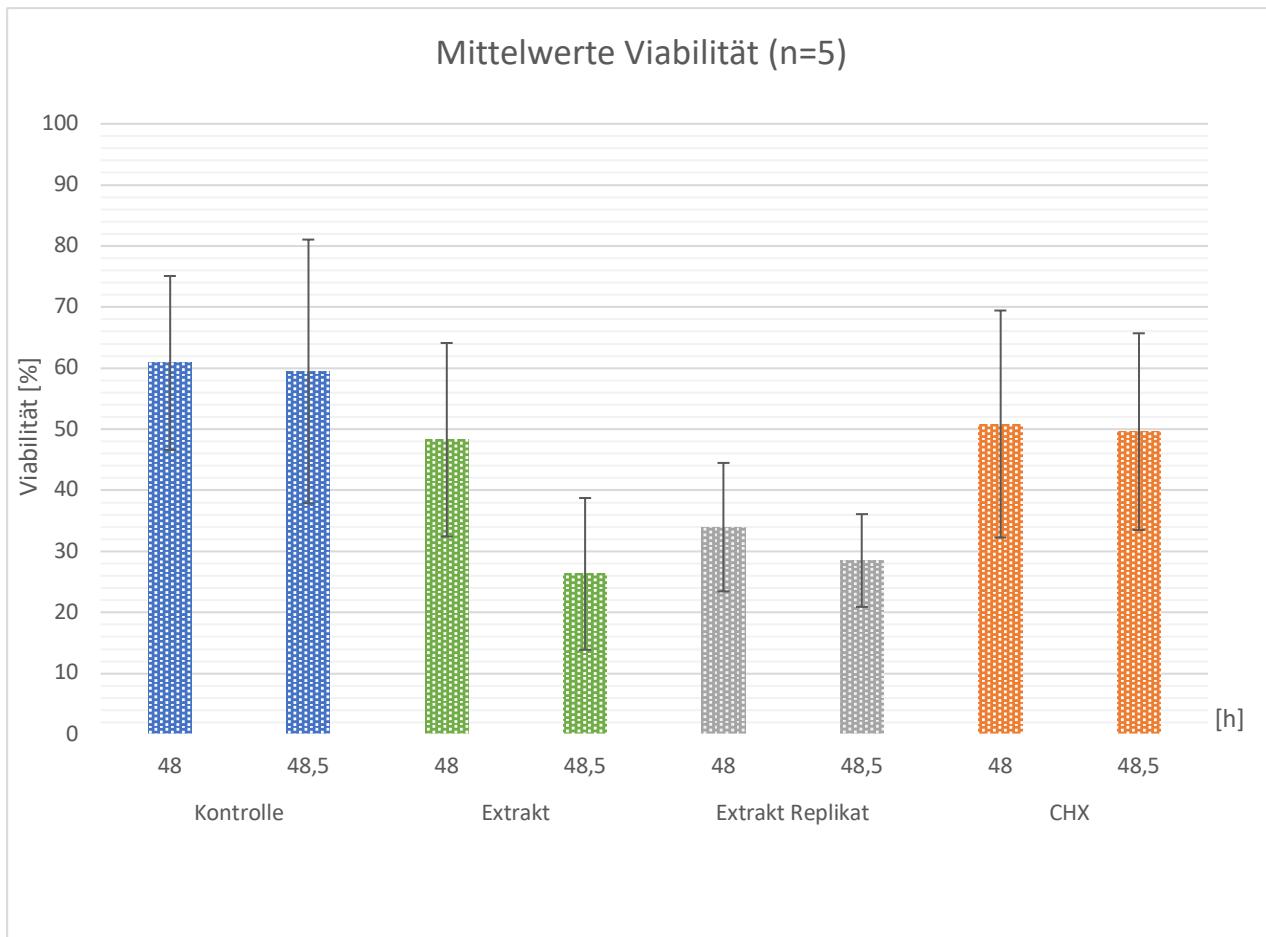


Abbildung 27: Die Biofilm-Viabilität der Prüfkörperoberflächen [%] aller fünf Probanden im Mittelwert \pm Standardabweichung. Das Maß der Biofilm-Viabilität der Prüfkörperoberfläche wird durch die schraffierte Fläche dargestellt. Die Höhe der Balken entspricht dem Mittelwert der fünf Probanden. Nach 48 h (Spülprotokoll 1) und 48,5 h (Spülprotokoll 2) wurde die Wirkung des Walderdbeerblatt-Extrakts auf den oralen Biofilm untersucht.

5 Diskussion

5.1 Diskussion von Material und Methode

5.1.1 Studiendesign

Für die Untersuchung oraler Biofilme existieren verschiedene Methoden, die jeweils spezifische Vorteile bieten. Insbesondere der Vergleich zwischen *in-situ*, *in-vivo* und *in-vitro* Modellen offenbart deutliche Unterschiede und Vorteile für die *in-situ* Methode.

In-situ Versuche des oralen Biofilms beziehen sich auf Untersuchungen, die direkt in der natürlichen Umgebung des Biofilms, also im Mund des Probanden, durchgeführt werden. Diese Methode erlaubt die Beobachtung des Biofilms unter realen Bedingungen, was eine außergewöhnlich hohe ökologische Validität gewährleistet. Hannig und Hannig stellten fest, dass *in-situ* Studien besonders nützlich sind, um die initialen Stadien der Biofilmbildung und die Dynamik des Biofilms zu untersuchen (C. Hannig & M. Hannig, 2009). Eine gängige Methode in der oralen Biofilmforschung ist das Tragen von Kunststoffschielen, an denen Prüfkörper montiert sind, auf denen sich der Biofilm bildet. Diese Prüfkörper, in dieser Arbeit die Schmelzprüfkörper, können dann entnommen und analysiert werden. Die Versuchsmodelle in der Mundhöhle mit herausnehmbarer Trageschiene stellen eine geeignete und kostengünstige Alternative zu *in-vivo* und *in-vitro* Versuchen dar. Wenn sich die Prüfkörper immer an der gleichen Stelle in der Mundhöhle befinden, ist eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gegeben (M. Hannig & Joiner, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Befestigung der Prüfkörper stets im vestibulären Bereich von Zahn 14/24-17/27 im Oberkiefer. Der wesentliche Vorteil der *in-situ* Methode besteht darin, dass die natürliche Umgebung des Biofilms einschließlich der komplexen Interaktionen mit dem Speichel, Scheerkräfte der Wangen und anderen oralen Mikroorganismen erhalten wird. Dies ermöglicht die Analyse von Veränderungen und Anpassungen des Biofilms unter realistischen Bedingungen. Ein wesentlicher Nachteil ist die Abhängigkeit von einer guten Compliance der Probanden (Hannig M. & Hannig C., 2009; Kolenbrander et al., 2006).

In-vivo Studien beziehen den gesamten Organismus in die Untersuchung mit ein. Dies umfasst oft tierexperimentelle Modelle, die es ermöglichen, systemische Effekte auf den oralen Biofilm zu beobachten. Hauptnachteil der *in-vivo* Untersuchungen ist die schlechte Reproduzierbarkeit (Bowen & Koo, 2011).

In-vitro Versuchsaufbauten hingegen nutzen isolierte Systeme, die unter kontrollierten Laborbedingungen untersucht werden. Hierbei werden Biofilmmodelle auf künstlichen Oberflächen kultiviert, was eine präzise Steuerung der experimentellen Parameter ermöglicht. Diese Versuchmodelle eignen sich im besonderen Maße für mechanistische Studien und die Untersuchung spezifischer Hypothesen (Guggenheim et al., 2009; Sissons, 1997). *In-vitro*-Studien sind erforderlich, um die

Effektivität spezifischer antimikrobieller Mittel zu beurteilen und wertvolle Erkenntnisse für nachfolgende *in-situ*-Studien zu gewinnen (Schönbächler et al., 2023). Die Durchführung von *in-vitro* Versuchen ist jedoch auch mit Nachteilen verbunden, insbesondere auch in Hinblick auf diese Arbeit. Zu nennen ist einerseits die schlechte anfängliche Adhäsion des Biofilms und zum anderen die geringere Anzahl an vorhandenen Bakterien im Vergleich zu *in-situ* Versuchen (Tawakoli et al., 2013).

5.1.2 Schmelzprüfkörper

In dieser Arbeit wurden 108 bovine Schmelzprüfkörper verwendet (ohne Vorversuche). Ein bedeutender Vorteil der Nutzung boviner Zähne für Versuche liegt in ihrer hohen Verfügbarkeit. Darüber hinaus sind bovine Zähne in der Regel kariesfrei und weisen eine homogene Struktur auf. Da die Rinder eine vergleichbare Ernährung hatten und im gleichen Alter geschlachtet wurden, bieten die Proben eine gute Vergleichbarkeit. Humane Präparate sind aufgrund von verschiedenen Ess- und Trinkgewohnheiten, der Fluoridzufuhr und dem unterschiedlichen Alter der Zähne nicht miteinander vergleichbar (Wegehaupt et al., 2008). Auch die Größe der Prüfkörper (ca. 5x6 mm) ist nur schwer mit humanen Präparaten zu erreichen. Die unteren Schneidezähne der Rinder hingegen bieten eine ausreichend große Oberfläche, um einheitliche und plane Schmelzprüfkörper herzustellen. Die plane Fläche ist vor allem relevant für die mikroskopische Auswertung. Teruel et al. (2015) untersuchten die chemische Zusammensetzung von Zähnen von Menschen, Rindern, Schweinen und Schafen und stellten hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung die meisten Gemeinsamkeiten, hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung zwischen bovinen und humanen Zähnen fest (Teruel et al., 2015). Dennoch lassen sich auch Unterschiede zwischen humanen und bovinen Zähnen feststellen. Die Anzahl der Dentintubuli und der Durchmesser kann bei bovinen Zähnen größer sein (Lopes et al., 2009). Ein weiterer Unterschied sind homogenere Kalziumverteilung sowie die größeren Schmelzkristalle im bovinen Schmelz (Yassen GH et al., 2011). Trotz dieser Unterschiede in den chemischen Bestandteilen und der Mikrostruktur von Rinderzähnen und menschlichen Zähnen ist die Biofilmbildung auf deren Oberflächen vergleichbar (Xi et al., 2020). In zahlreichen *in-situ* Studien wurden sowohl Dentin- als auch Schmelzprüfkörper als Ersatz für humane Präparate verwendet.

5.1.3 Probanden und Versuchsbedingungen

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden fünf Probanden untersucht. Die Anzahl der Probanden orientierte sich an ähnlich durchgeführten Studien (Martínez-Hernández et al., 2020; Schestakow & Hannig, 2020). Um sicherzustellen, dass bestimmte Erkrankungen und Medikamente, die die Speichelflussrate und -zusammensetzung und damit die Biofilmbildung beeinflussen könnten, keine Rolle spielen, wurden diese über eine Anamnese ausgeschlossen (Javaid et al., 2016). Es wurden nur Probanden mit kariesfreien Zähnen, unauffälligen Schleimhautbefunden und gesundem Parodontium zugelassen. Des Weiteren mussten die Probanden Nichtraucher sein und es durfte in den vergangenen sechs Monaten keine antibiotische Therapie stattgefunden haben. Alle fünf Probanden waren

Studierende der Zahnheilkunde, was eine hohe Compliance und die Wahrscheinlichkeit des Einhaltens der Versuchsbedingungen gewährleistet, allerdings nicht den Durchschnitt einer Gesellschaft widerspiegelt. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Nahrungsbestandteile zu vermeiden, wurden die Probanden angewiesen, die Schienen während des Essens zu entnehmen und während der Tragezeit ausschließlich Wasser zu trinken. Nach dem Essen musste eine Wartezeit von 30 Minuten eingehalten werden, bevor die Schienen wieder eingegliedert wurden. Die postprandiale pH-Wert Senkung in der Mundhöhle könnte zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen (Bowen, 2013). Die Verwendung von Zahnpasta oder weiterer als den vorgesehenen Mundspülösungen war untersagt. Die Schienen wurden ab 8 Uhr morgens jeweils für 48,5 Stunden getragen, um den zirkadianen Rhythmus und die unterschiedliche Speichelfließraten zu vereinheitlichen (M. Hannig & Joiner, 2006). Alle Probanden führten die Spülung für eine Minute mit allen drei Spülösungen durch. Die Spülung erfolgte nach drei Minuten und nach 12, 24, 36 und 48 Stunden. Die „Wash-out“ Phase nach dem Versuch mit CHX und dem Walderbeeblatt-Extrakt betrug mindestens 7 Tage, um Wechselwirkungen, insbesondere bei CHX auszuschließen (Rolla et al., 1975).

5.1.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie (FM) umfasst eine Vielzahl an Techniken, die in der biologischen und medizinischen Forschung Anwendung finden. Ein Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie, das in der Forschung des oralen Biofilms weit verbreitet ist, ist das BacLight™-Verfahren. Dieses Verfahren verwendet das BacLight Bacterial Viability Kit, um die Lebensfähigkeit von Bakterien zu bestimmen. Das BacLight Verfahren verwendet zwei Fluorophore, nämlich SYTO 9™ und Propidiumiodid (PI). SYTO 9 dringt in alle Bakterienzellen ein und färbt sie grün, während PI nur in Zellen mit beschädigten Membranen eindringt und sie rot färbt. Dadurch ist eine Unterscheidung von lebenden (grüne) und toten (rote) Bakterien möglich (C. Hannig et al., 2010; Lichtman & Conchello, 2005). Um die antimikrobielle Wirksamkeit einer Substanz zu untersuchen, ist es von großem Interesse, mithilfe der Live/Dead-Färbung zu überprüfen, ob die haftenden Bakterien lebend oder tot sind. Das BacLight™ Verfahren, gefolgt von einer fluoreszenzmikroskopischen Auswertung, wurde in früheren Studien aufgrund seiner hohen Zuverlässigkeit, der einfachen Vorbereitungsschritte, der geringen Hintergrundtransluzens und der schnellen Durchführung verwendet (C. Hannig, Gaeding, et al., 2013). Allerdings gibt es auch Nachteile der Fluoreszenzmikroskopie. Der Anteil der roten Fluoreszenz nimmt mit zunehmender Belichtungszeit unter dem Mikroskop zu. Dadurch könnte der Anteil avitaler Zellen fälschlicherweise als zu hoch dargestellt werden. Des Weiteren können Zellen kurz nach der Färbung mit den Farbstoffen ihre Lebensfähigkeit verlieren. Dies wurde durch TEM-Analysen bestätigt, die eine Lyse und Zerstörung der adhärenten Zellen gezeigt haben. Die Folge der genannten Nachteile ist eine obligat zügige Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie (Netuschil et al., 2014; Tawakoli et al., 2013).

5.1.5 Quantifizierung des Biofilms

Für die Bestimmung der Biofilmbedeckung der Fluoreszenzmikroskopiebilder wurde die Software "Image J" verwendet. Diese Software ist eine öffentlich zugängliche Bildverarbeitungssoftware auf Java-Basis, die vom National Institutes of Health (NIH), USA, entwickelt wurde. ImageJ ist plattformunabhängig, da es in Java programmiert ist und somit auf verschiedenen Betriebssystemen wie Windows, Mac OS und Linux verwendet werden kann. Ein konkretes Beispiel für die Anwendung von ImageJ ist die Berechnung der Oberflächenbedeckung, eine Methode, die häufig in biologischen Studien verwendet wird, um den prozentualen Anteil der Fläche eines Bildes zu bestimmen, der von einer bestimmten Struktur oder Substanz bedeckt ist. Der Prozess beginnt mit dem Importieren des Bildes und dessen Umwandlung in ein Graustufenbild. Anschließend wird ein Schwellenwert festgelegt, um die interessierende Struktur von anderen Bildbestandteilen zu trennen. Durch die Anwendung eines binären Schwellenwertes werden die interessierenden Bereiche weiß und der Hintergrund schwarz dargestellt. Danach zählt ImageJ die Anzahl der weißen Pixel und teilt diese durch die Gesamtzahl der Pixel im Bild, um den prozentualen Anteil der Oberflächenbedeckung zu berechnen. Diese Schritte können sowohl manuell als auch automatisiert durchgeführt werden. In dieser Studie erfolgte die Auswertung manuell, dies kann individuelle Unterschiede bei der Auswertung hervorufen. Die Benutzung von ImageJ als Bildverarbeitungssoftware gilt als etabliert (Rueden et al., 2017; Schindelin et al., 2012; Schneider et al., 2012). Allerdings gibt es auch Nachteile, gerade bei der Bestimmung der Viabilität eines Biofilms. Ein zentrales Problem stellt die Abhängigkeit von der Färbeintensität dar, die durch technische Faktoren wie Belichtungszeit, Kamerasensitivität oder Unebenheiten der Prüfkörperoberfläche beeinflusst werden kann. Dies kann zu einer Über- oder Unterschätzung der Viabilität führen (Netuschil et al., 2014). Die Quantifizierung der Viabilität erfolgte aus diesem Grund mit der Software MatLab und der sich darin befindenden App „Viability“. Im Vergleich zur Auswertung mit ImageJ bietet die verwendete Software den Vorteil, dass sie unabhängig von der Intensität der Fluoreszenzfärbung arbeitet und somit eine objektivere Beurteilung der Viabilität ermöglicht.

5.1.6 Rasterelektronenmikroskopie

Obwohl die Fluoreszenzmikroskopie die Visualisierung von Bakterien ermöglicht, sind Techniken mit höherer Auflösung erforderlich, um detaillierte Einblicke in die Ultrastruktur der Mikroorganismen und die umgebende Matrix zu gewinnen. Innerhalb der Fluoreszenzmikroskopie ist eine morphologische Unterscheidung nur zwischen Kokken und Stäbchen möglich, wobei eine präzise Klassifizierung der Bakterienspezies nicht möglich ist. Ein weiterer Parameter, der durch Fluoreszenzmikroskopie nicht erfasst werden kann, ist die Unterscheidung zwischen tieferen und oberflächlichen Bakterienschichten (Kolenbrander et al., 2006; Wolff et al., 2014). Eine Fähigkeit des REM ist es, die Oberflächenmorphologie und Zusammensetzung der Biofilmmatrix im dreidimensionalen Raum zu analysieren. Dies ist deswegen besonders wichtig, da die physikalischen Eigenschaften der Biofilmmatrix und die Verteilung der Mikroben maßgeblichen Einfluss auf die Pathogenese von

Zahnkrankheiten wie Karies und Parodontitis haben (Marsh, 2006). Die Probenvorbereitung für die REM-Untersuchung von dem oralen Biofilm umfasst in der Regel die Fixierung und Dehydrierung der Proben, um sie für die Hochvakuum-Bedingungen des REM geeignet zu machen. Daraus resultieren jedoch auch verschiedene Nachteile. Zum einen ist das Verfahren sehr zeitintensiv und bedarf spezieller Kenntnisse und Erfahrung in der Analyse der Prüfkörper, zum anderen können die Vakuumbedingungen und der Elektronenstrahl die Struktur der Proben verändern oder beschädigen, was zu Artefakten in den Bildern führen kann (Neu & Lawrence, 2015) (s. Abb. 15 e).

5.1.7 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist eine gängige Methode zur Bewertung des ultrastrukturellen Musters und des morphologischen Aussehens des oralen Biofilms. Diese Technik ist besonders nützlich, um ultrastrukturelle Veränderungen im Biofilm zu untersuchen. Die TEM ermöglicht in Mikro- und Nanoebene eine detaillierte Visualisierung der Biofilmstruktur und der bakteriellen Morphologie, was Einblicke in die Wirkmechanismen von Mundspülösungen gibt (M. Hannig & Joiner, 2006). Zudem lässt sich die Biofilmdicke unter Kontroll- und Behandlungsbedingungen genau messen. Hauptnachteil ist die zeitintensive und teure Vorbereitung der Proben sowie der kleine Ausschnitt, welcher nicht den ganzen Biofilm der Prüfkörperoberfläche widerspiegeln kann (Winey et al., 2014).

5.2 Diskussion Ergebnisse

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Wirkung des Walderdbeerblatt-Extrakt auf die Biofilmbildung und Viabilität im Vergleich zu Wasser (Negativkontrolle) und Chlorhexidin (CHX, Positivkontrolle) analysiert. Hierbei wurden die Proben von fünf Probanden mittels Fluoreszenzmikroskopie (FM LIVE/DEAD® BacLight™) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht.

5.2.1 Spülung mit Wasser

Die Spülung mit Wasser war die Negativkontrolle. Es ist keine spezifische Wechselwirkung zu erwarten gewesen. Die Negativkontrolle, mit der die experimentellen Proben verglichen wurden, dient somit als Referenz, um sicherzustellen, dass nur die getesteten Mundspülösungen eine Wirkung zeigen. In anderen *in-situ* Studien erfolgte die Kontrolle ebenfalls mit Wasser (Martínez-Hernández et al., 2020; Schestakow & Hannig, 2020). Die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede hinsichtlich der Bedeckung und Viabilität des Biofilms stehen im Einklang mit den Ergebnissen früherer Studien und lassen sich unter anderem durch variierende Speichelflussraten erklären, die einen Einfluss auf die Biofilmbildung ausüben (Kristensen et al., 2021).

5.2.2 Spülung mit Chlorhexidin

In der durchgeführten Versuchreihe wurde die Wirkung von Chlorhexidin (CHX) auf die Bedeckung der Prüfkörper und die Viabilität des Biofilms untersucht. Die Ergebnisse zeigten nach 48 Stunden eine Bedeckung von lediglich 0,11 % und nach 48,5 Stunden eine Bedeckung von 0,08 %. Diese geringen Bedeckungsraten sind konsistent mit der Annahme, dass CHX als Goldstandard zur Reduktion von Biofilmen fungiert und deuten ebenfalls darauf hin, dass CHX in der Lage ist, die Ansiedlung von Mikroorganismen signifikant zu hemmen. In der Studie von Löe und Rindom Schiøtt (1970) wurde gezeigt, dass CHX eine signifikante Reduktion der Plaquebedeckung bewirken kann. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen in Analogie zu den hier gemessenen Ergebnissen ebenfalls eine deutliche Verringerung der Plaque-Bedeckung bei der Verwendung von 0,2%iger CHX-Mundspüllösung (Löe & Rindom Schiøtt, 1970). Bei Poppolo Deus und Ouanounou wird die Wirksamkeit von CHX bei der Reduktion der Plaquebedeckung ebenfalls bestätigt. Diese Studie hebt insbesondere hervor, dass CHX eine langfristige Kontrolle der Plaquebedeckung ermöglicht, was sich in den niedrigen Bedeckungswerten dieser Studie widerspiegelt (Poppolo Deus & Ouanounou, 2022).

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Studie zeigen zwar eine vergleichweise hohe Viabilität von etwa 50 %, was aber in Relation zu den niedrigen Werten der Bedeckung betrachtet werden muss. Zwischen beiden Spülprotokollen (48 h und 48,5 h) ist kein größerer Unterschied zu erkennen. Spülprotokoll 1 bestätigt, durch die letzte Spülung 12 Stunden vor der Entnahme, die Verfügbarkeit (Substantivität) von CHX in der Mundhöhle von 12- 24 Stunden (Reda et al., 2020; Rolla et al., 1975). Der antibakterielle Effekt von CHX konnte in der hier vorliegenden Studie mittels Rasterelektronenmikroskopie bestätigt werden, der auf die Bindung von Chlorhexidin an Proteine in die Pellicel zurückzuführen ist (s. Abb. 9, 12, 15, 18, 25 jeweils c und d). Auch in dieser Studie hatten die Versuche mit CHX die stärksten antiadhärenten und antibakteriellen Effekte, was erneut die Bedeutung von CHX als Goldstandard hervorhebt (Jones, 1997).

5.2.3 Spülung mit dem Walderdbeerblatt-Extrakt

Bei der Spülung mit Walderdbeerblatt-Extrakt zeigte sich insbesondere in der ersten Versuchsreihe eine ausgeprägtere Variabilität zwischen den Probanden hinsichtlich der Wirkung des Extraks auf die Biofilmbedeckung des Prüfkörpers und die Viabilität des Biofilms, als in der zweiten Versuchsreihe.

Bedeckung:

In der ersten Versuchsreihe zeigte sich bei den Probanden 1 bis 4 im Spülprotokoll 1 (48 h) eine Zunahme der Biofilmbedeckung. Auch im Spülprotokoll 2 (48,5 h) nahm die Bedeckung der Prüfkörperoberfläche mit Biofilm zu. In der zweiten Versuchsreihe zeigten die Ergebnisse einen antiadhäsiven Effekt sowohl im Spülprotokoll 1 (48 h) als auch im Spülprotokoll 2 (48,5 h) bei 4 von 5 Probanden. Somit ist in der zweiten Versuchsreihe im Vergleich zur ersten Versuchsreihe eine deutlich antiadhäsivere Wirkung des Extraks zu erkennen.

Ein Hauptbestandteil der Walderdbeerblätter sind die Polyphenole. Polyphenole, zu denen unter anderem die Flavonoide mit der Untergruppe der Catechine gehören, sind bekannt für ihre antiadhärenten und antimikrobiellen Eigenschaften (Hashim et al., 2024). Die antiadhäsive und antimikrobielle Wirkung von polyphenolhaltigen Mundspülungen ist schon länger Gegenstand aktueller Studien. Ein Ansatz, die antiadhäsive Wirkung von Polyphenolen zu verstehen, ist die Pellikelbildung, die die Grundlage des oralen Biofilms bildet (C. Hannig & Hannig, 2009). In der Literatur findet man Studien, die eine Zunahme des initialen Biofilms (Pellikel) auf dem Zahnschmelz nach der Spülung mit polyphenolhaltigen Mundspülösungen zeigen. In einem 8 h *in-situ* Versuch mit dem Walderdbeerblatt-Extrakt konnte eine Zunahme der Pellikeldicke beobachtet werden (Kirsch et al., 2020). Rehage et al beschrieben, in einem *in-vitro/in-situ* Versuch, dass nach der Spülung mit Epigallocatechingallat (EGCG), Gerbsäure und Johannisbeersamenextrakt, eine dickere und elektronendichtere Pellikel im Vergleich zur Kontrollgruppe vorlag (Rehage et al., 2017). Auch Weber et al beschrieben in ihrem *in-situ* Versuch eine Zunahme der Pellikelschicht mit wässrigen Extrakten aus *Origanum*-und *Ribes nigrum* -Blättern (Weber et al., 2015). Die Spülung mit einem Hopfenextrakt zeigte ebenfalls die Zunahme der Pellikel, allerdings auf dem Dentin (Schestakow A et al., 2024). Diese vier Studien konnten die Bedeutung einer verdickten Pellikel im Hinblick auf die antiadhäsive Wirkung von Polyphenolen zeigen.

Eine Ursache für die Zunahme der Pellikel ist unter anderem die Interaktion von Polyphenolen mit Speichelproteinen. Die Bildung der Pellikel erfolgt, wie in der Einleitung erwähnt, unter anderem durch die Adsorption von Speichelproteinen an der Zahnhartsubstanz. Die nun stattfindende Aggregation der Speichelproteine mit den Polyphenolen kann zum Niederschlag unlöslicher Protein-Polyphenol-Aggregate und damit zur Zunahme der Pellikeldicke führen (Kirsch et al., 2020). Die Protein-Polyphenol-Aggregate sind in den REM-Aufnahmen gut zu erkennen (s. Abb. 9 h und 12 h). Die Bindung von Polyphenolen an Proteine ist ein mehrstufiger Prozess, der von einer schnellen, reversiblen Bindung über Umlagerungen und Konformationsänderungen bis hin zur möglichen Aggregation und Präzipitation der Komplexe auf der Zahnhartsubstanz reicht. Jede dieser Phasen hat unterschiedliche Auswirkungen auf die physikalischen und biologischen Eigenschaften der beteiligten Moleküle (Baxter et al., 1997; Charlton et al., 2002). Die dadurch veränderte Pellikelschicht könnte demnach beschädigte oder verdeckte funktionelle Gruppen von Rezeptorproteinen enthalten. Dies kann zu einer gestörten Interaktion zwischen den initialen Kolonisierern und der Pellikel führen und somit die Bildung des Biofilms hemmen (Hertel et al., 2017).

In anderen Studien konnte ebenso eine antiadhäsive Wirkung von polyphenolhaltigen Mundspülungen festgestellt werden. So zeigten sich bei der Spülung mit Gerbsäure oder Epigallocatechin-Gallat eine starke antiadhäsive Wirkung. Beide Substanzen wurden aus Vollpflanzenextrakten industriell hergestellt und isoliert (C. Hannig, Kirsch, et al., 2013). Im Vergleich zu den Reinsubstanzen gehört das Walderdbeerblatt-Extrakt zur einem Vollpflanzenextrakt. Ellagitannine und Proanthocyanidin sind Polyphenole, die in den Blättern der Walderdbeere vorkommen (Kirsch et al., 2020). Ellagitannine

gehören zur Gruppe von hydrolysierbaren Tanninen. Proanthocyanidine gehören zu den kondensierbaren Tanninen. Tannine sind bekannt für ihre starken antimikrobiellen, antiadhäsiven und antioxidativen Eigenschaften (Quideau et al., 2011). Die in dieser Arbeit gezeigte Antiadhäsionsaktivität des Walderdbeerblatt-Extrakts kann auf die Wirkung der Tannine zurückzuführen sein. Tannine sind in der Lage die funktionellen Gruppen von Rezeptorproteinen wie z.B. prolinreichen Proteinen und Histatin zu denaturieren. Diese so veränderten Proteine können mit Polyphenolen interagieren und dabei Komplexe bilden, ähnlich dem Speichel-Polyphenol-Aggregat. Ein weiterer Grund für die Antiadhäsion könnte darin liegen, dass Tannine die Glucosyltransferase und Amylase hemmen, wodurch die Glucanbildung reduziert wird. Eine reduzierte Glucanbildung sorgt für eine deutliche Beeinflussung der dreidimensionalen Struktur des Biofilms. Dies kann die Anzahl der Bindungsstellen für die spezifische Anhaftung von Bakterien an der Zahnoberfläche verringern (C. Hannig et al., 2007; Xi et al., 2020). Glucane dienen u.a. für die oralen Streptokokken wie z.B. dem *S. mutans* als Adhäsionsstelle (Bowen & Koo, 2011). Sind diese Bindungsstellen gehemmt kann man durch das Walderdbeerblatt-Extrakt von einem antikariogenen Effekt ausgehen. Die antiadhäsive Wirkung von Tanninen auf den Zahnschmelz konnte auch in anderen *in-situ* Studien nachgewiesen werden (Hertel et al., 2017; Schestakow & Hannig, 2020). In beiden Studien erfolgte die Untersuchung mit einer isolierten 5% Tannin Säure. Der pH-Wert der Tanninsäure lag bei 2,5. Der pH-Wert und die Ionenstärke beeinflussen die Wechselwirkungen zwischen Phenolen und Proteinen, indem sie die Bildung hydrophober Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken beeinflussen. Der pH-Wert ist dabei besonders wichtig: Ein niedriger pH-Wert kann die Bildung von Aggregaten zwischen Phenolen und Proteinen begünstigen. Dies geschieht, weil der pH-Wert das ionische Verhalten sowohl der Phenole als auch der Proteine verändert, was zu unterschiedlichen Aggregationsmustern führen kann (Kawamoto & Nakatsubo, 1997; Kirsch et al., 2020; Schestakow & Hannig, 2020). Auszüge aus Teedrogen wie das Walderdbeerblatt-Extrakt sind mit einem pH-Wert von 5,23 basischer als die Tannin-Säure. Dies würde die schwächeren antiadhäsiven Effekte im Vergleich zu den genannten Studien erklären. Ein Vorteil des Vollextrakts gegenüber den isolierten Polyphenolen ist die leichtere und kostengünstigere Zugänglichkeit (C. Hannig, Kirsch, et al., 2013).

Es zeigten sich in dieser Studie individuelle Unterschiede in der Biofilmbildung der Probanden, die unter anderem durch den zeitlichen Abstand von 12 Monaten zwischen der ersten und zweiten Versuchsreihe sowie durch eine mögliche chemische Veränderung der Polyphenol-Inhaltsstoffe der Walderdbeerblätter bedingt sein könnten. Polyphenole können durch Polymerisation oder Reaktionen mit anderen Molekülen während der Lagerung neue Verbindungen bilden, die möglicherweise stärkere biologische Effekte haben (Efenberger-Szmechtyk et al., 2021). Ein klassisches Beispiel ist die Reifung von Wein. In einer Untersuchung wurde festgestellt, dass im Rotwein während der Lagerung Anthocyane und andere komplexe Verbindungen zusammen mit den Proanthocyanidinen (Bestandteil der Walderdbeere) zur vermehrten Bildung von Tanninen führen (Zafrilla et al., 2003). Die antiadhäsiven und antibakteriellen Wirkungen der Tannine wurden im letzten Abschnitt ausführlich

beschrieben. Dagegen spricht allerdings auch der Fakt, dass es sich bei Wein um ein flüssiges Lebensmittel handelt, das lange gelagert wird. Bei der hier vorliegenden Untersuchung wurde jedoch die Blätter über 12 Monate lichtgeschützt bei 20°C Raumtemperatur als Droge gelagert, das daraus hergestellte Walderbeerblatt-Extrakt wurde maximal sieben Tage aufbewahrt. Eine pH-Wert Veränderung wurde in dieser Zeit nicht festgestellt. Friedman et al. untersuchten den Polyphenolgehalt in Blättern von grünem Tee über einen Zeitraum von 6 Monaten. Die grünen Teeblätter wurden, wie die Blätter der Walderdbeere, bei 20°C Raumtemperatur und lichtgeschützt aufbewahrt. Der Gehalt an Catechinen sank in diesem Zeitraum um 32 % (Friedman et al., 2009). Begleitende chromatographische Untersuchungen der getrockneten Blätter der Walderdbeere wurden nicht durchgeführt und wären zukünftig sinnvoll.

Ein weiterer Aspekt, der die individuellen Unterschiede dieser Studie bei der Bedeckung erklären könnte, sind die unterschiedlichen Positionen der Prüfkörper auf der Schiene. Die distalen (63,15 %) und mesialen (53,04 %) Prüfkörper waren mit mehr Biofilm bedeckt als die mittleren Prüfkörper mit 25,55 % (Karygianni et al., 2012). Außerdem zeigte sich bei allen Probanden ein Unterschied zwischen der linken und rechten Seite. Grund hierfür kann z.B. die unterschiedliche Speichelbenetzung durch eine Seitenschlafposition sein. Ein weiterer Grund für die Zunahme der Bedeckung im Zeitverlauf könnte der pH-Wert des Walderbeerblatt-Extrakts sein. Der pH-Wert des Extraks von 5,23 liegt im sauren Bereich. Dadurch kann es zu Demineralisationsprozessen auf dem Zahnschmelz kommen. Die Folge ist eine rauere Oberfläche, was die Biofilmbildung begünstigt (Quirynen & Bollen, 1995). Demineralisationsvorgänge des Zahnschmelzes konnten auch bei der Spülung mit Hammamelis (pH: 4,3) beobachtet werden (Kirsch et al., 2020). Dagegen spricht allerdings, dass die erste Spülung nach 3 Minuten erfolgte, das heißt, dass eine Pelikelschicht bereits vorhanden war, die die Zahnhartsubstanz schützt (M. Hannig & Joiner, 2006). Insgesamt muss bei einem *in-situ* Versuch mit Biofilmen von individuellen Schwankungen ausgegangen werden, da die Biofilmentstehung ein dynamisches System ist und von der Speichelfließrate oder der Ernährung abhängt (M. Hannig & Joiner, 2006).

Viabilität:

Die Ergebnisse der Viabilität des Biofilms in der ersten Versuchsreihe zeigten im Spülprotokoll 1 (48 h) bei den Probanden individuelle Unterschiede. Bei Proband 1, 3 und 5 sank die Viabilität, während sie bei Proband 2 und 4, im Vergleich zur Wasserkontrolle anstieg. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass bei Proband 2 und 4 die Bedeckung in der Negativkontrolle (Wasser) bereits < 30 % lag. Im Spülprotokoll 2 (48,5 h) war die Viabilität bei allen fünf Probanden niedriger als in der Negativkontrolle (Wasser).

In der zweiten Versuchreihe, 12 Monate nach der ersten Versuchsreihe, bestätigten sich die Ergebnisse hinsichtlich der Viabilität. Das Spülprotokoll 1 (48 h) zeigte sogar noch eindeutiger eine langfristige antibakterielle Wirkung, sodass die Viabilität bei allen Probanden im Vergleich zur Wasserkontrolle

sank. Auch die antibakterielle Wirkung im Spülprotokoll 2 (48,5 h) konnte auf den vorhandenen Biofilm bestätigt werden. Das Walderdbeerblatt-Extrakt wirkt somit antibakteriell auf den vorhandenen Biofilm.

Polyphenole beeinflussen die Viabilität von Bakterien und dem oralen Biofilm auf verschiedene Weise. Zunächst stören sie die bakterielle Zellmembran. Durch die Einlagerung in die Lipid-Doppelschicht der Bakterienmembranen verursachen Polyphenole strukturelle Veränderungen, die zu einer erhöhten Permeabilität und letztendlich zur Zellyse führen können. Diese Membranschädigung beeinträchtigt die Integrität der bakteriellen Zellen und führt zu ihrem Absterben (Charlton et al., 2002). Die strukturelle Veränderung der Membran der Bakterien ist am lytischen Verhalten der Bakterien in der TEM-Aufnahme zu erkennen (s. Abb. 21 a und b; Abb. 22 a). Darüber hinaus können Polyphenole die Quorum-Sensing-Mechanismen der Bakterien beeinflussen. Quorum Sensing ist ein Kommunikationssystem, das Bakterien verwenden, um ihre Genexpression in Abhängigkeit von der Zellzahl dichte zu koordinieren. Durch die Hemmung dieser Signalmoleküle stören Polyphenole die Fähigkeit der Bakterien, Biofilme zu bilden und zu erhalten. Dies führt zu einer verminderten Produktion von extrazellulären, polymeren Substanzen (EPS), die für die Struktur und Stabilität des Biofilms essenziell sind (Daglia et al., 2007). Ein weiterer Mechanismus, durch den Polyphenole die Viabilität des oralen Biofilms reduzieren, ist ihre antioxidative Wirkung. Oxidativer Stress kann die DNA, Proteine und Lipide der Bakterien schädigen, was zu Zellschäden und damit zum Zelltod führt (Bae et al., 2020; Efenberger-Szmechtyk et al., 2021). Die REM-Bilder der Probanden zeigen eine veränderte Morphologie des Biofilms und der vorhandenen Bakterien nach der Spülung mit dem Walderdbeerblatt-Extrakt. In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigte sich der antibakterielle Effekt insbesondere in der zweiten Versuchsreihe im Vergleich zur ersten Versuchsreihe und zur Wasserkontrolle. Allerdings war dieser Effekt weniger ausgeprägt als bei der Anwendung der CHX-Spülung.

5.3 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse zeigen, dass CHX eine konstante antiadhäsive Wirkung aufweist und weiterhin als Goldstandard für die orale Biofilmkontrolle gilt, obwohl es mit den bekannten Nebenwirkungen verbunden ist. Im Gegensatz dazu zeigte der Walderdbeerblatt-Extrakt prinzipiell Potenzial zur Reduktion von Biofilmen, jedoch variierte seine Wirksamkeit stark. Der antibakterielle Effekt des Extraks konnte bei allen Probanden nachgewiesen werden und zeigte sich besonders deutlich durch die Reduktion der Viabilität des vorhandenen Biofilms. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Bedingungen zu optimieren, unter denen der Walderdbeerblatt-Extrakt eine zuverlässige antiadhäsive Wirkung entfalten kann. Erstmals konnte ein antimikrobieller Effekt des Extraks im 48 h Versuch gezeigt werden, was ihn als vielversprechende Mundspüllösung erscheinen lässt, die zukünftig möglicherweise als Alternative zu CHX fungieren könnte.

6 Literaturverzeichnis

- Abdulkarim, R., Al-subhi, A., Bukhari, R., Alkhattabi, N., Mira, R., Felemban, O., Elbadawi, L., Almazrooa, S., & Mawardi, H. (2019). Tolerability of a green tea-based mouth rinse: A pilot study. *Saudi Dental Journal*, 31, 457–462. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2019.04.004>
- Antonio, A. G., Iorio, N. L. P., Pierro, V. S. S., Candreva, M. S., Farah, A., Dos Santos, K. R. N., & Maia, L. C. (2011). Inhibitory properties of *Coffea canephora* extract against oral bacteria and its effect on demineralisation of deciduous teeth. *Archives of Oral Biology*, 56, 556–564. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.12.001>
- Bae, J., Kim, N., Shin, Y., Kim, S.-Y., & Kim, Y.-J. (2020). Activity of catechins and their applications. *Biomedical Dermatology*, 4. <https://doi.org/10.1186/s41702-020-0057-8>
- Bartsch, S., Kohnert, E., Kreutz, C., Woelber, J. P., Anderson, A., Burkhardt, A. S., Hellwig, E., Buchalla, W., Hiller, K. A., Ratka-Krueger, P., Cieplik, F., & Al-Ahmad, A. (2024). Chlorhexidine digluconate mouthwash alters the oral microbial composition and affects the prevalence of antimicrobial resistance genes. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1429692>
- Baxter, N. J., Lilley, T. H., Haslam, E., & Williamson, M. P. (1997). Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein Repeat Result in Complexation and Precipitation †. *Biochemistry*, 36, 5566–5577. <https://doi.org/10.1021/bi9700328>
- Bowen, W. H. (2013). The Stephan Curve revisited. *Odontology*, 101, 2–8. <https://doi.org/10.1007/s10266-012-0092-z>
- Bowen, W. H., & Koo, H. (2011). Biology of streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: Role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Research*, 45, 69–86. <https://doi.org/10.1159/000324598>
- 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. *Journal of Clinical Periodontology*, 19, 202–207. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1992.tb00640.x>
- Brighenti, F. L., Gaetti-Jardim, E., Danelon, M., Evangelista, G. V., & Delbem, A. C. B. (2012). Effect of Psidium cattleianum leaf extract on enamel demineralisation and dental biofilm

- composition in situ. *Archives of Oral Biology*, 57, 1034–1040. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.02.009>
- Brookes, Z. L. S., Belfield, L. A., Ashworth, A., Casas-Agustench, P., Raja, M., Pollard, A. J., & Bescos, R. (2021). Effects of chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. *Journal of Dentistry*, 113. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2021.103768>
- Brookes, Z. L. S., Bescos, R., Belfield, L. A., Ali, K., & Roberts, A. (2020). Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. *Journal of Dentistry*, 103. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2020.103497>
- Charlton, A. J., Baxter, N. J., Khan, M. L., Moir, A. J. G., Haslam, E., Davies, A. P., & Williamson, M. P. (2002). Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1593–1601. <https://doi.org/10.1021/jf010897z>
- Daglia, M., Papetti, A., Grisoli, P., Aceti, C., Dacarro, C., & Gazzani, G. (2007). Antibacterial activity of red and white wine against oral streptococci. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5038–5042. <https://doi.org/10.1021/jf070352q>
- de Souza, M. E., Clerici, D. J., Verdi, C. M., Fleck, G., Quatrin, P. M., Spat, L. E., Bonez, P. C., Santos, C. F. dos, Antoniazzi, R. P., Zanatta, F. B., Gundel, A., Martinez, D. S. T., de Almeida Vaucher, R., & Santos, R. C. V. (2017). Antimicrobial activity of Melaleuca alternifolia nanoparticles in polymicrobial biofilm in situ. *Microbial Pathogenesis*, 113, 432–437. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.005>
- Deimling, D., Hannig, C., Hoth-Hannig, W., Schmitz, P., Schulte-Mönting, J., & Hannig, M. (2007). Non-destructive visualisation of protective proteins in the in situ pellicle. *Clinical Oral Investigations*, 11, 211–216. <https://doi.org/10.1007/s00784-007-0112-5>
- Di Lorenzo, C., Colombo, F., Biella, S., Stockley, C., & Restani, P. (2021). Polyphenols and human health: The role of bioavailability. *Nutrients*, 13, 1–30. <https://doi.org/10.3390/nu13010273>
- Dias, M. I., Barros, L., Morales, P., Câmara, M., Alves, M. J., Oliveira, M. B. P. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Wild *Fragaria vesca* L. fruits: A rich source of bioactive phytochemicals. *Food and Function*, 7, 4523–4532. <https://doi.org/10.1039/c6fo01042c>
- Dias, M. I., Barros, L., Oliveira, M. B. P. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Phenolic profile and antioxidant properties of commercial and wild *Fragaria vesca* L.

- roots: A comparison between hydromethanolic and aqueous extracts. *Industrial Crops and Products*, 63, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.021>
- D'Urso, G., Pizza, C., Piacente, S., & Montoro, P. (2018). Combination of LC–MS based metabolomics and antioxidant activity for evaluation of bioactive compounds in *Fragaria vesca* leaves from Italy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 150, 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.12.005>
- Efenberger-Szmechtyk, M., Nowak, A., Czyżowska, A., Śniadowska, M., Otlewska, A., & Żyżelewicz, D. (2021). Antibacterial mechanisms of *Aronia melanocarpa* (Michx.), *Chaenomeles superba* Lindl. and *Cornus mas* L. leaf extracts. *Food Chemistry*, 350. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129218>
- Flemming, H. C., Neu, T. R., & Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: The ‘House of Biofilm Cells’. *Journal of Bacteriology* 189, 7945–7947. <https://doi.org/10.1128/JB.00858-07>
- Flemming, J., Meyer-Probst, C. T., Speer, K., Kölling-Speer, I., Hannig, C., & Hannig, M. (2021). Preventive applications of polyphenols in dentistry-A Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22094892>
- Friedman, M., Levin, C. E., Lee, S. U., & Kozukue, N. (2009). Stability of green tea catechins in commercial tea leaves during storage for 6 months. *Journal of Food Science*, 74, H47–H51. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.01033.x>
- Guggenheim, B., Gmür, R., Galicia, J. C., Stathopoulou, P. G., Benakanakere, M. R., Meier, A., Thurnheer, T., & Kinane, D. F. (2009). In vitro modeling of host-parasite interactions: The ‘subgingival’ biofilm challenge of primary human epithelial cells. *BMC Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-280>
- Hajishengallis, G. (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and host response. *Trends in Immunology* 35, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.09.001>
- Hannig, C., Follo, M., Hellwig, E., & Al-Ahmad, A. (2010). Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. *Journal of Medical Microbiology* 59, 1–7. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.015420-0>
- 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 Research*, 47, 150–161. <https://doi.org/10.1159/000345083>

- Hannig, C., & Hannig, M. (2009). The oral cavity - A key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clinical Oral Investigations* 13, 123–139. <https://doi.org/10.1007/s00784-008-0243-3>
- Hannig, C., Hannig, M., Rehmer, O., Braun, G., Hellwig, E., & Al-Ahmad, A. (2007). Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. *Archives of Oral Biology*, 52, 1048–1056. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.05.006>
- Hannig, C., Kirsch, J., Al-Ahmad, A., Kensche, A., Hannig, M., & Kümmerer, K. (2013). Do edible oils reduce bacterial colonization of enamel in situ? *Clinical Oral Investigations*, 17, 649–658. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0734-0>
- Hannig, C., Spitzmüller, B., Al-Ahmad, A., & Hannig, M. (2008). Effects of Cistus-tea on bacterial colonization and enzyme activities of the in situ pellicle. *Journal of Dentistry*, 36, 540–545. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2008.04.002>
- Hannig, M. (1999). Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Investig*, 3, 88–95. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s007840050084>
- Hannig, M., Fiebiger, M., Güntzer, M., Döbert, A., Zimehl, R., & Nekrashevych, Y. (2004). Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. *Archives of Oral Biology*, 49, 903–910. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2004.05.008>
- Hannig, M., & Hannig, C. (2007). Der initiale orale Biofilm-pathogen oder protektiv? *Oralprophylaxe & Kinderzahnheilkunde*, 29, 73–82.
- Hannig, M., & Hannig, C. (2014). The Pellicle and Erosion. *Monographs in Oral Science*, 25, 206–214. <https://doi.org/10.1159/000360376>
- Hannig, M., & Joiner, A. (2006). The Teeth and Their Environment. *Monographs in Oral Science*, 19. <https://doi.org/10.1159/000090585>
- Hannig, M., Khanafer, A. K., Hoth-Hannig, W., Al-Marrawi, F., & Açı̄l, Y. (2005). Transmission electron microscopy comparison of methods for collecting in situ formed enamel pellicle. *Clinical Oral Investigations*, 9, 30–37. <https://doi.org/10.1007/s00784-004-0284-1>
- Hashim, N. T., Babiker, R., Rahman, M. M., Mohamed, R., Priya, S. P., Chaitanya, N. C., Islam, M. S., & Gobara, B. (2024). Natural Bioactive Compounds in the Management of

- Periodontal Diseases: A Comprehensive Review. *Molecules*, 29, 3044. <https://doi.org/10.3390/molecules29133044>
- Hertel, S., Graffy, L., Pötschke, S., Basche, S., Al-Ahmad, A., Hoth-Hannig, W., Hannig, M., & Hannig, C. (2016). Effect of *Inula viscosa* on the pellicle's protective properties and initial bioadhesion *in-situ*. *Archives of Oral Biology*, 71, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.07.006>
- 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 Research*, 51, 34–45. <https://doi.org/10.1159/000451036>
- Javaid, M. A., Ahmed, A. S., Durand, R., & Tran, S. D. (2016). Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.08.006>
- Jones, C. G. (1997). Chlorhexidine: Is it still the gold standard? *Periodontology 2000*, 15, 55–62. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1997.tb00105.x>
- Karygianni, L., Al-Ahmad, A., Argyropoulou, A., Hellwig, E., Anderson, A. C., & Skaltsounis, A. L. (2016). Natural Antimicrobials and Oral Microorganisms: A systematic Review on Herbal Interventions for the Eradication of Multispecies Oral Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01529>
- Karygianni, L., Follo, M., Hellwig, E., Burghardt, D., Wolkewitz, M., Anderson, A., & Al-Ahmad, A. (2012). Microscope-based imaging platform for large-scale analysis of oral biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 8703–8711. <https://doi.org/10.1128/AEM.02416-12>
- Kawamoto, H., & Nakatubo, F. (1997). Effects of environmental factors on two-stage tannin-protein co-precipitation. *Phytochemistry*, 46, 479–483. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00333-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00333-6)
- Kirsch, J., Jung, A., Hille, K., König, B., Hannig, C., Kölling-Speer, I., Speer, K., & Hannig, M. (2020). Effect of fragaria vesca, hamamelis and tormentil on the initial bacterial colonization *in situ*. *Archives of Oral Biology*, 118. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104853>
- Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Rickard, A. H., Jakubovics, N. S., Chalmers, N. I., & Diaz, P. I. (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology 2000*, 42, 47–79. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00187.x>

- Kristensen, M. F., Frandsen Lau, E., & Schlafer, S. (2021). Ratiometric imaging of extracellular pH in *Streptococcus mutans* biofilms exposed to different flow velocities and saliva film thicknesses. *Journal of Oral Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.1080/20002297.2021.1949427>
- Liberal, J., Francisco, V., Costa, G., Figueirinha, A., Amaral, M. T., Marques, C., Girão, H., Lopes, M. C., Cruz, M. T., & Batista, M. T. (2014). Bioactivity of *Fragaria vesca* leaves through inflammation, proteasome and autophagy modulation. *Journal of Ethnopharmacology*, 158, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.09.043>
- Lichtman, J. W., & Conchello, J. A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 2, 910–919. <https://doi.org/10.1038/nmeth817>
- Liu, Y., & Hannig, M. (2020). Vinegar inhibits the formation of oral biofilm in situ. *BMC Oral Health*, 20. <https://doi.org/10.1186/s12903-020-01153-z>
- Löe, H., & Rindom Schiøtt, C. (1970). The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *Journal of Periodontal Research*, 5, 79–83. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1970.tb00696.x>
- Lopes, M. A. C., Sinhoretí, A. G. J., Consani, S. & McCabe, J.F. (2009). Comparative study of tubular diameter and quantity for human and bovine dentin at different depths. *Brazilian Dental Journal*, 20, 279–283. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402009000400003>
- Łukomska-Szymańska, M., Sokołowski, J., & Łapińska, B. (2017). Chlorhexidine – mechanism of action and its application to dentistry. *Journal of Stomatology*, 70, 405–417. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.5698>
- Marsh, P. D. (2004). Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Research*, 38, 204–211. <https://doi.org/10.1159/000077756>
- Marsh, P. D. (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community - Implications for health and disease. *BMC Oral Health*, 6. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-6-S1-S14>
- Marsh, P. D. (2012). Contemporary perspective on plaque control. *British Dental Journal*, 212, 601–606. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2012.524>
- Martínez-Hernández, M., Reda, B., & Hannig, M. (2020). Chlorhexidine rinsing inhibits biofilm formation and causes biofilm disruption on dental enamel in situ. *Clinical Oral Investigations*, 24, 3843–3853. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00784-020-03250-3>

- Mathur, S., Mathur, T., Srivastava, R., & Khatri, R. (2011). Chlorhexidine: The Gold Standard in Chemical Plaque Control. *National Journal of Physiology, Pharmacy & Pharmacology*, 1, 45–50.
- McGrath, C., Clarkson, J., Glenny, A.-M., Walsh, L. J., & Hua, F. (2023). Effectiveness of Mouthwashes in Managing Oral Diseases and Conditions: Do They Have a Role? *International Dental Journal*, 73, 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.intldent.2023.01.001>
- Moran, J. M. (2008). Home-use oral hygiene products: Mouthrinses. *Periodontology 2000*, 48, 42–53. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2008.00260.x>
- Mudnic, I., Modun, D., Brizic, I., Vukovic, J., Generalic, I., Katalinic, V., Bilusic, T., Ljubenkov, I., & Boban, M. (2009). Cardiovascular effects *in vitro* of aqueous extract of wild strawberry (*Fragaria vesca*, L.) leaves. *Phytomedicine*, 16, 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.11.004>
- Mueller-Wirth, N., Buentner, A., Jörg, L., Ebo, D. G., Glatz, M., Fernando, S. L., Spoerl, D., Helbling, A., Hausmann, O., Gupta, N., & Pichler, W. J. (2020). IgE-mediated chlorhexidine allergy-Cross-reactivity with other biguanide disinfectants. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 75, 3237–3247. <https://doi.org/10.1111/all.14497>
- Netuschil L, Auschill T M, Sculean A, & Arweiler NB. (2014). Confusion over live:dead stainings for the detection of vital microorganisms in oral biofilms - which stain is suitable? *BMC Oral Health*, 14. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-14-2>
- Neu, T. R., & Lawrence, J. R. (2015). Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales. *Trends in Microbiology*, 23, 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.010>
- Neves, J. M., Matos, C., Moutinho, C., Queiroz, G., & Gomes, L. R. (2009). Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 270–283. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.041>
- Pandey, K., & Rizv, S. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2:5, 270–278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Pawlaczyk-Graja, I., Balicki, S., & Wilk, K. A. (2019). Effect of various extraction methods on the structure of polyphenolic-polysaccharide conjugates from *Fragaria vesca* L. leaf.

International Journal of Biological Macromolecules, 130, 664–674.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.013>

Popović, Z. S., Smiljanic, M., Kostić, M., Nikić, P., & Janković, S. (2014). Wild flora and its usage in traditional phytotherapy. *Article in Indian Journal of Traditional Knowledge*, 13, 9-25. <https://www.researchgate.net/publication/267029855>

Poppo Deus, F., & Ouanounou, A. (2022). Chlorhexidine in Dentistry: Pharmacology, Uses, and Adverse Effects. *International Dental Journal*, 72, 269–277.
<https://doi.org/10.1016/j.identj.2022.01.005>

Praveen Jayaram, A. C. and V. R. (2016). Probiotics in the treatment of periodontal disease: A systematic review. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 20, 488–495.
<https://doi.org/10.4103/0972-124X.207053>

Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50, 586–621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>

Quirynen, M., & Bollen, C. M. L. (1995). The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man: A review of the literature. *Journal of Clinical Periodontology*, 22, 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1995.tb01765.x>

Rana, A., Samtiya, M., Dhewa, T., Mishra, V., & Aluko, R. E. (2022). Health benefits of polyphenols: A concise review. In *Journal of Food Biochemistry*, 46. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14264>

Reda, B., Hollemeyer, K., Trautmann, S., Hannig, M., & Volmer, D. A. (2020). Determination of chlorhexidine retention in different oral sites using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Archives of Oral Biology*, 110. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104623>

Rehage, M., Delius, J., Hofmann, T., & Hannig, M. (2017). Oral astringent stimuli alter the enamel pellicle's ultrastructure as revealed by electron microscopy. *Journal of Dentistry*, 63, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.05.011>

Rolla, G. & Melsen, B. (1975). On the Mechanism of the Plaque Inhibition by Chlorhexidine. *Journal of Dental Research*, 54, 57–62. <https://doi.org/10.1177/00220345750540022601>

- Rosan, B., & Lamont, R. J. (2000). Dental plaque formation. *Microbes and Infection*, 2, 1599–1607. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01316-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01316-2)
- Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., & Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>
- Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond 1–3. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 215S–7S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.215S>
- Schestakow, A., & Hannig, M. (2020). Effects of experimental agents containing Tannic acid or Chitosan on the bacterial biofilm formation in situ. *Biomolecules*, 10, 1–17. <https://doi.org/10.3390/biom10091315>
- Schestakow, A., Meyer-Probst, C. T., Hannig, C., & Hannig, M. (2022). Prevention of Dental Biofilm Formation with Polyphenols: A Systematic Review. *Planta Medica*, 89, 1026–1033. <https://doi.org/10.1055/a-1939-7615>
- Schestakow, A., Pütz, N., Guth, M. S., Eisenmenger, T. A., Dudek, J., & Hannig, M. (2022). Influence of a hydroxyapatite suspension on 48-h dental biofilm formation in-situ. *Archives of Oral Biology*, 136. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2022.105388>
- Schestakow A, Rasputnis W, & Hannig M. (2024). Effect of Polyphenols on the Ultrastructure of the Dentin Pellicle and Subsequent Erosion. *Caries Research.*, 58, 81–89. <https://doi.org/https://doi.org/10.1159/000536199>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9, 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schönbächler, N., Thurnheer, T., Paqué, P. N., Attin, T., & Karygianni, L. (2023). *In vitro* versus *in situ* biofilms for evaluating the antimicrobial effectiveness of herbal mouthrinses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1130255>

- Sissons, C. H. (1997). Biofilms on Oral Surfaces: Implications for Health and Disease. *Advances in Dental Research*, 11, 110–126. <https://doi.org/10.1177/08959374970110010201>
- Sterzenbach, T., Helbig, R., Hannig, C., & Hannig, M. (2020). Bioadhesion in the oral cavity and approaches for biofilm management by surface modifications. *Clinical Oral Investigation*, 24, 4237–4260. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03646-1>
- Tawakoli, P. N., 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. *Clinical Oral Investigations*, 17, 841–850. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0792-3>
- Teruel, J., Alcolea, A., Hernández, A., & Ruiz, A. J. O. (2015). Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Archives of Oral Biology*, 60, 768–775. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.01.014>
- Trautmann, S., Künzel, N., Fecher-Trost, C., Barghash, A., Schalkowsky, P., Dudek, J., Delius, J., Helms, V., & Hannig, M. (2020). Deep Proteomic Insights into the Individual Short-Term Pellicle Formation on Enamel—An *In Situ* Pilot Study. *Proteomics - Clinical Applications*, 14. <https://doi.org/10.1002/prca.201900090>
- Weber, M. T., Hannig, M., Pötschke, S., Höhne, F., & Hannig, C. (2015). Application of plant extracts for the prevention of dental erosion: An *in situ/in vitro* study. *Caries Research*, 49, 477–487. <https://doi.org/10.1159/000431294>
- Wegehaupt, F., Gries, D., Wiegand, A., & Attin, T. (2008). Is bovine dentine an appropriate substitute for human dentine in erosion/abrasion tests? *Journal of Oral Rehabilitation*, 35, 390–394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2007.01843.x>
- Winey, M., Meehl, J. B., O'Toole, E. T., & Giddings, T. H. (2014). Conventional transmission electron microscopy. *Molecular Biology of the Cell*, 25, 319–323. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-12-0863>
- Wolff, D., Kensche, A., Rupf, S., Hannig, M., & Hannig C. (2014). Der orale Biofilm – neue Perspektiven zu einem alten Thema? *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, 69, 658–673.
- 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. *Journal of Dentistry*, 102. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2020.103482>

- Xie, Q., Li, J., & Zhou, X. (2008). Anticaries effect of compounds extracted from *Galla Chinensis* in a multispecies biofilm model. *Oral Microbiology and Immunology*, 23, 459–465. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2008.00450.x>
- Yamanaka, A., Kouchi, T., Kasai, K., Kato, T., Ishihara, K., & Okuda, K. (2007). Inhibitory effect of cranberry polyphenol on biofilm formation and cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research*, 42, 589–592. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2007.00982.x>
- Yassen, GH, Platt, J, & Hara, A. (2011). Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research- a review of literature. *Journal of Oral Science*, 53, 273–282. <https://doi.org/10.2334/josnusd.53.273>
- Zafrilla, P., Morillas, J., Mulero, J., Cayuela, J. M., Martínez-Cachá, A., Pardo, F., & López Nicolás, J. M. (2003). Changes during storage in conventional and ecological wine: Phenolic content and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4694–4700. <https://doi.org/10.1021/jf021251p>

7 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig, für die konstruktive wissenschaftliche Begleitung und das entgegengebrachte Vertrauen danken. Seine fachliche Expertise und seine Unterstützung haben diese Arbeit entscheidend geprägt.

Ein Dank gilt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 1027) für die finanzielle Unterstützung, die die Durchführung der Experimente ermöglicht hat.

Mein besonderer Dank gilt auch meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Simone Trautmann, die mir mit Rat und Tat zur Seite stand und deren Anregungen diese Dissertation wesentlich bereichert haben.

Ein weiterer großer Dank geht an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Forschungslabors für die Einführung in Material und Methodik. Insbesondere möchte ich mich hier bei Norbert Pütz, Dr. med. dent. Bashar Reda, Jessica Schmitt-Bennewart und Vanessa Schmitt bedanken.

Mein Dank gilt auch den Probandinnen und Probanden, die durch ihre engagierte und zuverlässige Teilnahme maßgeblich zum Gelingen dieser Untersuchung beigetragen haben.

Meiner Familie danke ich herzlich für ihre stetige Unterstützung während meines Studiums und der Erstellung dieser Arbeit.

8 Lebenslauf

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