

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. M. Hannig

In-situ-Untersuchung zur Biofilmbildung auf einem octenidinhaltigen experimentellen Komposit

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von:

Alexandra Baum

geb. am: 27.10.1975 in Neunkirchen/Saar

Tag der Promotion:

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1	Deutsche Zusammenfassung	1
1.2	Abstract.....	2
2	EINLEITUNG	3
2.1	Der Biofilm.....	3
2.1.1	Bedeutung und Problematik von Biofilmen	3
2.1.2	Definition und Entstehung oraler Biofilme	5
2.1.3	Beeinflussung der Biofilmbildung durch den Einsatz von Restaurationsmaterialien mit antibakteriell wirkenden Komponenten	8
2.2	Ziel der Arbeit / Fragestellung.....	14
3	MATERIAL UND METHODE	16
3.1	Probanden	16
3.2	Experimentelles Komposit.....	17
3.3	In-situ-Biofilmbildung	19
3.4	Analyse der bakteriellen Adhärenz und Biofilmbildung	20
3.5	Vorbereitung der Prüfkörper für die rasterelektronenmikroskopische	
	Untersuchung.....	20
3.6	Vorbereitung der Prüfkörper für die Fluoreszenzmikroskopie/Live-dead-staining	23
3.7	Auswertung und statistische Verfahren	24

4	ERGEBNISSE	25
4.1	Auswirkungen auf die Biofilmbildung	25
4.1.1	Einfluß der Konzentration des antiseptischen Agenz Octenidindihydrochlorid auf die Biofilmbildung bei den einzelnen Probanden.....	25
4.1.2	Einfluß der Konzentration des antiseptischen Agenz auf die Biofilmbildung im Hinblick auf die Parameter gealtert (TC), nicht gealtert (NTC), poliert (P) und nicht poliert (NP)	28
4.1.3	Einfluß des antiseptischen Agenz in 3%- und 6% -iger Konzentration auf die Biofilmbildung nach 3- und 7-tägiger oraler Exposition unabhängig von den Parametern Politur und künstlicher Alterung	30
4.1.4	Beispiele der rasterelektronenmikroskopischen Analyse der Biofilmbildung.....	32
4.1.5	Rasterelektronenmikroskopische Analyse von gealterten (TC) und nicht gealterten (NTC) Prüfkörpern, die nicht intraoral exponiert wurden.....	37
4.1.6	Beispiele der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Biofilmbildung	38
4.2	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	40
4.2.1	Einfluß von Alterung und Auslaugungsphänomenen auf die Biofilmbildung.....	41
4.2.2	Einfluß der Oberflächenrauigkeit auf die Biofilmbildung.....	43
4.3	Auftreten von Nebenwirkungen bzw. unerwünschten Wirkungen.....	45
5	DISKUSSION	46
6	SCHLUßFOLGERUNGEN	54
7	LITERATURVERZEICHNIS	56
8	PUBLIKATION / DANKSAGUNG	73
8.1	Publikation.....	73

8.2 Danksagung 73

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es das Ausmaß der Biofilmbildung auf einem Kompositmaterial, dem ein antibakterieller Wirkstoff auf Bispyridiniumbasis (Octenidindihydrochlorid) zugesetzt war, unter oralen Bedingungen zu testen. Es wurde untersucht, ob und in welchem Umfang die Adhärenz der Bakterien und die anschließende Biofilmbildung durch das Antiseptikum beeinflusst werden.

Hierzu wurden von 6 gesunden Probanden individuelle Oberkiefertrageschienen, bestückt mit Prüfkörpern aus dem antiseptisch angereicherten Kompositmaterial (n=192), über einen Zeitraum von 3 und 7 Tagen getragen. Die Octenidin Konzentration der Prüfkörper betrug 3% und 6%. Analog dazu wurden Kontrollprüfkörper (n= 96) ohne antiseptisch wirkenden Zusatz getragen. Um zu untersuchen, ob die Oberflächenrauigkeit des Komposits einen Einfluß auf die Biofilmbildung hat, wurde ein Teil der zu Verfügung gestellten Prüfkörper poliert, der andere Teil der Proben verblieb im unpolierten Zustand.

Weiterhin wurde ein Teil der polierten und unpolierten Prüfkörper vor der intraoralen Exposition in einem Thermocycler einem künstlichen Alterungsprozeß unterzogen. Es sollte analysiert werden, ob Alterung und Auslaugungsphänomene die in-situ-Biofilmbildung beeinflussen. Die Biofilmbildung wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) und die Vitalität der Mikroorganismen mittels Fluoreszenzmikroskopie (FM) analysiert.

Bei der elektronenmikroskopischen Auswertung war auf den mit Octenidindihydrochlorid angereicherten Prüfkörpern, sowohl nach 3 als auch nach 7 Tagen intraoraler Exposition, im Vergleich zu den Kontrollprüfkörpern ohne antiseptischen Zusatz eine deutliche Reduktion der Biofilmbildung zu verzeichnen.

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung zeigte eine Reduktion der Vitalität der Mikroorganismen für beide Konzentrationen des Antiseptikums.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Anreicherung der Kompositprüfkörper mit Octenidindihydrochlorid eine hemmende Wirkung auf die in-situ Biofilmbildung ausübt.

1.2 Abstract

The aim of this study was to investigate in situ biofilm formation on an experimental resin composite containing the antimicrobial additive octenidinedihydrochlorid under oral conditions.

We analysed whether there is an influence on the adherence of bacteria and the following biofilm formation. Six healthy volunteers were involved. They received individually produced intraoral splints containing the specimens (n= 192) with octenidinedihydrochlorid in a concentration of 3% and 6% . Analogous specimens without the antimicrobial additive served as control (n= 96). The splints were exposed in the oral cavity for a period of three and seven days. One part of the resin composite specimens was polished, the other part of the resin composite specimens remained unpolished in order to find out if biofilm formation is affected by the surface quality of the composite.

Furthermore, another part of the polished and non-polished specimens was thermocycled before oral exposure to observe, if an aging and elution process compromised the in situ biofilm formation. In situ biofilm formation was evaluated by scanning electron microscopy (SEM) and biofilm viability was assessed by fluorescence microscopy (FM).

SEM analysis showed a significant reduction of biofilm formation on the specimens enriched with the antimicrobial additive after three and seven days of intraoral exposure in comparison to the control group.

FM evaluation evidenced a decrease of microorganisms` viability for both concentrations of octenidinedihydrochlorid.

In summary we could realize, that enrichment of an experimental resin composite with the antibacterial additive octenidindihydrochlorid had an inhibiting effect on in situ biofilm formation.

2 Einleitung

2.1 Der Biofilm

2.1.1 Bedeutung und Problematik von Biofilmen

Der Gedanke, dass Bakterien vorzugsweise Oberflächen bewachsen, kam bereits sehr früh auf.

Im Jahre 1675 beschrieb Antoni van Leeuwenhoek (Slavkin, 1979; Christersson et al., 1991; He et al., 2009) bei mikroskopischen Untersuchungen Ansammlungen von kleinsten Lebewesen in der menschlichen dentalen Plaque. Mit Hilfe seines selbst entwickelten Mikroskops konnte er als erster Bakterien beobachten. Er begründete mit seiner Beschreibung von Bazillen, Kokken und Spirillen das Gebiet der Bakteriologie, aus der später die Mikrobiologie hervorgegangen ist.

In den 1930er Jahren untersuchte Claude E. Zobell (Zobell, 1943) mikroskopisch natürlich vorkommendes Meerwasser, welches er in sterilen Glasflaschen sammelte. Er stellte fest, dass viele Bakterien des Meerwassers vorzugsweise gebunden an eine Oberfläche wachsen.

Im Laufe der Geschichte haben Mikrobiologen herausgefunden, dass Bakterien, nachdem sie sich an eine Oberfläche angelagert haben, verschiedenartig wachsen und eine Biofilmbildung einleiten. Bereits im Jahre 1964 untersuchten Ralph Mitchell und Kevin Marshall (Marshall et al., 1971) die ersten Stadien der Biofilmbildung in reinen Bakterienkulturen. Sie konnten zwischen einer reversiblen Anhaftung von Bakterien an Oberflächen und einer nachfolgenden irreversiblen Bindung unterscheiden. Diese irreversible Bindung ist ein sehr entscheidender Schritt, denn er macht das erste Stadium der Biofilmbildung aus (Costerton, 1999).

Dieses Phänomen der Adhäsion von Mikroorganismen an Oberflächen jeglicher Art mit nachfolgender Bildung eines Biofilmes ist allgegenwärtig (Hannig und Hannig, 2009).

Mikrobielle Biofilme sind ubiquitär. Es existiert keine Oberfläche, welche nicht von Mikroorganismen besiedelt wird. Sie können an allen Arten von Phasengrenzen entstehen, wenn gewisse Voraussetzungen erfüllt sind. Dazu gehören ein feuchtes Milieu, das Vorhandensein einer Grenzfläche, die Anwesenheit von Mikroorganismen und eine Nährstoffquelle. Da diese Bedingungen vielerorts erfüllt sind, nimmt der Biofilm nicht nur in der Medizin eine bedeutende Rolle ein, sondern auch in Bereichen wie der Umweltbiologie und in technischen Sys-

temen (Costerton et al., 1978; Donlan et al., 2002; Hannig et al., 2007; Hall-Stoodley et al., 2004; Costerton et al., 1987).

Die Biofilmbildung kann sich in vielen Bereichen als sehr nützlich erweisen, wie z.B. in der Abwassertechnik, der biologischen Abfallbeseitigung oder der Bodensanierung, wo entsprechende Mikroorganismen eingesetzt werden, um Bodenschadstoffe zu zersetzen (Bouwer et al., 1993; Mac Donald et al., 1993; Marjaka et al., 2003; Hori et al., 2001; Hori et al., 2010).

Fast überall wo Biofilme entstehen, können sie aber auch unerwünschte oder sogar schädliche Auswirkung haben. Sie werden als Ursache für die Entstehung zahlreicher Probleme und Schäden verantwortlich gemacht, wie für die Verunreinigung von Trinkwassersystemen, Bio-korrosion, Biofouling, Kontamination von Lebensmitteln, Besiedelung von Schlauchsystemen zahnärztlicher Behandlungseinheiten, um nur einige Beispiele zu nennen (van der Wende et al., 1989; Peyton et al., 1995; Aulicino et al., 2004; Flemming et al., 1996; Videla et al., 1992; Olsen et al., 1949; Gouidera et al., 2009; Flemming, 2002; Walker et al., 2000; Kumar et al., 2010; Spratt et al., 2004).

Aus medizinischer Sicht stellen Biofilme eine große Herausforderung dar. Da sie auch an Oberflächen von Fremdmaterialien wie z.B. Nahtmaterial, Kathetern, Implantaten, Operationsbestecken, Endoskopen oder Herzschrittmachern zu finden sind, die in den Körper eingebracht bzw. mit ihm in unmittelbarem Kontakt gebracht werden, geht von ihnen die Entstehung zahlreicher Infektionen aus.

Man hat herausgefunden, dass Bakterien, die sich zu einem Biofilm organisiert haben eine außerordentlich hohe Resistenz gegen antibakterielle Substanzen aufweisen. Diese Erkenntnis ist von großer Bedeutung und wird mittlerweile als die Hauptursache für eine Reihe von nur unzureichend zu behandelnden chronischen Infektionen angesehen. Dazu gehören beispielsweise die Endokarditis, die zystischen Fibrose, die Osteonekrose oder Osteomyelitis (Costerton et al., 1999; Sedghizadeh et al., 2008; Lauderdale et al., 2009; Edmiston et al., 2006; Brady et al., 2008; Sawhney et al., 2009; Scheld et al., 1978; Costerton, 2005).

So tritt natürlich auch bei der Verwendung dentaler Restaurationsmaterialien immer wieder eine bakterielle Besiedelung auf, die aus zahnmedizinischer Sicht ihre Probleme mit sich bringt. Folglich wird im Bereich der Zahnmedizin schon sehr lange Forschungsarbeit geleistet, um mehr über das Phänomen der Biofilmbildung herauszufinden. In der Mundhöhle werden die bakteriellen Biofilme auch als Plaque bezeichnet. Die Plaque stellt mikrobiologisch

einen komplex aufgebauten bakteriellen Biofilm dar (Wilson et al., 1996; Liljemark et al., 1997; Thrower et al., 1997; Embleton et al., 1998; Bradshaw et al., 1999; Marsh, 1999).

Dieser Biofilm wird als einer der Hauptfaktoren für die Entstehung von Karies und Parodontitis angesehen, den häufigsten Infektionskrankheiten des Menschen (Bowden, 1990; Loesche, 1982; Loesche, 1986; Moore et al., 1983; Marsh, 2006, Guggenheim, 1974; Liljemark et al., 1996; Appelbaum et al., 1979; Scheie, 1994). Daher besteht u.a. von zahnmedizinischer Seite her ein großes Interesse an der Erforschung von effizienten Mitteln zur Biofilmentfernung, -zerstörung bzw. zur Vermeidung ihrer Entstehung (Marsh, 1993; Verkaik et al., 2010).

Über die konventionellen Mundhygienemaßnahmen hinaus gibt es vielfältige Methoden, um Einfluß auf den dentalen Biofilm zu nehmen. Neben der Biofilmentfernung von Zahnoberflächen durch mechanische Reinigung, spielt der Einsatz antimikrobieller Substanzen eine wichtige Rolle. Diese können Zahnpasten oder Mundspüllösungen zugesetzt sein (Carter et al., 2001; Marsh, 1993; Wilson, 1996; Emilson, 1994; Thrower et al., 1997).

Eine weitere Option läge in der Anreicherung dentaler Restaurationsmaterialien und Prothesenwerkstoffe mit antiseptisch wirksamen Substanzen. Hierzu gibt es bereits zahlreiche Studien, jedoch handelt es sich bislang noch um eine experimentelle Möglichkeit der Biofilmkontrolle.

2.1.2 Definition und Entstehung oraler Biofilme

Allgemein kann man Biofilme als Bakterienpopulationen, eingebettet in eine selbst produzierte extrazelluläre Matrix polymerer Moleküle, definieren (Costerton et al., 1994).

Biofilme stellen sehr heterogene Systeme dar und weisen hinsichtlich ihrer Struktur und Zusammensetzung eine große Variabilität auf. Sie bestehen aus bakteriellen Mikrokolonien, die meistens aus zahlreichen unterschiedlichen Bakterienspezies zusammengesetzt sind (Costerton et al., 1999; Cate, 2006). Die einzelnen Kolonien weisen ein charakteristisches Aussehen auf. Sie imponieren als turmartige oder pilzförmige Gebilde (Stoodley et al., 1999; Costerton et al., 1994; Costerton, 1995). Neben Mikroorganismen bestehen Biofilme hauptsächlich aus Wasser, welches mit den extrazellulären polymeren Substanzen eine schleimartige Matrix bildet. Zwischen den zahllosen bakteriellen Enklaven erstreckt sich ein Netzwerk winziger Kanälchen. Diese Kanälchen gewährleisten den Austausch und Transport von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten (Stoodley et al., 1994; Tolker-Nielsen et al., 2000).

Die Komplexität der Biofilmstruktur und des Stoffwechsels führt dazu, sie mit Geweben höherer Organismen zu vergleichen (Costerton et al., 1994; Costerton et al., 1999).

Im Verbund des Biofilms zu leben, ist für Mikroorganismen mit zahlreichen ökologischen Vorteilen verbunden. Im Gegensatz zu Bakterien in planktonischer Lebensform, welche Noxen unmittelbar ausgesetzt sind, stellt der Biofilm eine schützende Gemeinschaft dar. Äußerer Stress wie Substratmangel, die Exposition von toxischen Substanzen (z.B. Antibiotika) oder extreme pH-Schwankungen können besser abgefangen werden (Watnik et al., 2000; Mabrouk et al., 2010; Carlsson 1997). Die Matrix verleiht den Mikroorganismen eine gewisse mechanische Stabilität und bietet ihnen die Möglichkeit synergetische Wechselwirkungen aufzubauen. Darüber hinaus findet neben einem gegenseitigen Genaustausch auch eine Verständigung durch spezielle Signalmoleküle untereinander statt. Dieses Phänomen des interzellulären Informationsaustausches bezeichnet man als Quorum-sensing.

Auf diese Weise stellen Biofilme kleine leistungsfähige Ökosysteme dar, welche auf Umweltreize reagieren können (Chalmers et al., 2008; Jayaraman et al., 2008; Kolenbrander et al., 2002; Sedgley et al., 2008; Hojo et al., 2009).

Bei der Entwicklung eines reifen Biofilms handelt es sich um ein sehr komplexes Phänomen. Die Biofilmbildung stellt einen dynamisch ablaufenden Prozess dar, gekennzeichnet durch eine stetige Reorganisation der bakteriellen Mikrokolonien. Eine Schlüsselfunktion bei der Besiedelung intraoraler Oberflächen nimmt die Pellikelschicht ein. Sie ist für die bakterielle Adhärenz von großer Bedeutung. Auf einer gründlich gereinigten Zahnoberfläche bildet sich schon wenige Sekunden nach Speichelkontakt ein unstrukturierter azellulärer Film, das sog. exogene Zahnoberhäutchen bzw. die exogene Pellikel. In erster Linie besteht die Pellikel aus Proteinen des Speichels, sog. Glycoproteinen, sauren prolinreichen Proteinen, Serumproteinen, Enzymen sowie Immunglobulinen. Da diese Proteine eine Eigenladung besitzen, kann eine elektrostatische Bindung an die Phosphat- und Kalziumgruppen der Zahnhartsubstanz ermöglicht werden. Dieser so entstandene Film führt zu einer Änderung der Oberflächenladung, was wiederum dazu führt, dass Mikroorganismen mit dieser Pellikel in Wechselwirkung treten. Zu den bedeutendsten Frühbesiedlern zählen grampositive Streptokokken (*S. sanguis*, *S. mutans*) und Aktinomyceten (v.a. *A. viscosus* und *A. naeslundii*), die durch bakterielle Oberflächenmoleküle mit der dentalen Pellikel interagieren und an diese binden (Rosan et al., 1982; Rosan et al., 1982; Liljemark et al., 1997).

Nach dieser initialen Besiedelung findet im weiteren Verlauf ein Plaquewachstum durch eine Vermehrung der bereits angehafteten Bakterien und die Adhäsion und Vermehrung neuer

bakterieller Spezies statt. Dazu gehören gramnegative Bakterien wie *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* und *Capnocytophaga*, wobei insbesondere die Fusobakterienarten eine bedeutende Rolle beim Plaquewachstum haben. Man hat herausgefunden, dass Fusobakterien die Fähigkeit besitzen, an sämtlichen bisher bekannten oralen Mikroorganismen über Koaggregation zu binden. (Unter Koaggregation versteht man die Haftung genetisch unterschiedlicher Bakterienarten. Koadhäsion bedeutet die Haftung genetisch identischer Bakterienarten.)

Nach ungefähr einer Woche sind weitere gramnegative Bakterien in der Plaque präsent. Dazu gehören *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Actinobacillus actinomycetem comitans* und Spirochäten wie z.B. *Treponema denticola*.

Nach einem Zeitintervall von 10-14 Tagen ist der Plaquebiofilm ausgereift.

Schwache elektrostatische Anziehungskräfte sorgen vorerst dafür, dass die Bakterien auf der Zahnoberfläche gehalten werden. Eine irreversible Anheftung wird durch spezifische stereochemische Wechselwirkungen erreicht. Dabei handelt es sich um Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren der Pellikel und spezifischen Bindungsmolekülen, den Adhäsinen, auf der mikrobiellen Zelloberfläche (Bowden et al., 1998).

Koaggregations- und Koadhäsionsprozesse weiterer Mikroorganismen an bereits angeheftete Zellen führen zu einem konfluenten Wachstum und schließlich zur Ausbildung eines Biofilms (Kolenbrander, 2000; Stickler, 1999).

Weil sich die Bakterien von einer Oberfläche oder einem Biofilm zurück in die planktonische Phase ablösen können, ist eine Besiedelung neuer Flächen möglich (Marsh et al., 2003; Hellwig et al., 2007).

Biofilme bilden sich in allen Bereichen der Mundhöhle. Im Allgemeinen herrscht ein Gleichgewicht zwischen Wirt und Biofilm, jedoch kann eine unkontrollierte Akkumulation dieses Gleichgewicht stören und Erkrankungen wie z.B. Gingivitis, Parodontitis, Karies, Periimplantitis verursachen.

2.1.3 Beeinflussung der Biofilmbildung durch den Einsatz von Restaurationsmaterialien mit antibakteriell wirkenden Komponenten

Mikroskopische Untersuchungen an Zähnen zeigten, dass sich Bakterien zuerst bevorzugt in Grübchen, Fissuren oder Oberflächendefekten, wie sie durch Abrasion entstehen können, anlagern (Nyvad et al., 1987). Solche unebenen, rauhen Nischen bieten u.a. Schutz vor Scherkräften und geben den Mikroorganismen so mehr Zeit in Kontakt miteinander zu treten. Daraus resultiert ein schnelleres Bakterienwachstum mit der Ausbildung einer reiferen und auch somit pathogeneren Plaque.

Folglich sind auch dentale Restaurationsmaterialien von der Besiedelung betroffen.

Bedingt durch die Oberflächenmorphologie des verwendeten Materials, vollzieht sich die Plaqueanlagerung unterschiedlich stark und schnell. So neigen Materialien mit einer rauhen Oberfläche und hoher freier Oberflächenenergie zu stärkerer zu Belagsbildung (Quirynen et al., 1990; Quirynen et al., 1994; Quirynen et al., 1995; Carlehn et al., 2001).

Hahn et al. (1993) konnten zeigen, dass Keramik signifikant weniger zur Plaqueanlagerung neigt als Schmelz oder Komposit. Dies ist auf verschiedene Faktoren, wie die freie Oberflächenenergie und materialspezifische Eigenschaften zurückzuführen (Hahn et al., 1993).

Auschill et al. (2002) untersuchten den Effekt dentaler Restaurationsmaterialien auf den dentalen Biofilm in vivo. Bei den verwendeten Materialien handelte es sich um Gold, Amalgam, Keramik, Komposit, Kompomer und Glasionomerzement. Alle genannten Materialien erhielten eine gleiche Oberflächenbearbeitung. Danach wurde das Biofilmwachstum analysiert und verglichen. Sie kamen zu der Erkenntnis, dass neben physikalischen Parametern wie der Oberflächenrauigkeit auch die chemische Zusammensetzung des Materials eine entscheidende Rolle spielt. So setzen Amalgame Ionen frei, die Bakterien abtöten. Glasionomerzemente sind dafür bekannt Fluoridionen freizusetzen, die das Wachstum und die Vitalität sich anlagernder Bakterien beeinflussen. Darüber hinaus gibt es Daten, dass auch Gold mit Bakterien interagiert (Aughtun et al., 1988; Auschill et al., 2002).

In einer Studie von Beyth et al. (2008) wurde untersucht, ob eine Interaktion zwischen Bakterien- und Kompositoberfläche zu einer Änderung der Oberflächentopographie führt. Sie konnten in Ihrer Arbeit nachweisen, dass *Streptococcus mutans* einen Anstieg der Oberflächenrauigkeit induziert, welche wiederum die Anlagerung von Bakterien begünstigt (Beyth et al., 2008).

Die Kontrolle der Biofilmbildung stellt eine dauerhafte alltägliche Herausforderung dar. Neben den konventionellen Mundhygienemaßnahmen wie mechanischer Reinigung, die im Wesentlichen von der Mitarbeit und dem Geschick der Patienten abhängt, und dem Einsatz antibakterieller Stoffe, besteht ein gesteigertes Interesse in der Entwicklung plaqueabweisender Dentalwerkstoffe bzw. mit antiseptisch wirksamen Agenzien angereicherten Werkstoffen.

Auf diese Weise hätte man eine neue Möglichkeit, die Biofilmbildung zu reduzieren bzw. zu hemmen. Die daraus resultierenden Folgen wie Karies, Gingivitis, Parodontitis könnten positiv beeinflusst werden. Ideal wäre sicherlich eine dauerhafte Inhibition der Plaquebildung.

Es gibt bereits eine Vielzahl von Studien, in denen dentale Werkstoffe, welchen antibakterielle Agenzien zugesetzt sind, untersucht wurden.

So untersuchten Pinheiro et al. (2005) die antibakterielle Aktivität von Glasionomerkementen, denen verschiedene Antibiotika zugesetzt wurden, in Bezug auf Mikroorganismen kariöser Läsionen. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass Glasionomerkement angereichert mit 1% Metronidazol, 1% Ciprofloxacin und 1% Cefaclor zu einer signifikant höheren Reduktion von Bakterien im infizierten Dentin führt, im Vergleich zu konventionellem Glasionomerkement. Es resultierte eine durchschnittliche Reduktionsrate von 98,65% aller lebensfähigen Bakterien.

Eine Studie von Beyth et al. (2006) beschäftigte sich mit der antibakteriellen Wirksamkeit eines Komposits in Kombination mit 1% quaternären Ammonium-Polyethylenimin-Nanopartikeln (PEI) auf die 4 Stunden Biofilmbildung in vivo. Die Analyse der intraoral getragenen Prüfkörper zeigte eine signifikante Reduktion der lebenden Bakterien im Biofilm um mehr als 50%. Interessanterweise kam es jedoch durch den Zusatz der Nanopartikel zu keiner Reduktion der Biofilmdicke. Rasterelektronenmikroskopische Analysen der Prüfkörper zeigten Unterschiede in der Biofilmstruktur. Im Vergleich zu den Kontrollprüfkörpern mit einem etablierten Biofilm und zahlreichen Bakterien waren bei dem experimentell hergestellten Komposit nur wenige Bakterienzellen mit einer klaren Membran zu erkennen.

Langhorst et al. (2009) untersuchten die Wirksamkeit eines experimentell hergestellten Komposits angereichert mit amorphem Kalziumphosphat im Hinblick auf den Remineralisierungseffekt auf oberflächliche Schmelzläsionen ähnlich denen einer frühen Karies in vitro. Zu Vergleichszwecken blieb ein Teil der künstlich hergestellten Läsionen unbehandelt, ein Teil wurde mit dem experimentellen Komposit behandelt und ein weiterer Teil mit einem gebräuchlichen Fluor freisetzenden Zement. Bei den oberflächlichen Schmelzläsionen, welche mit dem experimentellen Kunststoff behandelt wurden, war eine Remineralisierung von 14% zu ver-

zeichnen. Der Fluor freisetzende Zement erreichte nur einen Remineralisierungseffekt von 4%. Im Vergleich dazu wiesen die unbehandelten Kontrollprüfkörper eine Demineralisierung von 55% auf.

Auch Moreau et al. (2011) beobachteten für ein experimentell hergestelltes Komposit mit amorphem Kalziumphosphat ph-neutralisierende Eigenschaften und eine moderate antibakterielle Wirkung gegen *Streptococcus mutans*.

Jedoch gibt es bisher noch keinen Werkstoff, der ausreichende biofilmreduzierende bzw. mikrobiozide Eigenschaften aufweist und für den permanenten Einsatz in der Mundhöhle geeignet ist.

Die lokale Fluoridierung ist eine gängige Methode der Entstehung von Karies entgegen zu wirken. Der antikariogene Effekt von mit Fluor angereicherten Restaurationsmaterialien wurde in zahlreichen Studien belegt (Dionysopoulos et al., 2003; Zimmermann et al., 1984; Cate, 1999; Kotsanos, 2001; Yaman et al., 2004; Lennon et al., 2007).

So sind Glasionomerzemente schon sehr lange im Einsatz. Durch die Freisetzung von Fluoridionen, die das Wachstum und die Vitalität sich anlagernder Bakterien beeinflussen, besitzen sie eine gewisse Karies protektive Wirkung. Diese Wirkung bleibt auch nach Aushärtung des Materials noch bestehen. Der Werkstoff ist zudem biokompatibel und die Werkstoffeigenschaften werden durch die antibakterielle Substanz nicht modifiziert.

Ein wesentlicher Nachteil der Glasionomerzemente besteht jedoch darin, dass sie aufgrund ihrer Werkstoffeigenschaften nicht in kaubelasteten Regionen eingesetzt werden können (Zimmermann et al., 1984; Smales et al., 2000; Itota et al., 2002; Dionysopoulos et al., 2003; Rodrigues et al., 2005).

Weiterhin hat sich der Einsatz antiseptischer Mundspüllösungen wie z.B. Chlorhexidin, Spüllösungen auf Basis von Octenidin oder Amin-/Zinnfluoridhaltige Mundspüllösungen zur Prävention oraler Infektionen als effektive Maßnahme erwiesen.

In einer Pilotstudie von Frencken et al. wurde der antibakterielle Effekt von mit Chlorhexidin angereichertem Glasionomerzement im Vergleich zu konventionellem Glasionomerzement getestet. Es stellte sich heraus, dass der mit Chlorhexidin angereicherte Glasionomerzement einen stärkeren Effekt in Bezug auf die Reduktion von Mikroorganismen hat als herkömmlicher Glasionomerzement (Frencken et al., 2007; Triolo, 2011).

Analog dazu konnte auch eine antibakterielle Wirkung von Kompositen in Kombination mit Chlorhexidin nachgewiesen werden (Jedrychowski et al., 1983; Leung et al., 2005).

Jedoch hält dieser anfangs starke antibakterielle Effekt nicht sehr lange an, ein Nachteil, der sich aus der Freisetzung des antibakteriellen Zusatzes ergibt (Ribeiro et al., 1991).

Ein weiteres Problem, welches durch die Zugabe des antibakteriellen Agens Chlorhexidin entsteht, ist die negative Beeinträchtigung der mechanischen Eigenschaften des dentalen Werkstoffes (Addy et al., 1981).

Daneben kommen auch Antibiotika wie Vancomycin oder Metronidazol als antimikrobielle Zusätze in Frage. Aber auch hier kommt es zur Beeinträchtigung der Werkstoffeigenschaften und einer nur kurzen und begrenzten antimikrobiellen Wirkung (Kudou et al., 2000; Pinheiro et al., 2005).

Imazato et al. (1995) beschäftigten sich in ihren Studien mit einem neuen, antibakteriell wirkenden Monomer, MDPB (12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromid). Dabei handelt es sich um ein polymerisierbares Bakterizid, welches einem Komposit zugesetzt wird. MDPB kam bereits erfolgreich in einem Adhäsivsystem zum Einsatz. Die Wirkung beruht auf einer sogenannten Kontaktinhibition, durch welche das Wachstum von Bakterien behindert wird. Die positiv geladenen Pyridiniumgruppen des MDPB-Monomers lagern sich an die negativ geladenen Bakterienzellwände an. Dadurch kommt es zu einem Ungleichgewicht der elektrischen Ladungen, was eine Zerstörung der Zellwand und somit eine Bakteriolyse zur Folge hat. Es ist jedoch notwendig noch weitere Untersuchungen durchzuführen, um das Monomer effektiv einzusetzen (Izutani et al., 2011; Imazato et al., 1994; Imazato et al., 1995; Imazato et al., 2003; Imazato et al., 2009; Ebi et al., 2001).

Izutani et al. (2011) konnten ebenfalls eine starke antibakterielle Wirkung des Monomers MDPB auf die Lebensfähigkeit und den Stoffwechsel von *Streptococcus mutans* feststellen. Das antibakterielle Monomer MDPB wirkt im unpolymerisierten Zustand stark bakterizid. Die Autoren dieser Studie konnten nachweisen, dass niedrige Konzentrationen von MDPB einen hemmenden Effekt auf die Stoffwechselfunktion von *Streptococcus mutans* ausüben. Hochkonzentriertes MDPB hingegen hat die Fähigkeit, innerhalb von kürzester Dauer *Streptococcus mutans* sowohl in planktonischer Form als auch im Biofilm abzutöten.

Giammanco et al. (2009) kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Ziel ihrer Studie war es den antibakteriellen Effekt eines MDPB-haltigen Schmelz-/Dentinadhäsivs in Bezug auf *Enterococcus faecalis* zu testen. Auch sie konnten einen starken antibakteriellen Effekt, der auf Kontak-

tinhibition beruht, aufzeigen. In einer weiteren In-vitro-Untersuchung von Thome et al. (2009) galt es herauszufinden, ob es durch die Anwendung von einem MDPB haltigen Komposit zu einer Beeinträchtigung künstlich hergestellter kariöser Läsionen kommt. Verglichen wurden unter anderem ein MDPB-haltiges Komposit und ein konventionelles Komposit in Kombination mit einem MDPB-haltigen und MDPB-freien Adhäsivsystem, sowie ein Glasionomerzement. Das MDPB-haltige Komposit hemmte signifikant die Progression der kariösen Läsionen verglichen mit dem konventionellen Komposit unabhängig vom verwendeten Adhäsivsystem. Vergleichbare Daten zeigten sich bei dem verwendeten Glasionomerzement. Dennoch ist das MDPB-haltige Komposit in seinen mechanischen Eigenschaften und seiner antibakteriellen Wirkung dem Glasionomerzement überlegen.

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass durch den Zusatz von Metallionen gute Resultate bzgl. der antibakteriellen Aktivität erzielt werden konnten.

Yoshida et al. (1999) untersuchten in vitro Komposite, denen sie die silberhaltigen Materialien Novaron und Amenitop zusetzten, auf ihre antibakteriellen Eigenschaften, mechanischen Eigenschaften und die Abgabe von Silberionen. Beide Materialien erwiesen sich als erfolgreich im Hinblick auf ihre antibakterielle Eigenschaft gegen *Streptococcus mutans*. Es konnte eine antibakterielle Wirksamkeit von bis zu 6 Monaten festgestellt werden. Weiterhin kam es zu einer nicht nennenswerten Freisetzung von Silberionen bei beiden Materialien. Die Werkstoffeigenschaften des amenitophaltigen Komposits erwiesen sich im Vergleich zu dem Kontrollkomposit und dem novaronhaltigen Komposit als deutlich schlechter. Hingegen waren bei dem Novaron haltigen Komposit keine signifikanten Veränderungen verglichen mit dem Kontrollkomposit zu beobachten.

Oppermann et al. (1980) kamen in ihrer In-vitro-Studie zu vergleichbaren Ergebnissen. Sie beschäftigten sich mit dem Effekt von fluor- und nicht fluorhaltigen Kupfer-, Silber- und Zinnsalzen auf den Säuregehalt in der dentalen Plaque. Für Silber- und Kupfersalze gab es keinen signifikanten Unterschied in ihrer hemmenden Wirkung bzgl. der Säureproduktion in der Plaque. Diese Salze erwiesen sich als deutlich effektiver als fluoridhaltige Zinnsalze oder Natriumfluorid. Bei allen getesteten Metallen wurde eine Anreicherung von Kationen in der Plaque beobachtet.

Yamamoto et al. (1996) konnten ebenfalls in vitro eine antibakterielle Wirkung gegen Streptokokken für den in Komposit enthaltenen Füller SiO_2 , angereichert mit Silberionen, nachweisen.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass der antibakterielle Effekt durch die Abgabe von Silberionen zustande kommt.

Silber wird bereits seit längerer Zeit als antimikrobielle Substanz in der Medizin eingesetzt. So werden z.B. Katheter und Kanülen damit ausgekleidet. Da es auch sehr effektiv gegen parodontale Bakterien und Streptokokken wirksam ist, lag es nahe, silberhaltige Zusätze in dentale Werkstoffe zu inkorporieren (Yoshida et al., 1999, Bürgers et al., 2009; Spacciapoli et al., 2001; Kassae et al., 2008).

Der Wirkmechanismus beruht auf der Absorption des Silbers durch Proteine und Polysaccharide der Bakterienzellen und der hohen Affinität, an deren DNA zu binden. Dies wiederum begünstigt eine Hemmung des Bakterienwachstums.

Leider ist auch hier dieser antibakterielle Effekt nur von kurzer Dauer (Modak et al., 1973; Fang et al., 2006; Yamamoto et al., 1996).

Als noch effektiver stellte sich der Einsatz von Nanopartikeln heraus.

So wurde z.B. gezeigt, dass ZnO-Nanopartikel ein breiteres und höheres Wirkspektrum als reguläres ZnO aufweisen (Jones et al., 2008; Sevinc et al., 2010; Zhou et al., 2008; Allaker, 2010). Hernandez et al. (2008) beschäftigten sich in einer In-vitro-Studie mit bakteriostatischen und bakteriziden Effekten von Silber-, Zinkoxid- und Goldnanopartikeln auf *Streptococcus mutans* Stämme. Sie konnten einen deutlich höheren antimikrobiellen Effekt von schon geringen Konzentrationen an Silbernanopartikeln im Vergleich zu den Zinkoxid- und Goldnanopartikeln nachweisen. Cheng et al. (2012) untersuchten ein experimentell hergestelltes Komposit angereichert mit Kalziumphosphatnanopartikeln und quaternärem Ammoniumdimethacrylat. Sie konnten gute antibakterielle Effekte erzielen. In einer weiterführenden Studie (Cheng et al., 2012) ergänzten sie das Komposit um eine weitere Komponente. Sie fügten Silbernanopartikel hinzu. Diese Kombination erwies sich als noch effektiver gegen *Streptococcus mutans*.

Da es sich bei vielen dieser Studien um In-vitro-Versuche handelt, sind noch weitere Untersuchungen durchzuführen, um diese Materialien adäquat unter In-vivo-Bedingungen einzusetzen.

Es lassen sich grundsätzlich zwei Werkstoffklassen unterscheiden. Zum einen gibt es Werkstoffe, in denen antimikrobielle Substanzen gebunden sind, und zum anderen Werkstoffe, die antimikrobielle Substanzen freisetzen. Dabei müssen sie gewissen Anforderungen, wie z.B. der Biokompatibilität bzw. Biotoleranz gerecht werden. Dies bedeutet, dass die zum Einsatz

kommenden Werkstoffe und Substanzen für ihre Verweildauer im Körper, die unter Umständen Monate oder auch sogar Jahre beträgt, keinen negativen Einfluß auf den Organismus ausüben dürfen. Im Rahmen ihrer Einsatzzeit *in vivo* kommt es zu keiner Zersetzung, Zellveränderung oder toxischen Wirkung. Weiterhin sollten die Wirkkomponenten die mechanischen Eigenschaften des Werkstoffes nicht negativ beeinflussen. Wichtig ist außerdem, dass der Verbund zur Zahnhartsubstanz nicht beeinträchtigt wird. Wünschenswert wäre auch eine dauerhafte Wirkung der antimikrobiellen Komponente.

Insgesamt betrachtet zeigt die überwiegende Anzahl der zu diesem Thema durchgeführten Untersuchungen nur eine Testung von antibakteriellen Substanzen *in vitro*. Daraus lässt sich jedoch nicht automatisch auf gleiche oder vergleichbare Ergebnisse unter *In-vivo*-Bedingungen schlussfolgern. Bei bisherigen *In-vitro*-Studien (Jedrychowski et al., 1983; Leung et al., 2005; Ribeiro, 1991; Takahashi, 2006; Sevinc et al., 2010; Kassae et al., 2008; Imazato et al., 2003) wurden die Prüfkörper mit häufig vorkommenden Bakterienstämmen der Mundhöhle, Speichelproben von Probanden oder auch nur einer ausgewählten Bakterienart der Mundflora konfrontiert. Jedoch ist unter solchen Bedingungen fraglich, in wie fern beispielsweise Enzyme des Speichels *in vivo* einen Einfluß ausüben oder ob sich die Bakterienstämme unter oralen Bedingungen anders verhalten als *in vitro*.

In-vivo-Studien zur Auswirkung von antibakteriellen Agenzien auf den dentalen Biofilm wurde bislang nur selten durchgeführt und haben meist den Charakter von Pilotstudien (Frencken et al., 2007 ; Beyth et al., 2010).

2.2 Ziel der Arbeit

Aus zahnmedizinischer Sicht stellen mikrobielle Biofilme die Hauptursache für die Entstehung von Karies und Parodontitis dar. Da sie auch die Oberflächen von dentalen Restaurationsmaterialien besiedeln, besteht ein großes Interesse an der Erforschung von effizienten Mitteln bzw. Materialien, die zu einer Zerstörung oder idealerweise sogar einer Vermeidung von Biofilmen beitragen.

Ziel unserer Arbeit war es, herauszufinden ob eine Beeinflussung der Biofilmbildung auf Kompositen, angereichert mit dem antibakteriellen Wirkstoff Octenidindihydrochlorid stattfindet.

Um die Wirkung des Bakterizids Octenidindihydrochlorid unter Realbedingungen zu testen, wurde diese Untersuchung durchgeführt. Hier kamen, im Gegensatz zu den In-vitro-Untersuchungen, zusätzliche Einflussfaktoren wie die Inhaltsstoffe des Speichel, die Temperatur der Mundhöhle und die Biofilmbildung unter Mundhöhlenbedingungen hinzu. Die Beurteilung des Ausmaßes der Biofilmbildung fand in dieser Studie mittels rasterelektronenmikroskopischer Auswertung statt. Um den Anteil der lebenden und toten Mikroorganismen zu analysieren, wurde die Fluoreszenzmikroskopie angewendet (Hannig et al., 2007; Hannig et al., 2009).

3 Material und Methode

3.1 Probanden

An der vorliegenden Studie nahmen 6 gesunde Probanden im Alter von 25 bis 40 Jahren teil.

Die Einwilligung zu der Studie erfolgte schriftlich. Das positive Votum der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes lag vor (Kenn-Nr. 193/08).

Die Probanden wurden hinsichtlich ihrer oralen Gesundheit inspiziert, um parodontale Erkrankungen und unversorgte kariöse Läsionen auszuschließen. Als Einschlußkriterium war eine volle Bezahnung Voraussetzung. Die Mundschleimhäute aller Probanden wiesen bei der intraoralen Inspektion keine Auffälligkeiten auf.

Als Ausschlußkriterium galt eine Antibiotikatherapie in einem Intervall von 6 Monaten vor Versuchsdurchführung, da diese einen Einfluß auf die Biofilmbildung ausüben kann. Eine Schwangerschaft stellte ebenfalls ein Ausschlußkriterium dar. Die Probanden waren alle Nichtraucher. Die Erhebung einer allgemeinen und speziellen Anamnese ergab keine Medikamenteneinnahme, sowie keine Erkrankungen der Speicheldrüsen. Während der Studie sollten die Probanden auf den Gebrauch antibakterieller Mundspüllösungen verzichten.

Von allen Probanden wurden Alginatabformungen (Blueprint cremix®, Dentsply Detrey, Konstanz, Deutschland) des Oberkiefers angefertigt und Gipsmodelle hergestellt. Auf diesen Modellen wurde für jeden Probanden eine individuelle Oberkiefertrageschiene, die die Prämolaren- und Molarenregion umfasste, im Tiefziehverfahren aus Polyether-Kunststoff angefertigt (Thermoforming foils®, Erkodent, Pfalzgrafeweiler, Deutschland).

Es wurden bukkal im Bereich der Prämolaren und Molaren gleichzeitig jeweils bis zu vier Prüfkörper pro Seite montiert. Zur sicheren Befestigung der Prüfkörper dienten mehrere Retentionsbohrungen in den entsprechenden Regionen. Durch die Trageschienen konnte eine definierte reproduzierbare Exposition der Prüfkörper in der Mundhöhle gewährleistet werden.

Die Fixierung und Montierung der Prüfkörper erfolgte mit einer additionsvernetzenden Silikonmasse (President light body®, Coltene, Altstaetten, Schweiz) unmittelbar vor der Inkorporation (Hannig, 1999). Die Prüfkörper wurden vollständig in die Silikonmasse eingebettet, lediglich die der Mundhöhle zugewandte Seite blieb unbedeckt.

3.2 Experimentelles Komposit

Als experimentelles Testmaterial dienten von der Firma Heraeus Kulzer hergestellte Prüfkörper aus einer auf dem Markt zugelassenen lichthärtenden Kompositmasse (Venus, Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland; Tab. 1), der Octenidindihydrochlorid (N,N'-(1,10 decandiyldi-1[4H]-pyridinyl-4-yliden) bis-(1-octanamin) dihydrochlorid), (ODH, C₃₆H₆₂N₄*2HCl, molare Masse : 623.83 g/mol; Abb. 1) in den Konzentrationen von 3 Gew.-% und 6 Gew.-% zugesetzt wurde.

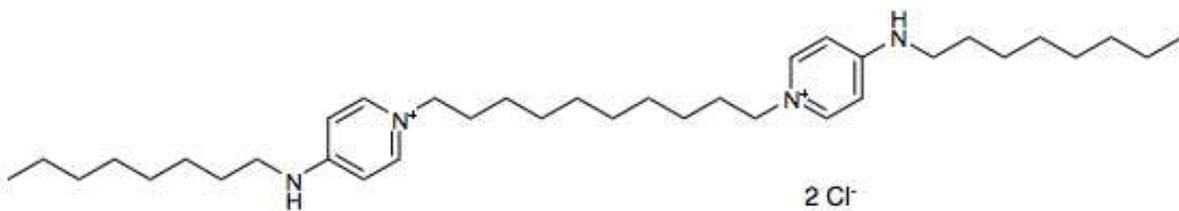


Abbildung 1: Strukturformel von Octenidindihydrochlorid

Die Monomere Bis-GMA (Bisphenol-A-Glycidylmethacrylat) und TEGDMA (Triethylenglycol-Dimethacrylat) wurden in einem Verhältnis von 70:30 gemischt und die entsprechende Menge an Octenidindihydrochlorid dazu gegeben. Das Gemisch wurde unter ständigem Rühren, um eine komplette Lösung des Octenidindihydrochlorids zu gewährleisten, auf 70°C erhitzt. Danach erfolgte die Zugabe von Photoinitiatoren und Stabilisatoren. Bei gleichbleibender Temperatur wurden dann 75g anorganische Füllstoffe (Bariumglas: mittlere Partikelgröße von D₅₀=0,7 µm und SiO₂: D₅₀=0,04 µm) in kleinen Portionen zu je 25g beige-mischt. Das experimentelle Komposit wurde in Formen gegossen (50 x 50 x 1,5 mm), auf

Raumtemperatur abgekühlt und von beiden Seiten für jeweils 8 Minuten mit einem Palatray Lichthärtegerät (Heraeus, Hanau, Deutschland) lichtgehärtet (siehe Tab. 1).

Aus den so entstandenen Plättchen wurden Prüfkörper in einer Dimensionierung von 5 x 5 x 1,5 mm angefertigt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Kompositprüfkörper laut Herstellerangaben (Venus, Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland)

Prüfkörper	Antiseptischer Zusatz ODH [wt. %]	Aufbau der Matrix	Füllkörper
Kontrollprüfkörper (Venus®)	0	Monomere: Bis-GMA, TEGDMA	Ba-Al-B-Si Glas ($D_{50}=0,7 \mu\text{m}$; $D_{\text{max}} < 2.0 \mu\text{m}$)
Venus® mit 3% antiseptischem Zusatz	3	Initiatoren: Campherchino- ne Stabilisatoren Pigmente	SiO ₂ (range: 0.01-0.07 μm ; $D_{50}=0.04 \mu\text{m}$). Füllkörpergehalt: 78 wt. % (60 vol.%)
Venus® mit 6% antiseptischem Zusatz	6		

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden je 96 Prüfkörper mit dem antiseptisch wirkenden Zusatz in Konzentrationen von 3% bzw. 6%, sowie als Kontrollmaterial 96 Prüfkörper ohne antiseptischen Zusatz zur Verfügung gestellt. Da untersucht werden sollte, ob die Oberflächenrauigkeit des Komposits einen Einfluß auf die Biofilmbildung hat, wurde die Hälfte der zu Verfügung gestellten Prüfkörper poliert. Um eine Standardisierung der Prüfkörperoberfläche zu erreichen, erfolgte eine Politur auf einem Naßschleifgerät (Gripo 2V, Metkon Instruments Ltd., Bursa, Turkey) mit Silikonkarborundschleifpapier (SIC grinding paper, buehler-met, 40599 Düsseldorf) mit einer Körnung bis zu 2500, was einer Hochglanzpolitur ent-

spricht. Die unpolierten Prüfkörper wurden nach ihrer Herstellung durch Heraeus Kulzer nicht weiterbearbeitet.

Weiterhin wurde jeweils die Hälfte der polierten und unpolierten Prüfkörper vor der intraoralen Exposition einem künstlichen Alterungsprozeß unterzogen, um den Einfluß von Alterung und Auslaugungsphänomenen auf die In-situ-Biofilmbildung zu untersuchen.

Um eine künstliche Alterung zu provozieren, wurden die Prüfkörper einer Temperaturwechselbelastung in einem Thermocycler unterzogen (2500 Zyklen, 5° und 55° mit Haltezeiten von jeweils 30s in destilliertem Wasser) (Willytec Thermocycler V 2.8, Fa. Willytec GmbH, 82166 Gräfelfing).

Vor der intraoralen Exposition wurden die Prüfkörper für 30 Minuten in 70%igem Alkohol gereinigt, danach mit destilliertem Wasser abgespült, und es erfolgte nach kurzer Trocknung die Fixation und Montierung an den entsprechenden Tragevorrichtungen der Oberkiefertrageschienen.

Zu Vergleichszwecken wurden Prüfkörper, die nicht von den Probanden getragen wurden, mit und ohne antibakteriellen Zusatz untersucht.

3.3 In-situ-Biofilmbildung

Die Prüfkörper wurden über einen Zeitraum von 3 und 7 Tagen intraoral exponiert. Während der Tragezeiten wurden die Trageschienen zur Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme, mit Ausnahme von Wasser, sowie zur individuellen Zahnreinigung entnommen und in einer feuchten Kammer gelagert. Die Schienen wurden keiner Reinigung unterzogen, lediglich kurz unter Wasser abgespült. Nach Abschluß der In-situ-Exposition wurden die Schienen, für 10 s mit 0,9% iger Kochsalzlösung (0,9% NaCl), abgespült. Die Prüfkörper wurden aus den Schienen entnommen und es schloß sich die Biofilmanalyse im Labor an. Die Bestückung der Trageschienen erfolgte im Rahmen der In-situ-Untersuchung derart, dass pro Versuchsreihe die “ polierten“, “ unpolierten “ , “ künstlich gealterten“ und “ungealterten“ Prüfkörper gleichzeitig intraoral exponiert wurden. Jedoch wurden die Prüfkörper mit bzw. ohne antiseptischem Zusatz in separaten Versuchsreihen von den Probanden getragen.

3.4 Analyse der bakteriellen Adhärenz und Biofilmbildung

Nach 3- bzw. 7-tägiger intraoraler Expositionszeit wurden die Prüfkörper aus den Trageschienen entnommen.

Nach einer jeweils entsprechenden Weiterverarbeitung der Prüfkörper im Labor wurden diese bezüglich des in-situ gebildeten Biofilms rasterelektronenmikroskopisch und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

3.5 Vorbereitung der Prüfkörper für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Nach Entnahme der Prüfkörper wurden diese für 2 Stunden in 2,5%igem Glutaraldehyd bei 4°C fixiert. Sofort im Anschluß erfolgte eine 5malige Spülung für jeweils 10 Minuten in PBS (Phosphat buffered saline; PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT) und eine 10 minütige Spülung in Aqua dest. (B. Braun Melsungen AG, 34209 Melsungen), um eine vollständige Entfernung des Glutaraldehyds zu gewährleisten. Danach wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe von 50% bis 90% für jeweils 10 Minuten entwässert. Die Entwässerung in 100%igem Ethanol wurde zweimal für jeweils 15 Minuten durchgeführt, wobei der letzte Schritt bei verschlossenem Gefäß vollzogen wurde. Abschließend wurden die Proben für 30 Minuten in 1,1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan (HMDS, Acros Organics, USA) getrocknet. Nach einer weiteren Lagerung der Proben für 12 h unter dem Abzug, wurden diese mittels doppelseitiger Klebefolie (Plano, Wetzlar) auf REM-Probenteller fixiert und mit Gold/ Palladium gesputtert (20 nm, Edwards Sputter Coater S150B; Edwards Ltd., GB). Für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Biofilme wurde ein Fei XL30 ESEM FEG Rasterelektronenmikroskop genutzt (Fei Company, Eindhoven, NL). Jeder Prüfkörper wurde in vier Vergrößerungsstufen (500-, 1600-, 5000- und 20 000-fach) beurteilt. Mittels der rasterelektronenmikroskopischen Analyse kann eine Aussage über das Ausmaß der in-situ-Biofilmbildung auf den Prüfkörperoberflächen getroffen werden.

Um eine quantitative Bewertung des Biofilms vornehmen zu können, wurde ein Scoring, welches 10 Stufen beinhaltet, entwickelt. Anhand dessen läßt sich jeder Prüfkörper nach bakterieller Besiedlungsdichte und Struktur des Biofilms einordnen (siehe Tab. 2).

Tabelle 2a: Scoring zur Bewertung des Ausmaßes der Biofilmbildung basierend auf den rasterelektronenmikroskopischen Analysen

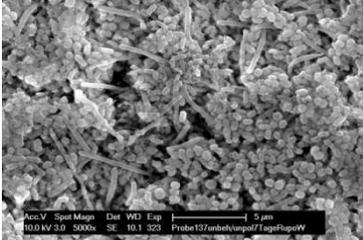
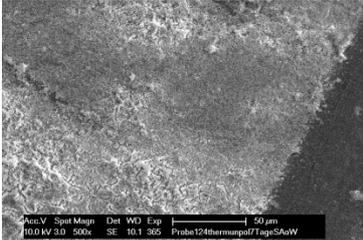
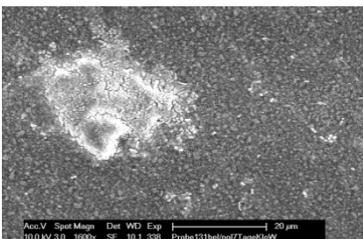
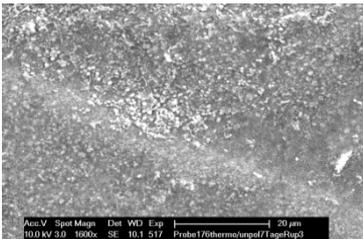
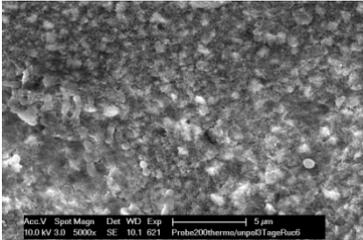
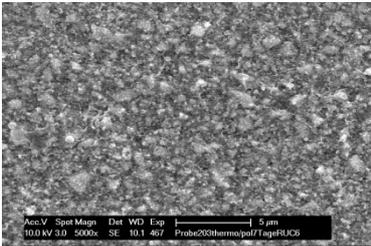
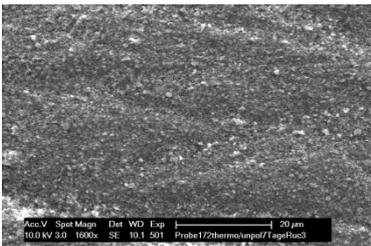
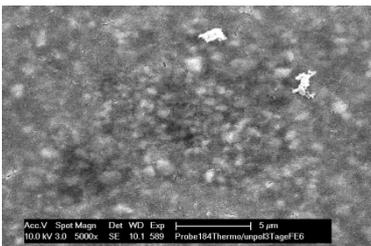
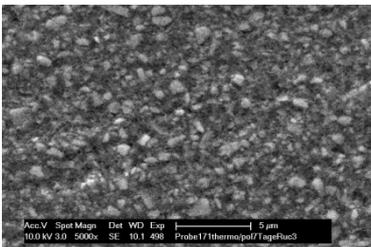
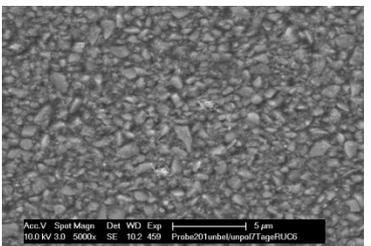
Score	Beschreibung
10	 <p>Etablierter mehrschichtiger Biofilm bedeckt Oberfläche vollständig, ausgeprägte Biofilmstruktur, mikrobielle Besiedelung des Biofilms > 90 %</p> <p>Prüfkörper in 5000-facher Vergrößerung</p>
9	 <p>Etablierter Biofilm mit Bedeckung der Oberfläche > 50 % , mikrobielle Besiedelung des Biofilms > 90 %</p> <p>Prüfkörper in 500-facher Vergrößerung</p>
8	 <p>Etablierter Biofilm mit Bedeckung der Oberfläche < 50 %</p> <p>Prüfkörper in 1600-facher Vergrößerung</p>
7	 <p>Kolonien mit Biofilmarchitektur , hoher Anteil Mikroorganismen</p> <p>Prüfkörper in 1600-facher Vergrößerung</p>
6	 <p>Biofilmstruktur aufgelockert, reduzierter Anteil Mikroorganismen</p> <p>Prüfkörper in 5000-facher Vergrößerung</p>

Tabelle 2b:

<p>5</p>		<p>Biofilmstruktur aufgelockert, Kompositfüllkörper erkennbar, verteilte Mikroorganismen</p>
<p>4</p>		<p>Biofilmstruktur aufgelockert, Füllkörper auf mehr als 50 % der Oberfläche sichtbar, verteilte Mikroorganismen</p>
<p>3</p>		<p>dichte Pellikelschicht, kaum mikrobielle Besiedlung</p>
<p>2</p>		<p>homogene Pellikelschicht, Kompositoberfläche erscheint glatt, Füllkörper und Matrix deutlich differenzierbar</p>
<p>1</p>		<p>aufgelockerte Pellikelschicht, deutlich erkennbare Kompositoberfläche</p>

3.6 Vorbereitung der Prüfkörper für die Fluoreszenzmikroskopie / Live-dead-staining

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Biofilme wurde für die Kompositproben mit 3% und 6% antiseptisch wirkendem Zusatz sowie für die Kontrollproben ohne Zusatz durchgeführt.

Nach Entnahme der Prüfkörper, wurden diese in 0,9% NaCl gepuffert. Es schloß sich eine unmittelbare Weiterbearbeitung an, um eine Verschiebung des Verhältnisses von lebenden zu toten Zellen zu vermeiden. Die Biofilme wurden mit Hilfe eines „live-dead staining“ Kits (BacLight® Bacterial Viability Kit L7012, Molecular Probes, Carlsbad, USA) gefärbt, welches zwei Nukleinsäurefarben verwendet, den grün fluoreszierenden SYTO 9 Farbstoff und das rot fluoreszierende Propidiumiodid. Je 1µl der Komponenten des Kits, SYTO 9 Farbstoff und Propidiumiodid, wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und zu 1ml physiologischer Kochsalzlösung hinzugefügt. Die Prüfkörper wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten gelegt und jedes Nöpfchen mit 100µl der hergestellten Lösung befüllt. Es schloß sich eine 15 minütige Inkubation bei Raumtemperatur und in völliger Dunkelheit an. Danach wurde jeder Prüfkörper auf einem Objektträger platziert, mit Fixierlösung bedeckt und bei 4°C bis zur Auswertung gelagert. Die SYTO 9 Färbelösung färbt alle, sowohl tote als auch lebende Bakterien grün. Propidiumiodid hingegen penetriert nur Bakterien mit beschädigter Zellmembran. Befinden sich nun beide Farbstoffe in einer Bakterienzelle, so verursacht Propidiumiodid eine Reduktion der SYTO 9 Fluoreszenz. Folglich werden Bakterien mit intakter Zellmembran grün, zerstörte Bakterien rot fluoreszierend dargestellt. Das Emissionsmaximum von SYTO 9 liegt bei etwa 500 nm bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm. Propidiumiodid hat sein Emissionsmaximum bei 490 nm und emittiert Licht der Wellenlänge von 635 nm.

Die Beurteilung der Proben fand mit einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (Axio Skop, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) in Kombination mit der Bildverarbeitungssoftware Axio Vision 4.8 (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland) bei 1000-facher Vergrößerung statt.

Durch die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung ist die Möglichkeit gegeben, lebende und tote Mikroorganismen auf den Prüfkörpern zu identifizieren. Somit konnten Biofilme differenziert werden, die überwiegende Anteile lebender oder toter Mikroorganismen enthielten bzw. bei denen lebende und tote Organismen in gleichen Anteilen vorhanden waren (Decker, 2001).

3.7 Auswertung und statistische Verfahren

Im Rahmen der statistischen Auswertung dienten die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von insgesamt 144 Prüfkörpern, in den Vergrößerungen von 500-, 1600-, 5000- und 20 000-fach, als Grundlage, um die Wirksamkeit des antiseptischen Zusatzes Octenidindihydrochlorid zu evaluieren. Es nahmen 6 gesunde Probanden an der vorliegenden Studie teil. Von jedem Probanden standen Prüfkörper zur Verfügung, die die Parameter Antiseptikumskonzentrationen von 0%, 3% und 6%, künstlich gealtert (TC), nicht gealtert (NTC), poliert (P) und nicht poliert (NP) nach 3- und 7-tägiger intraoraler Exposition erfüllten. Es entstanden 24 Untergruppen mit jeweils n=6 Prüfkörpern. Untersucht wurde primär der Einfluß der Konzentration des antiseptischen Agens auf die Biofilmbildung bei den einzelnen Probanden nach einer oralen Expositionsdauer von 3 und 7 Tagen. Weiterführend wurde ermittelt, ob künstliche Alterung und Politur die Biofilmbildung beeinträchtigen. Es wurden Mittelwert, Standardabweichung und 95% Konfidenzintervalle berechnet. Der Mann-Whitney-Test (U-Test) diente als statistischer Vergleich. Als Schwellenwert für einen statistisch signifikanten Unterschied wurde $p = 0,05$ festgelegt. Für multiple Vergleiche erfolgte eine Adjustierung des Schwellenwertes (Bonferroni). Die Bewertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgte deskriptiv.

4 Ergebnisse

4.1 Auswirkungen auf die Biofilmbildung

4.1.1. Einfluß der Konzentration des antiseptischen Agens Octenidindihydrochlorid auf die Biofilmbildung bei den einzelnen Probanden

Sowohl nach 3-tägiger als auch 7-tägiger intraoraler Exposition war bei 4 Probanden (A, B, D, E) eine geringere Biofilmbildung auf den Prüfkörpern mit dem antiseptischen Zusatz von 3% und 6% zu erkennen im Vergleich zu den Kontrollprüfkörpern ohne antiseptischen Zusatz (siehe Tab. 3).

Für Proband C ist nach 3-tägiger Expositionszeit kein Einfluß des antiseptischen Agens in den Konzentrationen von 3% und 6% auf die Biofilmbildung zu verzeichnen (siehe Tab. 3).

Nach 7-tägiger oraler Exposition ist lediglich bei der Wirkstoffkonzentration von 3% eine geringere Biofilmbildung zu beobachten. Für Proband C konnte aber keine eindeutige Wirkung des Antiseptikums Octenidindihydrochlorid auf die Biofilmbildung nachgewiesen werden (siehe Tab. 3).

Bei Proband F wurde die Biofilmbildung nach 3-tägiger Exposition nicht beeinflusst, nach 7 Tagen lediglich geringfügig im Vergleich zu den Kontrollproben (siehe Tab. 3).

In den Diagrammen 1 und 2 sind die Ergebnisse für die einzelnen Probanden grafisch dargestellt.

Tabelle 3: Übersicht über die Biofilmbildung der einzelnen Probanden (A bis F) nach 3- und 7-tägiger oraler Exposition für die Prüfkörper mit 0%, 3% und 6% des Antiseptikums Octenidindihydrochlorid (ODH). Angegeben sind die Mittelwerte (jeweils n= 4) und Standardabweichungen des Ausmaßes der Biofilmbildung nach Auswertung gemäß Tabelle 2 (Scores 1-10).

	3 Tage orale Exposition						7 Tage orale Exposition					
Proband	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F
ODH 0%	8,0	3,0	5,3	9,5	4,5	2,0	10,0	9,8	7,8	10,0	9,5	5,5
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	1,6	1,2	3,3	0,9	2,1	1,0	0,0	4,0	1,3	10,0	0,9	1,5
ODH 3%	4,0	1,5	6,7	5,8	2,8	2,5	3,3	4,0	5,5	9,0	5,3	3,8
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	2,4	0,5	1,7	0,8	1,5	0,9	1,3	1,6	1,7	1,2	2,1	0,4
ODH 6%	2,8	2,0	8,0	3,8	1,5	2,0	2,8	2,0	7,7	5,5	3,5	3,3
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,8	0,0	0,0	1,8	0,5	0,0	1,5	0,7	1,3	1,8	1,7	1,3

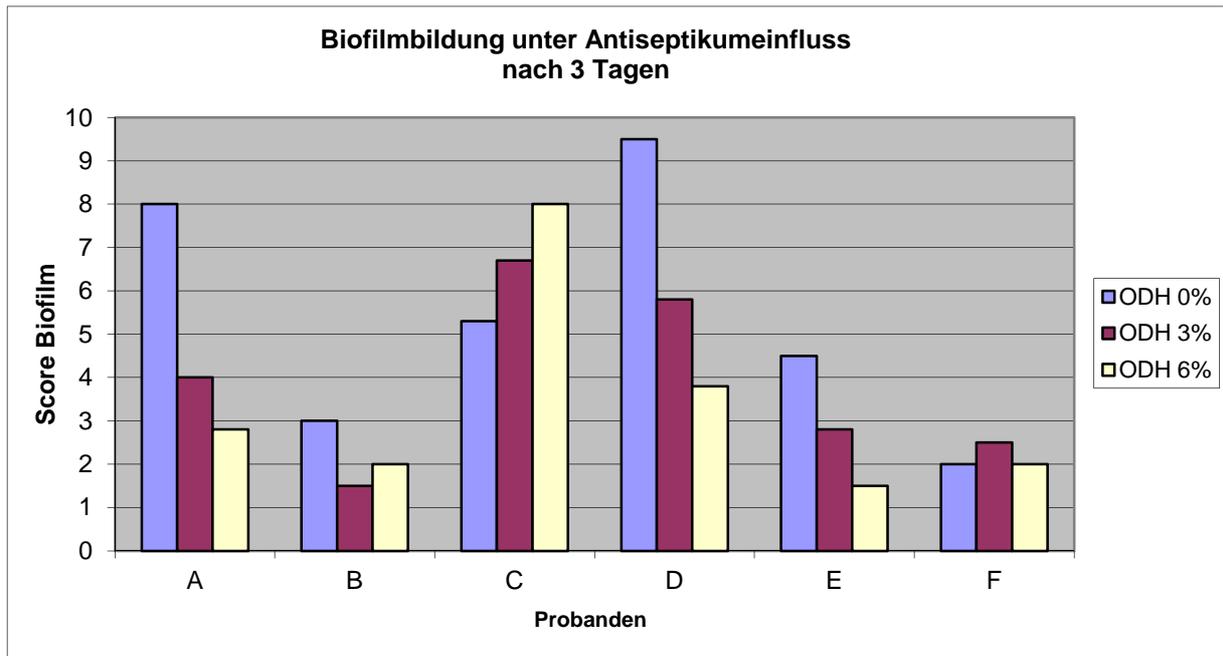


Diagramm 1: Grafische Darstellung der Biofilm-Scores für die Probanden A bis F nach 3-tägiger oraler Exposition in Abhängigkeit von der Konzentration des Antiseptikums ODH (0%, 3% und 6% Octenidindihydrochlorid).

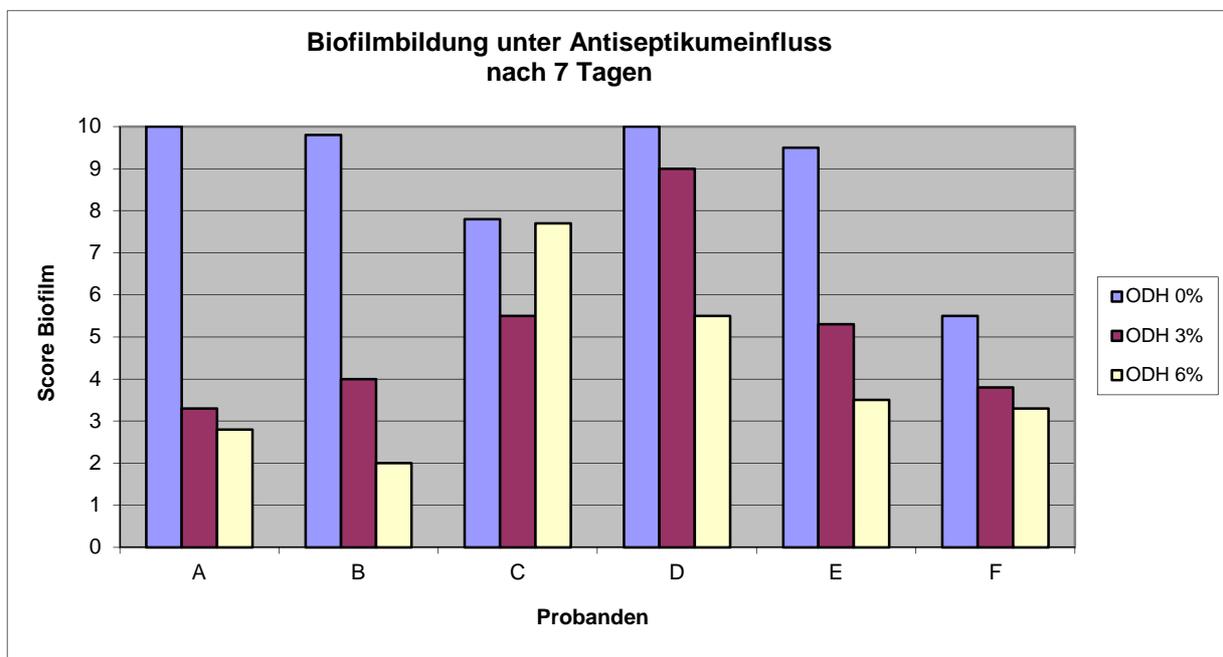


Diagramm 2: Grafische Darstellung der Biofilm-Scores für die Probanden A bis F nach 7-tägiger oraler Exposition in Abhängigkeit von der Konzentration des Antiseptikums ODH (0%, 3% und 6% Octenidindihydrochlorid).

4.1.2 Einfluß der Konzentration des antiseptischen Agenz auf die Biofilmbildung im Hinblick auf die Parameter gealtert (TC), nicht gealtert (NTC), poliert (P) und nicht poliert (NP)

Nach einer Mittelung über alle Probanden, wurde für die gealterten und nicht gealterten, polierten und unpolierten Prüfkörper eine Reduktion der Biofilmbildung sowohl nach 3-tägiger, als auch 7-tägiger oraler Exposition beobachtet.

Aus Tabelle 4 wird ersichtlich, dass mit steigender Konzentration des Antiseptikums Octenidindihydrochlorid eine stärkere Biofilmreduktion stattfindet.

In den Diagrammen 3 und 4 sind die Ergebnisse für die unterschiedlich bearbeiteten Prüfkörper grafisch dargestellt.

Tabelle 4: Übersicht über die Biofilmbildung der einzelnen Probanden (A bis F) nach 3- und 7-tägiger Expositionszeit für die Prüfkörper mit 0%, 3% und 6% des Antiseptikums Octenidindihydrochlorid (ODH). Angegeben sind die Mittelwerte (jeweils n=6) und Standardabweichungen des Ausmaßes der Biofilmbildung nach Auswertung gemäß Tabelle 2 (Scores 1 bis 10) auf gealterte (TC) und nicht gealterte (NTC), polierte (P) und unpolierte (NP) Prüfkörper.

Prüfkörper	3 Tage orale Exposition				7 Tage orale Exposition			
	TC-NP	TC - P	NTC-NP	NTC-P	TC-NP	TC - P	NTC-NP	NTC-P
ODH 0%	6,5 ± 3,7	6,2 ± 3,1	4,7 ± 3,4	4,2 ± 3,3	8,5 ± 2,1	9,0 ± 2,4	9,2 ± 1,3	8,3 ± 2,1
ODH 3%	5,2 ± 2,9	3,5 ± 2,3	3,4 ± 1,5	2,8 ± 2,1	4,8 ± 1,5	4,5 ± 3,6	5,7 ± 2,0	5,5 ± 2,8
ODH 6%	2,2 ± 1,1	3,3 ± 2,6	3,0 ± 1,7	2,0 ± 0,0	4,0 ± 2,7	2,7 ± 2,7	4,9 ± 2,1	4,4 ± 1,5

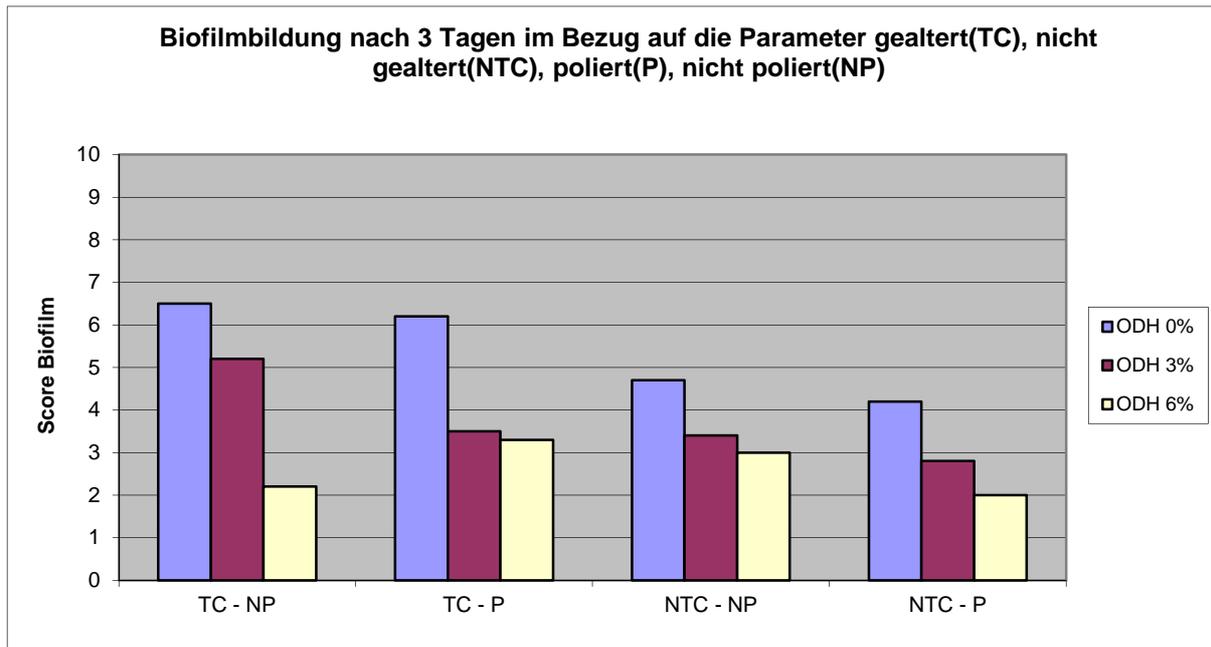


Diagramm 3: Grafische Darstellung der Biofilm-Scores für die einzelnen Prüfkörper nach 3-tägiger oraler Exposition in Abhängigkeit von den Parametern gealtert (TC), nicht gealtert (NTC), poliert (P) und nicht poliert (NP) in den Konzentrationen 0%, 3% und 6% des Antiseptikums Octenidindihydrochlorid.

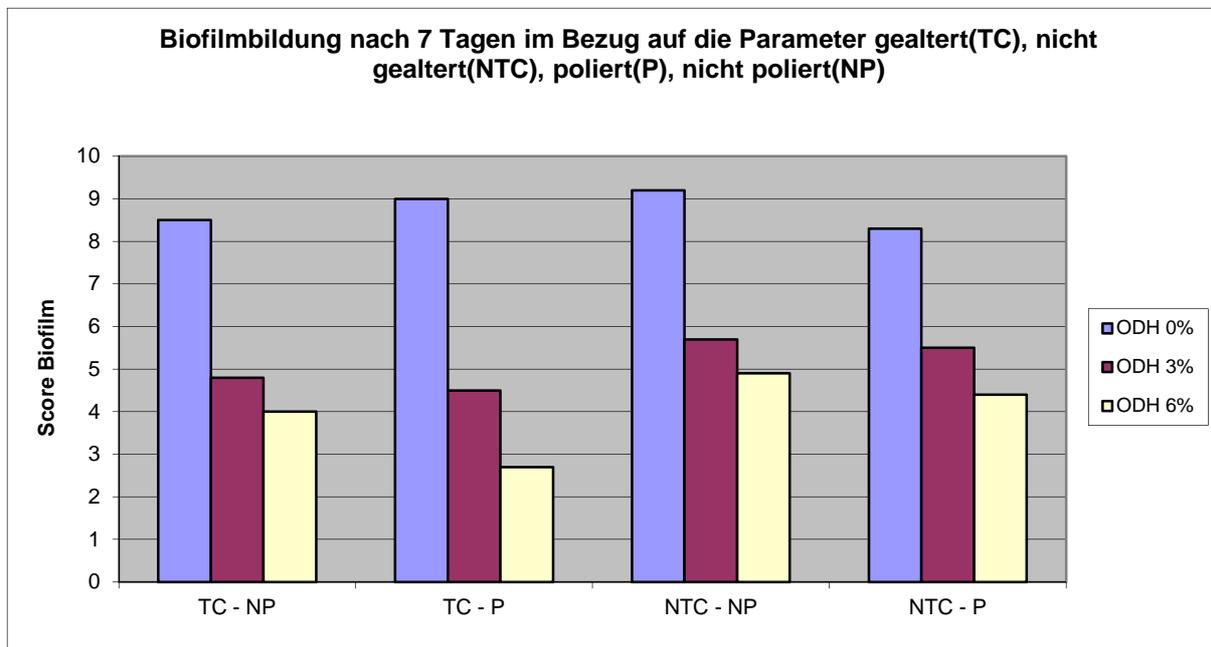


Diagramm 4: Grafische Darstellung der Biofilm-Scores für die einzelnen Prüfkörper nach 7-tägiger oraler Exposition in Abhängigkeit von den Parametern gealtert (TC), nicht gealtert (NTC), poliert (P) und nicht poliert (NP) in den Konzentrationen 0%, 3% und 6% des Antiseptikums Octenidindihydrochlorid.

4.1.3 Einfluß des antiseptischen Agens in 3%- und 6% -iger Konzentration auf die Biofilmbildung nach 3- und 7-tägiger oraler Exposition unabhängig von den Parametern Politur und künstlicher Alterung

Wie in Abbildung 2 grafisch dargestellt, zeigte sich nach einer 7-tägigen Expositionszeit eine im Mittel stärkere Biofilmbildung auf den Kontrollprüfkörpern ohne antiseptischen Wirkstoff, als auf den Prüfkörpern mit Antiseptikum ($p < 0,001$). Bei den Prüfkörpern mit 3% des Antiseptikums ließ sich sowohl nach 3- ($p = 0,001$) als auch nach 7- tägiger intraoraler Exposition eine signifikante Reduktion ($p < 0,001$) der Biofilmbildung, verglichen mit den Kontrollprüfkörpern ohne Zusatz, erkennen. Analog dazu war auch bei den Prüfkörpern mit 6% antiseptischem Wirkstoff nach 3 ($p < 0,001$) und 7 ($p < 0,001$) Tagen eine signifikante Reduktion zu verzeichnen. Vergleicht man die Prüfkörper mit 3% und 6% Antiseptikum, so ist nach 3 ($p = 0,06$) und 7 ($p = 0,02$) Tagen intraoraler Exposition nur ein tendenzieller Unterschied zu erkennen.

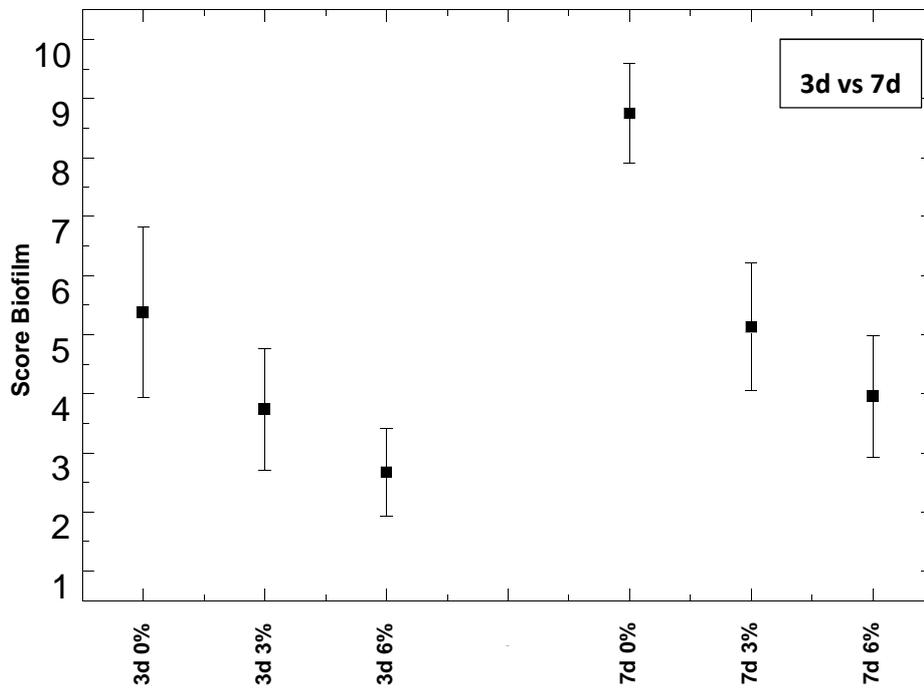


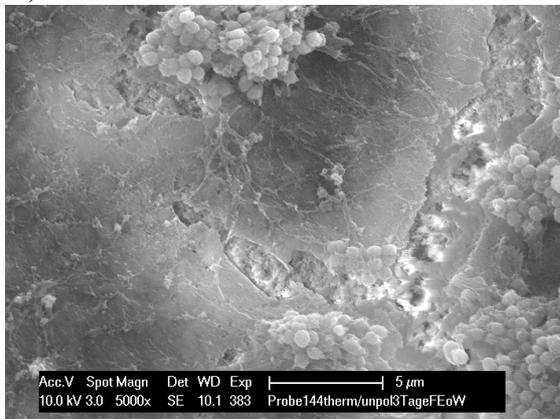
Abbildung 2: Grafische Darstellung der Wirkung des antiseptischen Zusatzes Octenidindihydrochlorid in den Konzentrationen von 3% und 6% auf die Biofilmbildung nach 3- und 7-tägiger intraoraler Expositionszeit, unabhängig von Politur und künstlicher Alterung. Jeder Mittelwert setzt sich aus 24 Einzelwerten zusammen. Die Fehlerbalken stellen ein Konfidenzintervall von 95% dar.

4.1.4 Beispiele der rasterelektronenmikroskopischen Analyse der Biofilmbildung

In den nachfolgenden Abbildungen sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen auf Kontrollprüfkörpern ohne Octenidindihydrochlorid und Prüfkörpern mit 3% und 6% des Antiseptikums in 5000-facher Vergrößerung von unterschiedlichen Probanden nach 3- und 7-tägiger intraoraler Exposition dargestellt.

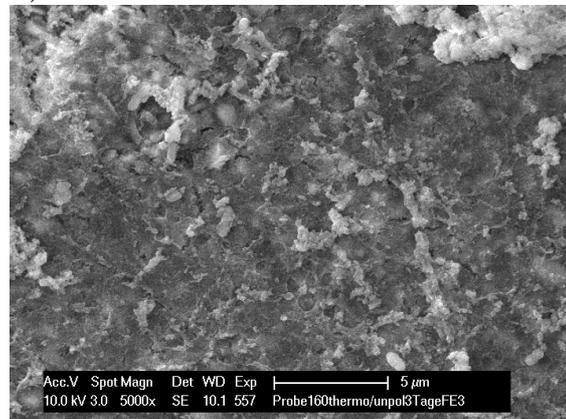
Prinzipiell zeigte sich mit steigender Konzentration des Octenidins eine deutliche Reduktion der Biofilmbildung, die jedoch für jeden Probanden ganz individuell ausfällt (Abb.3-7).

A)



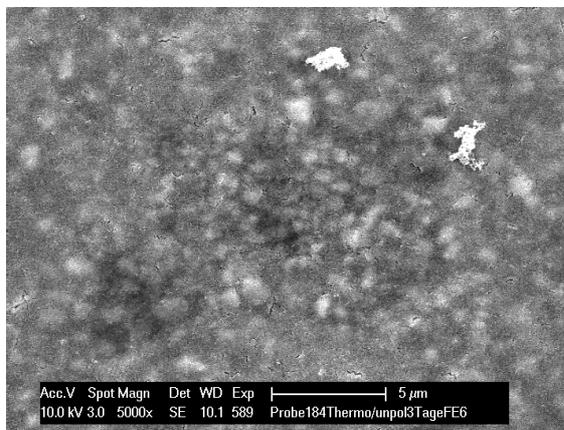
Prüfkörper ohne ODH in 5000-facher Vergrößerung
Biofilmbildung Score 10

B)



Prüfkörper mit 3% ODH in 5000-facher Vergrößerung
Biofilmbildung Score 5

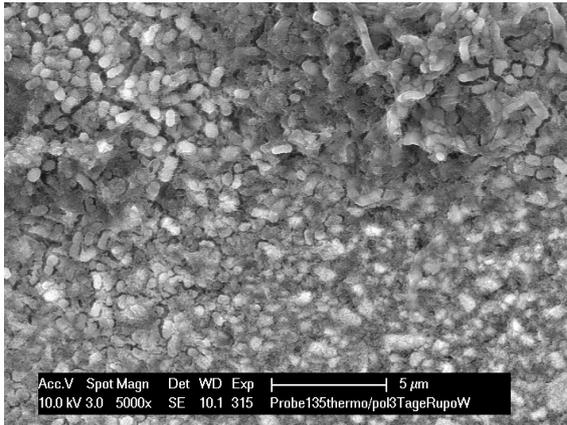
C)



Prüfkörper mit 6% ODH in 5000-facher Vergrößerung
Biofilmbildung Score 2

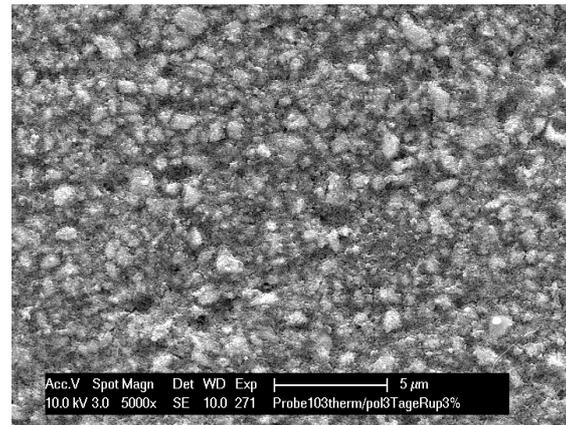
Abbildung 3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen nach 3-tägiger intraoraler Exposition auf thermisch belasteten unpolierten Prüfkörpern ohne das Antiseptikum Octenidindihydrochlorid (ODH), mit 3% des Antiseptikums und 6% des Antiseptikums in 5000-facher Vergrößerung nach Auswertung gemäß Tabelle 2 (Scores 1-10).

A)



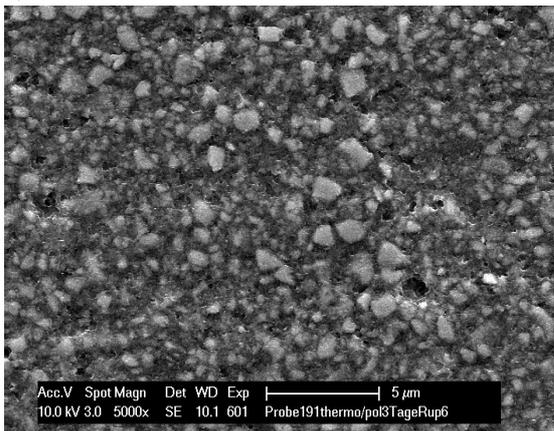
Prüfkörper ohne ODH in 5000-facher Vergrößerung
Biofilmbildung Score 6

B)



Prüfkörper mit 3% ODH in 5000-facher Vergrößerung
Biofilmbildung Score 2

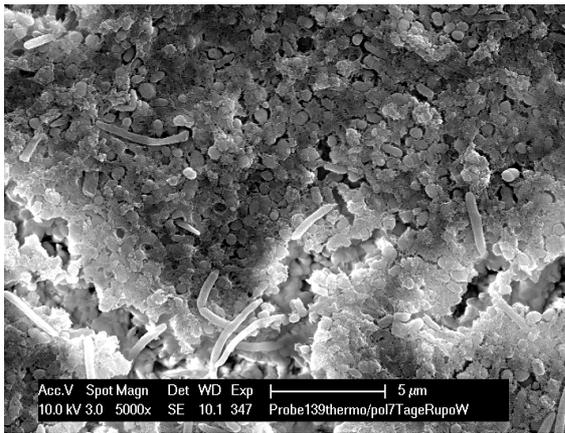
C)



Prüfkörper mit 6% ODH in 5000-facher Vergrößerung
Biofilmbildung Score 1

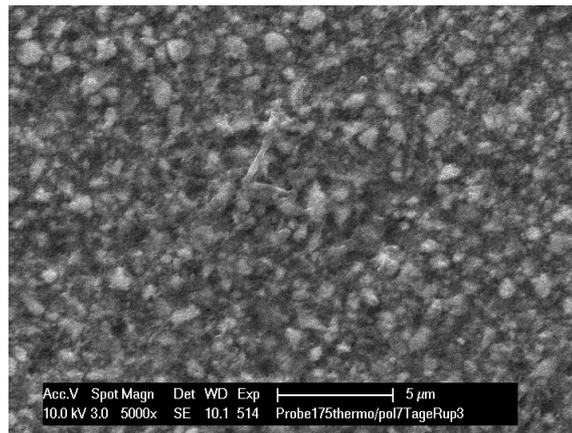
Abbildung 4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen nach 3-tägiger intra-oraler Exposition auf thermisch belasteten polierten Prüfkörpern ohne das Antiseptikum Octenidindihydrochlorid (ODH), mit 3% des Antiseptikums und 6% des Antiseptikums in 5000-facher Vergrößerung nach Auswertung gemäß Tabelle 2 (Scores 1-10).

A)



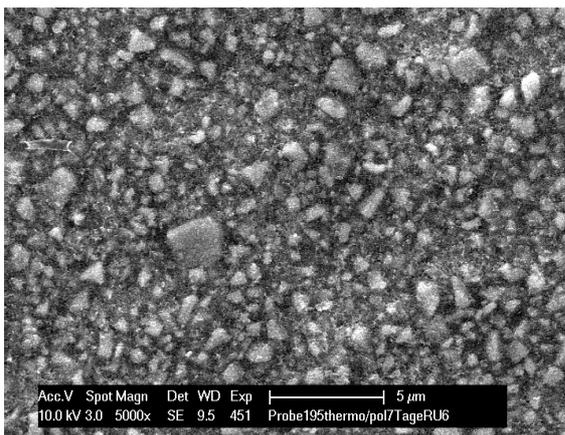
Prüfkörper ohne ODH in 5000-facher Vergrößerung
Biofilmbildung Score 10

B)



Prüfkörper mit 3% ODH in 5000-facher Vergrößerung
Biofilmbildung Score 2

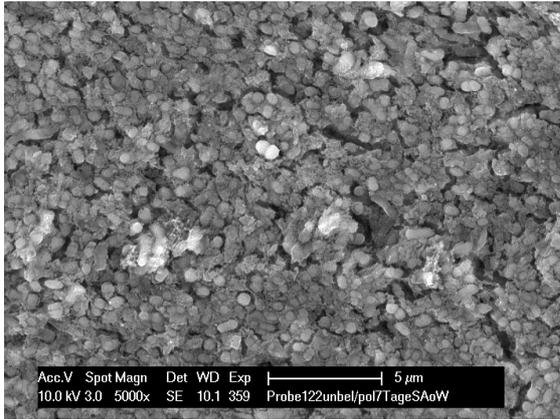
C)



Prüfkörper mit 6% ODH in 5000-facher Vergrößerung
Biofilmbildung Score 1

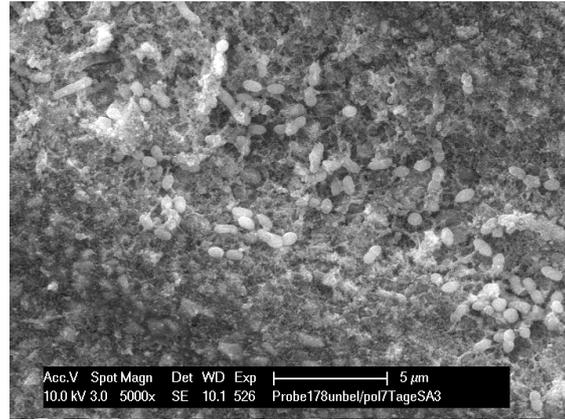
Abbildung 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen nach 7-tägiger intra-oraler Exposition auf thermisch belasteten polierten Prüfkörpern ohne das Antiseptikum Octenidindihydrochlorid (ODH), mit 3% des Antiseptikums und 6% des Antiseptikums in 5000-facher Vergrößerung nach Auswertung gemäß Tabelle 2 (Scores 1-10).

A)



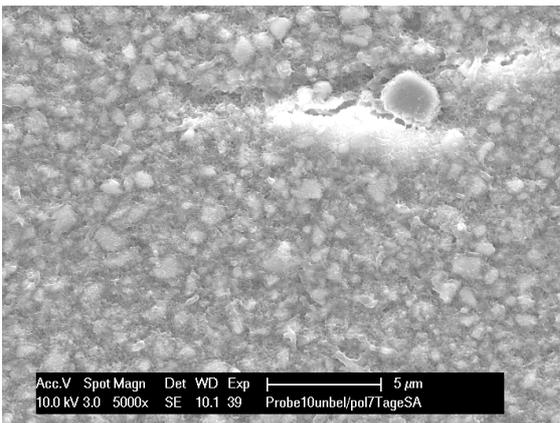
Prüfkörper ohne ODH in 5000-facher Vergrößerung
Biofilmbildung Score 10

B)



Prüfkörper mit 3% ODH in 5000-facher Vergrößerung
Biofilmbildung Score 6

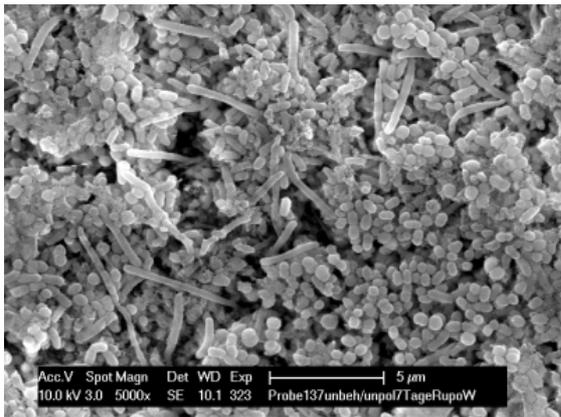
C)



Prüfkörper mit 6% ODH in 5000-facher Vergrößerung
Biofilmbildung Score 2

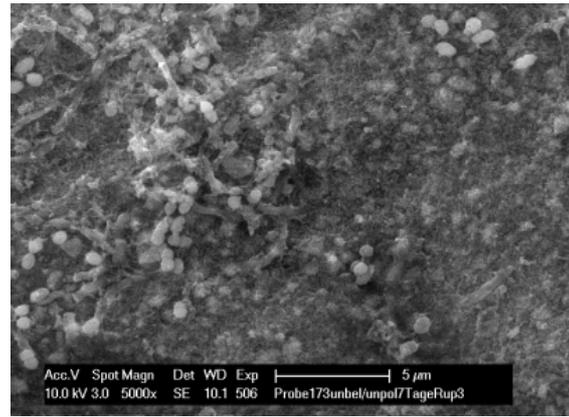
Abbildung 6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen nach 7-tägiger intraoraler Exposition auf thermisch unbelasteten polierten Prüfkörpern ohne das Antiseptikum Octenidindihydrochlorid (ODH), mit 3% des Antiseptikums und 6% des Antiseptikums in 5000-facher Vergrößerung nach Auswertung gemäß Tabelle 2 (Scores 1-10).

A)



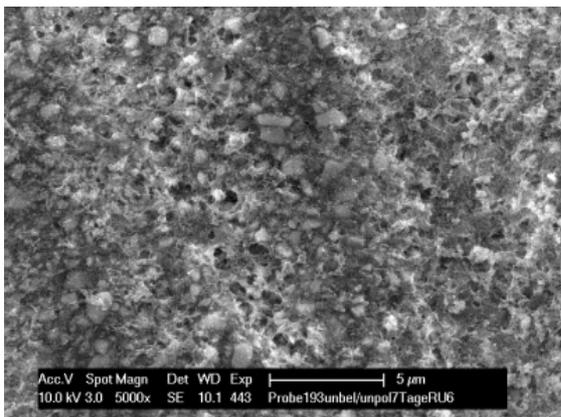
Prüfkörper ohne ODH in 5000-facher Vergrößerung
Biofilmbildung Score 10

B)



Prüfkörper mit 3% ODH in 5000-facher Vergrößerung
Biofilmbildung Score 6

C)



Prüfkörper mit 6% ODH in 5000-facher Vergrößerung
Biofilmbildung Score 3

Abbildung 7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen nach 7-tägiger intra-oraler Exposition auf thermisch unbelasteten polierten Prüfkörpern ohne das Antiseptikum Octenidindihydrochlorid (ODH), mit 3% des Antiseptikums und 6% des Antiseptikums in 5000-facher Vergrößerung nach Auswertung gemäß Tabelle 2 (Score 1-10).

4.1.5 Rasterelektronenmikroskopische Analyse von gealterten (TC) und nicht gealterten (NTC) Prüfkörpern, die nicht intraoral exponiert wurden

Bei der rasterelektronenmikroskopischen Analyse von gealterten und nicht gealterten Prüfkörpern ohne Octenidindihydrochlorid, mit 3% und mit 6% des Antiseptikums, die nicht intraoral exponiert wurden, konnten keine Auffälligkeiten in der Oberflächenstruktur bzgl. der Integrität des verwendeten Komposits festgestellt werden (Abb. 8).

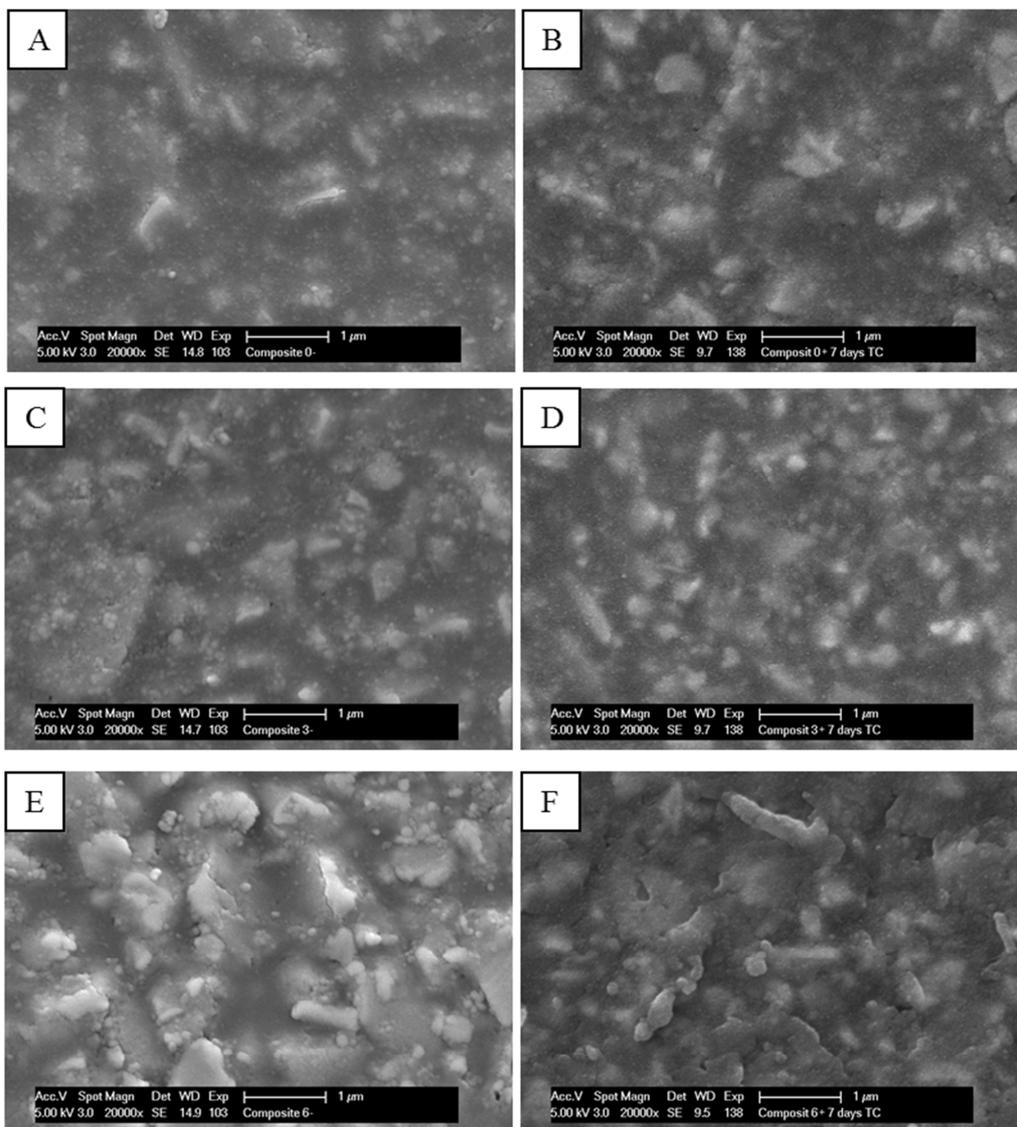


Abbildung 8: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von nicht gealterten (A, C, E) und durch 7-tägiges Thermocycling gealterten (B, D, F) Prüfkörpern mit 0% (A, B), 3% (C, D) und 6% (E, F) des Antiseptikums Octenidindihydrochlorid in 20 000-facher Vergrößerung.

4.1.6 Beispiele der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Biofilmbildung

Die rasterelektronenmikroskopischen Ergebnisse wurden durch die fluoreszenzmikroskopischen Analysen bestätigt.

Nachfolgend sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen in 1000-facher Vergrößerung auf Kontrollprüfkörpern ohne Octenidindihydrochlorid und Prüfkörpern mit 3% und 6% des Antiseptikums nach 3- und 7-tägiger intraoraler Exposition von unterschiedlichen Probanden dargestellt. Die grüne Färbung repräsentiert den Anteil vitaler Mikroorganismen, die rote Färbung den Anteil avitaler Mikroorganismen. Auch hier wird deutlich, dass eine steigende Konzentration des Antiseptikums Octenidindihydrochlorid eine stärkere Reduktion der Biofilmbildung induziert, die jedoch für jeden Probanden ganz individuell ausfällt (Abb. 9).

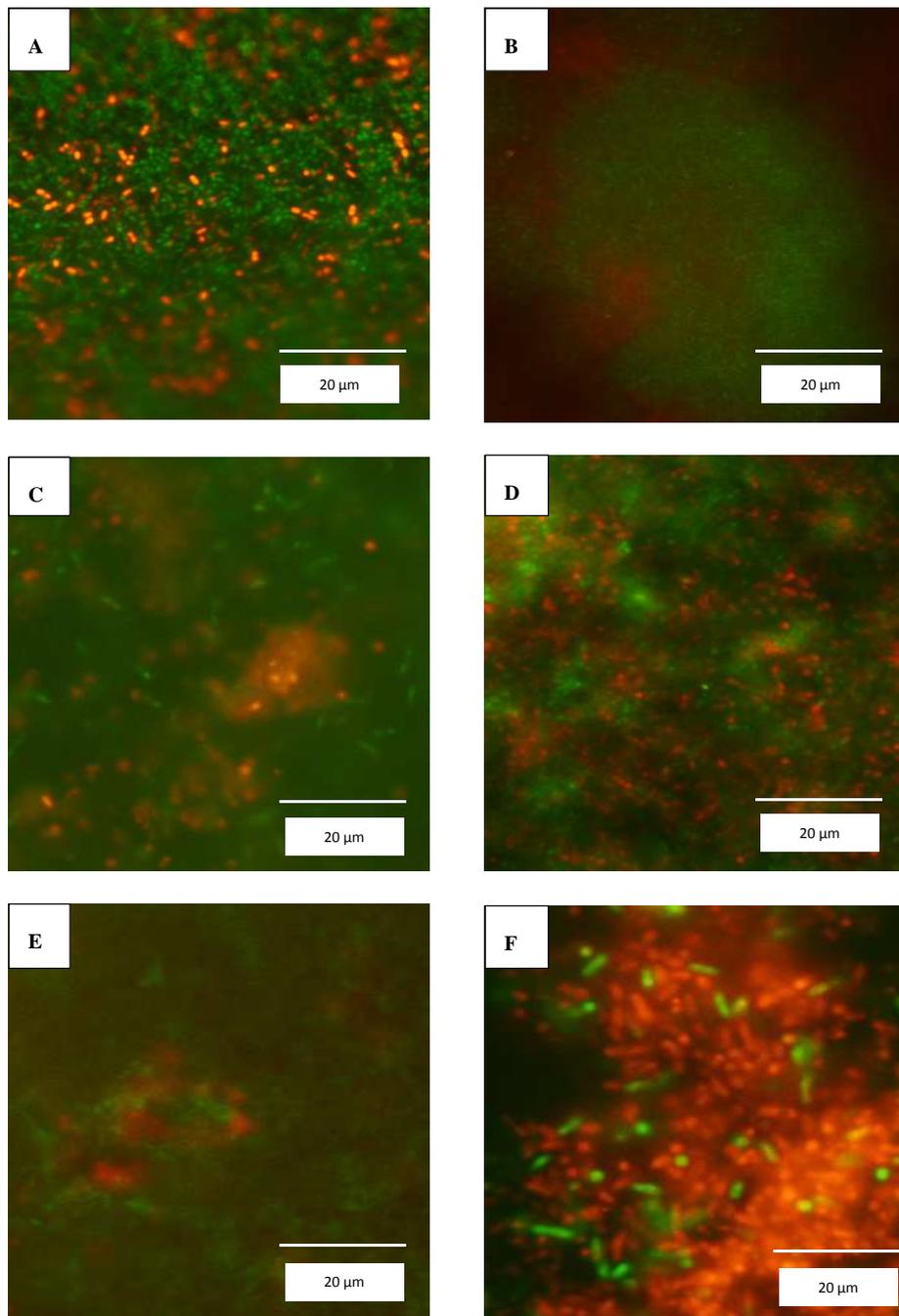


Abbildung 9: Repräsentative Beispiele eines 3 Tage alten (A, C, E) und 7 Tage alten (B, D, F) Biofilms auf intraoral getragenen Prüfkörpern ohne (A, B), mit 3% (C, D) und 6% (E, F) des Antiseptikums ODH in 1000-facher Vergrößerung. Die Biofilmbildung wurde durch das Antiseptikum beeinflusst, was durch eine zunehmend rote Färbung (avitale Mikroorganismen) deutlich wird.

4.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nach 7 Tagen intraoraler Exposition eine deutlich höhere Biofilmbildung stattgefunden hat als nach 3 Tagen. Die Kontrollprüfkörper ohne Antiseptikum zeigten in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse, unabhängig von Politur, Expositionszeit und künstlicher Alterung einen höheren Anteil vitaler (grüne Färbung) Mikroorganismen, verglichen mit den Prüfkörpern, die mit 3% und 6% Antiseptikum versehen waren. Darüber hinaus war das Ausmaß der Biofilmbildung, sowie der Anteil vitaler Mikroorganismen (grüne Färbung) auf den Prüfkörpern mit 6% Octenidindihydrochlorid weitaus deutlicher reduziert, als auf den Prüfkörpern mit 3% Antiseptikum. Es fällt auf, dass bei den Prüfkörpern mit 3% antiseptischem Zusatz nach 3 Tagen eine Reduktion der Biofilmmatrix zu verzeichnen ist. Bei den Prüfkörpern mit 6% Antiseptikum ist nach 3 Tagen bereits kaum noch eine Biofilmmatrix zu erkennen.

4.2.1 Einfluß von Alterung und Auslaugungsphänomenen auf die Biofilmbildung

Nach 3 Tagen intraoraler Exposition zeigt sich auf den künstlich gealterten (TC 0%) Kontrollprüfkörpern ohne das Antiseptikum Octenidindihydrochlorid eine tendenziell höhere Biofilmbildung als auf den ungealterten (NTC 0%) Prüfkörpern ($p=0,08$). Durch den Zusatz des Antiseptikums kam es zu einer tendenziellen Verringerung der Biofilmbildung, jedoch war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen künstlich gealterten (TC) und nicht gealterten (NTC) Prüfkörpern zu erkennen. Ein signifikanter Unterschied ergab sich für die künstlich gealterten Prüfkörper mit 6% Antiseptikum (TC 6%) im Vergleich zu den künstlich gealterten Kontrollprüfkörper (TC 0%) ohne Antiseptikum ($p=0,001$), (Abb. 10).

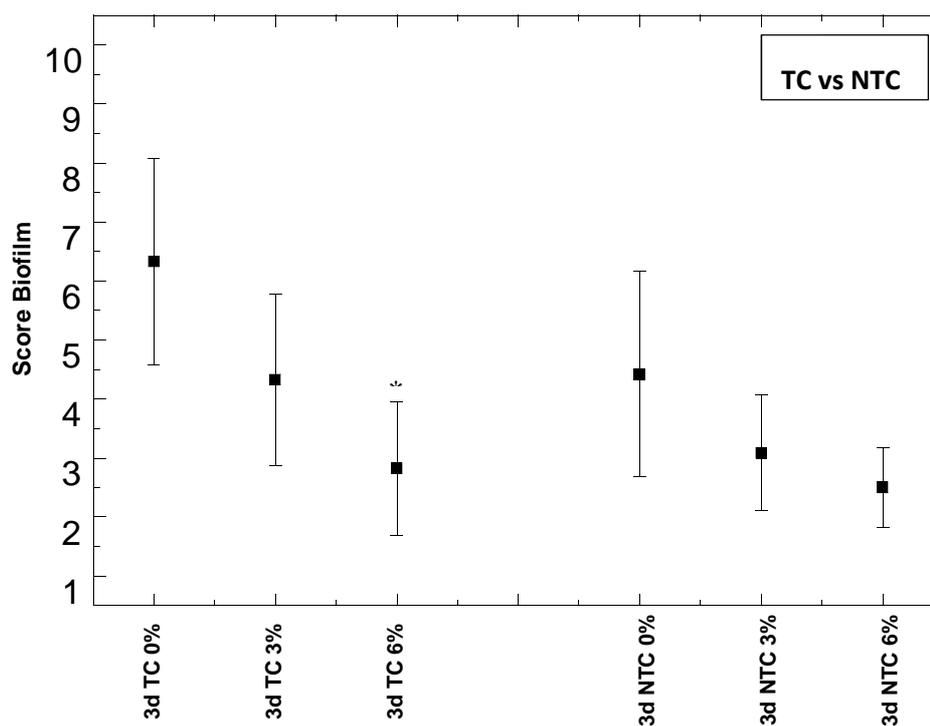


Abbildung 10: Grafische Darstellung der Biofilmbildung auf künstlich gealterten (TC) und nicht gealterten (NTC) Prüfkörpern ohne, mit 3% und mit 6% des Antiseptikums Octenidindihydrochlorid nach 3 Tagen intraoraler Exposition. Jeder Mittelwert setzt sich aus 12 Einzelwerten zusammen. Die Fehlerbalken stellen ein Konfidenzintervall von 95% dar.

Aus Abbildung 11 wird ersichtlich, dass nach 7 Tagen intraoraler Exposition die Biofilmbildung durch den Zusatz des Antiseptikums in den Konzentrationen von 3% und 6% sowohl bei den künstlich gealterten (TC 3%; TC 6%) als auch bei den ungealterten (NTC 3%; NTC 6%) Prüfkörpern statistisch signifikant verringert ist im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollprüfkörpern (TC 0%; NTC 0%) ohne Antiseptikum ($p=0,001$). Hinsichtlich des Ausmaßes der Biofilmbildung ergeben sich zwischen den künstlich gealterten Prüfkörpern mit Antiseptikum (TC 3%; TC6%) und den ungealterten Prüfkörpern mit Antiseptikum (NTC 3%, NTC 6%) geringe Unterschiede, die jedoch nicht statistisch signifikant sind.

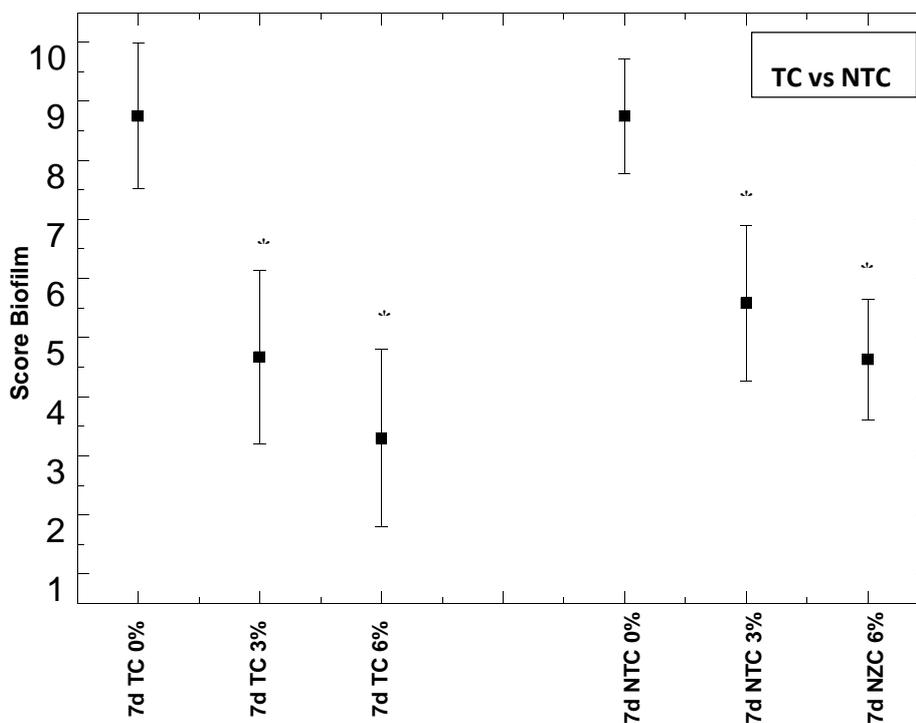


Abbildung 11: Grafische Darstellung der Biofilmbildung auf künstlich gealterten (TC) und nicht gealterten (NTC) Prüfkörpern ohne, mit 3% und mit 6% des Antiseptikums Octenidindihydrochlorid nach 7 Tagen intraoraler Exposition. Jeder Mittelwert setzt sich aus 12 Einzelwerten zusammen. Die Fehlerbalken stellen ein Konfidenzintervall von 95% dar.

4.2.2 Einfluß der Oberflächenrauigkeit auf die Biofilmbildung

Nach 3 Tagen intraoraler Exposition ist die Biofilmbildung auf den polierten (P 0%) und unpolierten (NP 0%) Prüfkörpern ohne den antiseptischen Zusatz Octenidindihydrochlorid in etwa gleich. Durch den Zusatz von Octenidindihydrochlorid kommt es zu einer tendenziellen Reduktion der Biofilmbildung, jedoch scheint die Politur keinen statistisch signifikanten Einfluss zu haben. Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigt sich bei den unpolierten (NP 6%) und polierten (P 6%) Prüfkörpern mit 6% Antiseptikum im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollprüfkörpern ohne Zusatz (P 0%, NP 0%) ($p=0,03-0,04$), (Abb. 12).

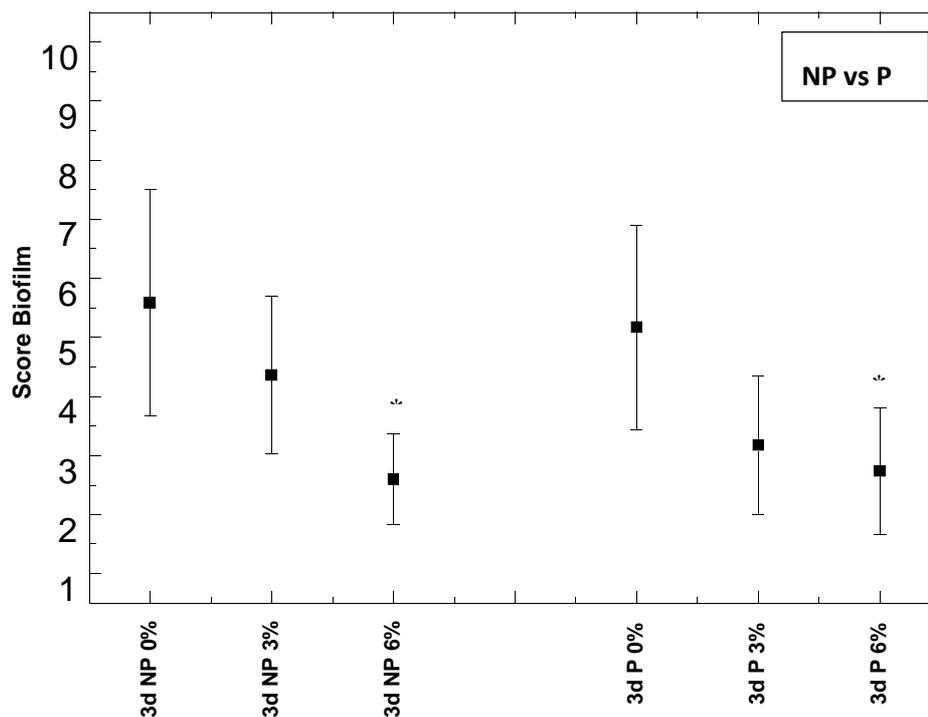


Abbildung 12: Grafische Darstellung der Biofilmbildung auf polierten (P) und unpolierten (NP) Prüfkörpern ohne, mit 3% und mit 6% antiseptischem Zusatz nach 3 Tagen intraoraler Exposition. Jeder Mittelwert setzt sich aus 12 Einzelwerten zusammen. Die Fehlerbalken stellen ein Konfidenzintervall von 95% dar.

Nach 7-tägiger intraoralen Exposition ist die Biofilmbildung auf den polierten (P 0%) und unpolierten Prüfkörpern (NP 0%) ohne antiseptischen Zusatz, ähnlich wie nach 3-tägiger Exposition, in etwa gleich. Nach 7 Tagen zeigt sich jedoch hier eine statistisch signifikante Verringerung der Biofilmbildung durch den Zusatz des Antiseptikums, in den Konzentrationen von 3% und 6%, im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollprüfkörpern ohne Antiseptikum ($p < 0,009$). Bei den polierten Prüfkörper mit Antiseptikum (P 3%; P 6%) lässt sich eine geringfügig verminderte Biofilmbildung im Vergleich zu den unpolierten Prüfkörpern mit Antiseptikum (NP 3%; NP 6%), erkennen. Jedoch ist auch nach 7 Tagen intraoraler Expositionszeit kein erkennbarer Einfluß der Politur auf die Biofilmbildung ersichtlich (Abb. 13).

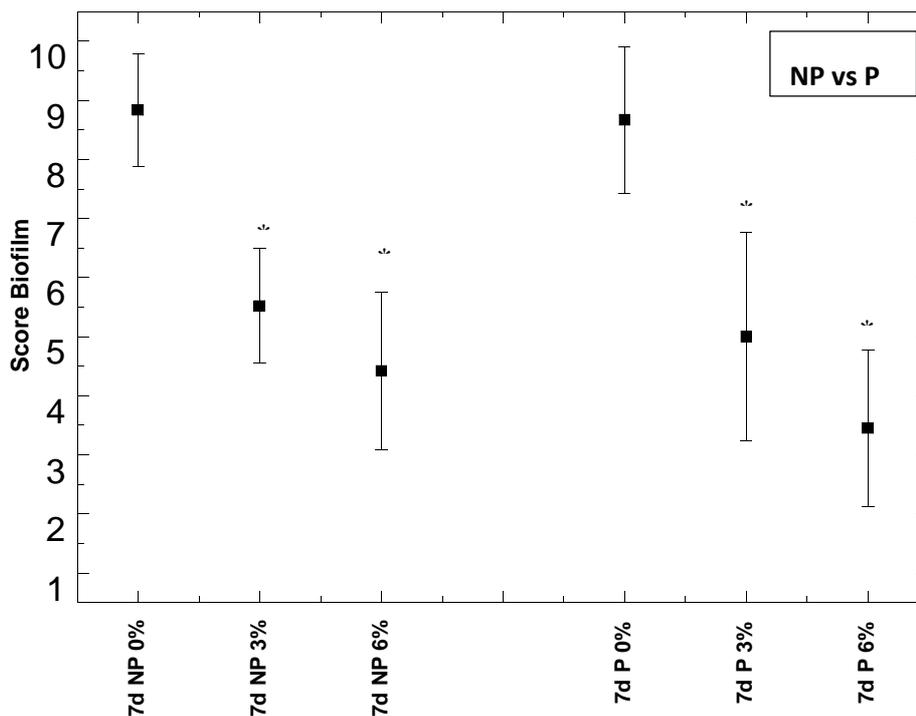


Abbildung 13: Grafische Darstellung der Biofilmbildung auf polierten (P) und unpolierten (NP) Prüfkörpern ohne und mit 3% und 6% des antiseptischen Zusatzes Octenidindihydrochlorid nach 7 Tagen intraoraler Exposition. Jeder Mittelwert setzt sich aus 12 Einzelwerten zusammen. Die Fehlerbalken stellen ein Konfidenzintervall von 95% dar.

4.3 Auftreten von Nebenwirkungen bzw. unerwünschten Wirkungen

Während des intraoralen Expositionszeitraumes waren keine Reaktionen der an die Prüfkörper angrenzenden Mukosa zu verzeichnen. Es wurden keine Nebenwirkungen bzw. unerwünschten Wirkungen festgestellt.

5 Diskussion

Ziel dieser experimentellen In-situ-Untersuchung war es herauszufinden, ob ein mit dem antibakteriellen Wirkstoff Octenidindihydrochlorid angereichertes Komposit unter Mundhöhlenbedingungen einen Einfluß auf die Biofilmbildung hat. Die Biofilmbildung wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie und die Vitalität der Mikroorganismen mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Durch das 10-stufige Scoring-system konnte jeder Prüfkörper im Hinblick auf bakterielle Besiedlungsdichte und Struktur des Biofilms beurteilt werden.

Anhand der vorliegenden Ergebnissen lässt sich feststellen, dass sowohl eine qualitative als auch quantitative Beeinflussung des Biofilms stattgefunden hat. Wenn man die Ergebnisse bzgl. des Einflusses der Konzentration des antiseptischen Agens auf die Biofilmbildung bei den einzelnen Probanden betrachtet, so fand mit steigender Konzentration des Antiseptikums eine stärkere Biofilmreduktion statt. Zu einer signifikanten Beeinflussung der Biofilmbildung kam es nach 3 Tagen Expositionszeit für die Prüfkörper mit 6% igem antiseptischem Zusatz und nach 7 Tagen für die 3%- und 6%- octenidindihydrochloridhaltigen Prüfkörper.

Ein weiteres zu untersuchendes Kriterium stellte der Einfluß von Alterung und Auslaugungsphänomenen auf die Biofilmbildung dar. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen künstlich gealterten und nicht gealterten Prüfkörpern mit und ohne Antiseptikum feststellen.

In weiteren Versuchen, die sich mit der Biofilmbildung in Abhängigkeit zur Oberflächenrauigkeit des Werkstoffes befassten, war kein erkennbarer Einfluß zwischen polierten und unpolierten Prüfkörpern zu beobachten. Wir kamen auch hier zu den gleichen Ergebnissen wie bereits oben erwähnt. Statistisch signifikante Unterschiede zeigten sich nach 3 Tagen für 6% - Octenidindihydrochlorid haltige und nach 7 Tagen für 3%- und 6%- Octenidindihydrochlorid haltige Prüfkörper.

Diese Ergebnisse sprechen klar für eine Inhibition der Biofilmbildung durch das Antiseptikum und nicht etwa durch die Beschaffenheit der Oberfläche des zum Einsatz gekommenen Komposits.

In den elektronenmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertungen, die diese Ergebnisse stützen, wurde deutlich, dass die Biofilme auf den Prüfkörpern mit dem antisepti-

schen Agenz eine geringere mikrobielle Besiedlungsdichte aufwiesen als die Kontrollproben ohne Octenidindihydrochlorid.

Die Beeinflussung der Biofilmbildung durch eine Konzentrationserhöhung des Antiseptikums wird in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen deutlich. Im Vergleich zu den Aufnahmen von den Kontrollprüfkörpern, wo ein etablierter Biofilm dicht mit Mikroorganismen besiedelt zu sehen ist, sind bei einem Einsatz von bereits 3% Octenidindihydrochlorid nur noch einzelne Bakterienkolonien vorhanden. Aufnahmen von Prüfkörpern mit 6% Octenidindihydrochlorid zeigten eine fast komplette Inhibition des Bakterienwachstums, vielfach ist nur noch eine aufgelockerte Pellikelschicht mit darunter erkennbarer Kompositoberfläche ausfindig zu machen. Analog dazu waren die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Auswertungen. Der Anteil intakter Mikroorganismen (grün gefärbt) nahm mit steigender Konzentration des antiseptischen Zusatzes deutlich ab. In einigen Fällen der 6%- Octenidindihydrochlorid haltigen Prüfkörper war eine Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nicht möglich, da keine Mikroorganismen vorhanden waren.

Da es sich bei der Zugabe von Octenidindihydrochlorid nicht um ein polymerisierbares Bakterizid handelt, sondern um ein Agenz, welches während der Verweildauer der Prüfkörper in der Mundhöhle potentiell freigesetzt werden kann, wurden die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der künstlich gealterten und nicht gealterten Prüfkörper hinsichtlich ihrer Oberflächenstruktur nochmals genauer begutachtet. Es ließen sich im Vergleich aber keine Auffälligkeiten in der Oberflächenstruktur bzgl. der Integrität des verwendeten Komposits erkennen.

Unsere Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen zahlreicher Studien unter In-vitro-Bedingungen, in denen dentalen Werkstoffen antibakterielle Agenzien zugesetzt wurden. So konnte in vitro gezeigt werden, dass die Inkorporation von antibakteriell wirkenden Monomeren wie z.B. MDPB oder DMAE-CB sowohl in Kompositen als auch in Adhäsiven das Wachstum von Bakterien beeinflusst. Li et al. (2009) analysierten in ihrer Studie den antibakteriellen Effekt eines Kompositmaterials, dem DMAE-CB zugesetzt wurde, speziell im Hinblick auf *Streptococcus mutans*. Sie stellten fest, dass der Kontakt von *Streptococcus mutans* mit dem antibakteriell wirkenden Monomer DMAE-CB zu einer Hemmung des Bakterienwachstums führt, da die Anlagerung der Bakterien beeinflusst und deren Membranintegrität verletzt wird. Izutani et al. (2011) kamen zu den gleichen Ergebnissen für das polymerisierbare Bakterizid MDPB. Auch in dieser Arbeit wurde ein antibakterieller Effekt auf *Streptococcus mutans* beobachtet. Ein Vorteil dieser chemisch gebundenen antibakteriellen Bestandteile

besteht darin, dass sie keine negativen Auswirkungen auf die Polymerisation haben und zu keiner Beeinträchtigung der mechanischen und physikalischen Eigenschaften des dentalen Werkstoffes führen. Sie werden auch nicht freigesetzt, wie es bei der Anreicherung von Restaurationmaterialien mit Chlorhexidin zu beobachten war, was eine Verschlechterung der Eigenschaften des Werkstoffes zur Folge hatte (Jedrychowski et al., 1983; Ribeiro et al., 1991; Imazato et al., 1994; Imazato et al., 1992). Die antibakterielle Wirkung beruht hierbei auf einer sog. Kontaktinhibition, was als Nachteil gesehen werden könnte, da es nur direkt im Bereich der Restaurationsoberfläche zu dem gewünschten antibakteriellen Effekt kommt (Thome et al., 2009; Xiao et al., 2009; Giammanco et al., 2009; Imazato et al., 2003). In weiteren In-vitro-Studien konnte durch die Anreicherung von Kompositen und Glasionomerzement mit Chlorhexidin eine antibakterielle Wirkung beobachtet werden. Cheng et al. (2012) inkorporierten Chlorhexidin in calciumphosphat- und fluoridhaltige experimentell hergestellte Komposite. Sie wollten herausfinden, inwieweit es zu einer Beeinflussung der Säureproduktion und Biofilmbildung von *Streptococcus mutans* kommt. Bei den calciumphosphat- und fluoridhaltigen Nanokompositen angereichert mit Chlorhexidin, welche mit *Streptococcus mutans* beimpft wurden, war nach 3 Tagen ein pH-Wert von 6,5 im Wachstumsmedium nachweisbar, während bei den Kontrollprüfkörpern ein kariogener pH-Wert von 4,2 vorzufinden war. Chlorhexidinhaltige Nanocomposite reduzierten die Stoffwechselaktivität im Biofilm auf das 10- bis 20- fache und führten zu einer Reduktion der Säureproduktion verglichen mit Kontrollprüfkörpern aus Komposit ohne Chlorhexidin.

Jedrychowski et al. (1983) untersuchten die antibakteriellen und mechanischen Eigenschaften von Restaurationmaterialien in Kombination mit Chlorhexidin. Einem Komposit und einem Glasionomerzement wurden die antibakteriell wirkenden Komponenten Chlorhexidingluconat und Chlorhexidindihydrochlorid in verschiedenen hohen Konzentrationen zugesetzt. Die Autoren zeigten in der In-vitro-Studie, dass durch den Zusatz von Chlorhexidin eine hemmende Wirkung auf die Biofilmbildung zu beobachten ist, in dem das Bakterienwachstum und die Fähigkeit zur Kolonisation beeinflusst werden. Mit steigender Konzentration des antibakteriellen Wirkstoffes ließ sich eine gesteigerte Hemmung des Bakterienwachstums feststellen. Jedoch führten hohe Konzentrationen von Chlorhexidin zu einer Beeinträchtigung der mechanischen Eigenschaften der Restaurationmaterialien. In dieser Untersuchung stellte sich heraus, dass bereits der Zusatz von 1% CHX zu Glasionomerzement und Komposit zu einer Steigerung der antibakteriellen Aktivität führt, ohne die mechanischen Eigenschaften des den-

talen Werkstoffes signifikant negativ zu beeinflussen (Jedrychowski et al., 1983; Ribeiro et al., 1991; Takahashi et al., 2006).

Leung et al. (2005) stellten in ihrer In-vitro-Studie experimentelle Chlorhexidin freisetzende Komposite her. Sie konnten feststellen, dass eine Erhöhung der Chlorhexidinfreisetzungsrate die Rate der Biofilmentwicklung auf der Materialoberfläche reduziert. Die in dieser Studie untersuchten Chlorhexidin freisetzenden Prüfkörper erwiesen sich als effektiver in der Beeinflussung der Biofilmbildung als handelsübliche, Fluorid freisetzende Zemente. Ribeiro et al. (1991) kamen zu ähnlichen Ergebnissen für einen mit Chlorhexidin angereicherten Glasionomerzement. Je höher sie die Chlorhexidinkonzentration wählten, um so länger hielt der antibakterielle Effekt auf *Streptococcus mutans* an. Jedoch führte eine Konzentrationserhöhung mit steigender Tendenz zu einer Verschlechterung der Materialeigenschaften.

Zu diese Erkenntnis kamen auch Takahashi et al. (2006). Sie analysierten die antibakteriellen und physikalischen Eigenschaften von Chlorhexidin haltigen Glasionomerzementen. Es wurde Chlorhexidindiacetat alleine oder in Kombination mit dem weniger wasserlöslichen Chlorhexidindihydrochlorid in verschiedenen hohen Konzentrationen zugesetzt. Jeder experimentell hergestellte Zement wurde auf seine antibakterielle Aktivität gegen *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* und *Actinomyces naeslundii*, sowie auf die Freisetzungsrate von Chlorhexidin und eine Beeinflussung der physikalischen Eigenschaften hin untersucht. Für jeden Glasionomerzement konnte eine antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden, unabhängig von der Chlorhexidinkonzentration. Die Freisetzungsrate korrelierte nicht signifikant mit einer Erhöhung des Chlorhexidingehaltes. Der Zusatz von 1% Chlorhexidindiacetat stellte sich als ideal heraus bezüglich der antibakteriellen Wirkung, auch konnte bei dieser Konzentration keine negative Beeinträchtigung der Materialeigenschaften nachgewiesen werden. Höhere Konzentrationen an Chlorhexidin führten jedoch zu signifikant schlechteren physikalischen Eigenschaften des Werkstoffes. Diese Verschlechterung ist darauf zurück zu führen, dass Chlorhexidin während der Verweildauer in der Mundhöhle durch Diffusionsvorgänge aus dem Werkstoff freigesetzt wird (Jedrychowski et al., 1983).

Frencken et al. (2007) führten eine Pilotstudie unter In-vivo-Bedingungen durch. Sie untersuchten, ob Glasionomerzement angereichert mit Chlorhexidin eine stärker hemmende Wirkung auf das Wachstum von Mikroorganismen in infiziertem Dentin hat als konventioneller Glasionomerzement. Die Ergebnisse zeigten einen statistisch signifikanten Unterschied in der Reduktion der Anzahl von Mikroorganismen bei der Anwendung von Glasionomerzement angereichert mit Chlorhexidin.

Im Gegensatz zu den bis dato durchgeführten In-vitro-Untersuchungen, handelt es sich bei dieser Arbeit um eine In-situ-Untersuchung. Derzeit sind laut Literatur keine weiteren In-vivo-Studien verfügbar, die einen direkten Vergleich mit unserer Arbeit zulassen. Jedoch bestärken die vorliegenden Ergebnisse von bereits durchgeführten In-vitro-Untersuchungen unsere Ergebnisse.

In unserem Fall wurden die Prüfkörper aus Komposit, angereichert mit Octenidindihydrochlorid, mittels einer Trageschiene direkt in die Mundhöhle appliziert. So konnte eine natürliche orale Biofilmbildung gewährleistet werden, die jedoch individuell für jeden Probanden ausfällt.

Die Wirkungsweise des hier zur Anwendung gekommenen Antiseptikums Octenidindihydrochlorid ist in etwa vergleichbar mit der von Chlorhexidin.

Chlorhexidin, einem Bisguanidin, wird die beste Wirksamkeit zur Bekämpfung von Plaque und Gingivitis zugesprochen. Es umfasst ein breites antimikrobielles Spektrum gegen grampositive und gramnegative Bakterien. In niedrigen Konzentrationen (< 1%) wirkt es bakterio-statisch, in höheren Konzentrationen (1%) bakterizid (Stanley et al., 1989). Weiterhin wirkt es fungizid, z.T. auch viruzid. Durch seine spezielle Wirkung gegen *Streptococcus mutans* nimmt es einen hohen Stellenwert in der Kariesprophylaxe ein (Park et al., 1989; Ellepola et al., 2001; Hennesy, 1973; Davies, 1973).

Chlorhexidin wird nicht durch die Schleimhäute resorbiert. Es kann auch zur Hautdesinfektion verwendet werden. In einer Studie von Darouiche et al. (2010) war es sogar PVP-Iod überlegen. Jedoch führt ein langfristiger Gebrauch zu lokalen Nebenwirkungen. Zu den häufigsten unerwünschten, zumeist vollständig reversiblen Nebenwirkungen zählen Geschmacksempfindungsstörungen und bräunlichen Ablagerungen auf Zähnen und Zunge (Guggenheim et al., 2011; Loe et al., 1970).

Octenidindihydrochlorid gehört zu den Bispyridinen. Aufgrund seiner ausgezeichneten Eigenschaften wird es schon seit langem sowohl zur Oberflächen- und Wunddesinfektion als auch als Mundspüllösung eingesetzt.

Es handelt sich um ein toxikologisch sehr gut untersuchtes Präparat, dass weder durch intakte noch durch geschädigte Haut absorbiert wird.

Octenidindihydrochlorid wirkt bakterizid sowohl gegen gramnegative als auch grampositive Bakterien. Außerdem ist es viruzid und wirkt fungizid (Hübner et al., 2010).

In einer Untersuchung von Dogan et al. (2008) wurden bei der Anwendung von Octenidin als Spülung zur Keimzahlreduktion in der Mundhöhle signifikant höhere Reduktionsraten als bei der Anwendung von Chlorhexidin oder auch PVP-Iod verzeichnet. Diese Ergebnisse wurden auch von Kramer et al. (1998) bestätigt.

Slee und O`Connor (1983) kamen zu vergleichbaren Effekten, wie auch Shern et al. (1987) und Emilson et al. (1981), die Versuche an Ratten und Affen durchführten. Sie konnten ebenfalls eine effektivere antibakterielle Wirkung einer Octenidin haltigen Mundspülung im Vergleich zu Chlorhexidin bestätigen.

Beiswanger et al. (1990) zeigten, dass bereits die Anwendung von 0,1% Octenidin als Spüllösung zu signifikant weniger Plaque, Gingivitis und Blutungen führt im Vergleich zu einem Kontrollprodukt (Bailey et al., 1984; Patters et al., 1983). Es gibt verschiedene Arbeiten, in denen die Wirksamkeit von Chlorhexidin und Octenidin als Mundspüllösungen gegenübergestellt und verglichen wurden. Insgesamt zeigen sich widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf Octenidin, wobei jedoch die Mehrzahl der Untersuchungen einen Vorteil für Octenidin herausstellt (Adams et al., 1994; Dogan et al., 2008; Kocak et al., 2009; Shapiro et al., 2002; Hübner et al., 2010).

Der Wirkmechanismus sowohl von Chlorhexidin als auch von Octenidin beruht auf der Reaktion des Antiseptikums mit der Zellwand und Membranbestandteilen der mikrobiellen Zellen und leitet folglich eine Lyse dieser ein. Aufgrund der chemischen Struktur von Octenidindihydrochlorid ist keine Hydrolyse zu erwarten.

Da es keine Guanidinstruktur besitzt, wie dies bei Chlorhexidin der Fall ist, kommt es auch nicht zu einer Abspaltung von p-Chloranilin, einer sowohl toxisch als auch kanzerogen wirkenden Komponente.

Laut Angaben in der Literatur lassen sich für beide Wirkstoffe unter bestimmte Bedingungen zelltoxische Effekte nachweisen, die aber für den Einsatzbereich als Zusatz in Komposit nicht von Bedeutung sind (Kohlbecker et al., 1989).

Momentan lässt sich in der Literatur nichts in Bezug auf Octenidindihydrochlorid als antiseptischen Zusatz in dentalen Restaurationsmaterialien finden.

Polymethacrylate werden in vielen Bereichen der Medizin verwendet, wie z.B. in der Endoprothetik oder Osteosynthese. Darüber hinaus stellt die Zahnmedizin den größten Einsatzbereich dieser PMMA-Kunststoffe für herausnehmbare prothetische Arbeiten oder kieferorthopädische Apparaturen dar. Eine In-vitro-Untersuchung von Weckbach et al. (2011) wurde

erstmals die Wirksamkeitsprüfung und Freisetzung von Octenidin aus Polymethylmethacrylat-Knochenzement und die Adhäsion von Testkeimen an Polymethylmethacrylat-Knochenzement untersucht. In dieser Arbeit zeigte sich eine deutliche Senkung der Keimlast bis hin zu einer vollständigen Eradikation der Keime. Bezüglich der Freisetzungskinetik ließ sich eine Wirkung des Antiseptikums auch noch nach 6 Wochen nachweisen (Weckbach et al., 2011). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Kälicke et al. (2006) die den Effekt von Octenidin beschichteten Titanosteosyntheseplatten auf lokale Infektionen beobachteten. Sie konnten eine signifikante Verringerung lokaler Infektionen bei Anwendung solcher beschichteten Osteosyntheseplatten nachweisen.

Obwohl es sich hier um einen anderen Studienansatz handelt, so bestärken diese Daten doch auch die im Rahmen der vorliegenden In-situ-Studie generierten Resultate.

Die Mundhöhle stellt ein dynamisches Ökosystem dar, weshalb es nicht von Vorteil ist, sämtliche Bakterien der Mikroflora zu eliminieren um Infektionen, die durch die dentale Plaque verursacht werden, zu kontrollieren. Viel mehr wäre es wünschenswert, nur die Karies und Parodontitis auslösenden oral pathogenen Keime zu beseitigen. Um dies zu erreichen, sind chemische Agenzien wie Octenidin oder Chlorhexidin bereits seit längerer Zeit erfolgreich als Mundspüllösung im Einsatz (Kocak et al., 2009). Für Chlorhexidin als Zusatz in dentalen Restaurationsmaterialien gibt es zahlreiche In-vitro-Untersuchungen die eine antibakterielle Wirkung nachweisen konnten (Jedrychowski et al., 1983; Ribeiro et al., 1991; Cheng et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine hemmende Wirkung von Octenidindihydrochlorid auf die bakterielle Adhärenz und Kolonisation der Kompositoberfläche und damit auf das Ausmaß der Biofilmbildung beobachtet werden.

Diese hemmende Wirkung könnte auf drei Mechanismen zurückzuführen sein:

- 1) durch die kontinuierliche Abgabe des Antiseptikums aus der Oberfläche werden die planktonischen Mikroorganismen im Speichel devitalisiert, was folglich zu einer Verringerung der zur Adhäsion verbleibenden Bakterien führt.
- 2) der direkte Kontakt der Bakterien mit der antimikrobiell wirkenden Oberfläche des Werkstoffes beeinflusst die initial besiedelnden Mikroorganismen, nachdem sie sich an die Pellikel angelagert haben.

- 3) eine Modifikation der Pellikelbildung und somit auch der Eigenschaften der Pellikel, verursacht durch die antimikrobiell wirkende Oberfläche.

Das Octenidindihydrochlorid-Molekül enthält zwei kationenaktive Zentren und bindet so leicht an die negativ geladene Zellwand bzw. Zellmembran. Nach Adsorption an die negativ geladenen Oberflächen der Bakterienzellen reagiert es mit Phospholipiden der Zellmembran bzw. anionischen Polysacchariden der Bakterienzellwand. Es wird eine Zerstörung der Zellfunktion eingeleitet, ausgelöst durch ein Eingreifen in die enzymatischen Systeme und Zerstörung der Zellintegrität (Kramer, 2007).

Ghannoum et al. (1990) beschäftigten sich mit der antimykotischen Wirkung von Octenidin.

Sie konnten eine Wachstumshemmung von *Candida albicans*, induziert durch Octenidin, nachweisen. Die Auswertung von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ergab eine extensive Zellschädigung, Lyse und den Kollaps von Zellstrukturen, sowie eine Extrusion zellulärer Komponenten. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten nach Inkubation von *Candida albicans* mit dem Antiseptikum eine Veränderung der Ultrastruktur. Die Zellen tendierten dazu, eine unregelmäßige Form anzunehmen. Auch die Zellwände zeigten Unregelmäßigkeiten in ihrer Struktur mit Deformationen und einen offensichtlichen Verlust der inneren Kohäsion. Die Integrität der Zellmembranen ging verloren, sowie Bestandteile des Zytoplasmas koagulierten.

Smith et al. (1991) untersuchten, ob eine hemmende Wirkung ausgelöst durch antiseptische Agenzien wie z.B. Chlorhexidindigluconat, Cetylpyridinium und Octenidindihydrochlorid auf die Koaggregation von Bakterien festzustellen ist. Aus den Ergebnissen konnten sie schlussfolgern, dass es zu einer Beeinträchtigung der Koaggregation der Bakterien gekommen ist und folglich zu einer Beeinflussung der Verschmelzung zu einer funktionellen Einheit, dem Biofilm.

Basierend auf den vorhandenen Daten ist es jedoch eher unwahrscheinlich, dass die kontinuierliche Abgabe des Antiseptikums zu einer Devitalisierung der im Speichel vorhandenen Mikroorganismen führt. Ein solches Phänomen ließ sich anhand der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht bestätigen. Vermutlich ist die Freisetzung von Octenidindihydrochlorid aus den Prüfkörpern zu gering. Würde das Antiseptikum in einer hohen Konzentration abgegeben werden, würde dies zu einer Abtötung der planktonisch vorkommenden Mikroorganismen im Speichel führen, die allerdings noch das Potential zur Adhärenz an der Prüf-

körperoberfläche hätten. Diese Bakterien müssten auf der Kompositoberfläche als einzelne adhärenente Bakterien oder bakterieller Monolayer zu sehen sein, was aber bei Auswertung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen nach 3- und 7-tägiger intraoraler Exposition nicht der Fall war.

Wenn man Rückschlüsse auf die in unserer Arbeit beobachteten Effekte zieht, so kommt der direkte Kontaktmechanismus als Erklärung der Biofilm hemmenden Wirkung in Frage.

Diese Hypothese wird bestärkt durch die Verschiebung des Verhältnisses der vitalen zu den devitalen Bakterien, was durch die Auswertung der Live-dead-Bilder gezeigt wurde.

Eine weitere mögliche Erklärung könnte in der Modifikation der Pellikelbildung und deren Eigenschaften liegen, wenn man sich die dünne Pellikelschicht auf den Prüfkörpern mit 6% iger Konzentration von Octenidindihydrochlorid anschaut.

Zur Bestätigung dieser Hypothesen im Hinblick auf den Wirkmechanismus des in den experimentellen Kompositen angereicherten Octenidins sind allerdings weiterführende Untersuchungen erforderlich.

6 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die bakterielle Adhärenz mit nachfolgender Biofilmbildung auf dem verwendeten Komposit durch den Zusatz des antibakteriellen Wirkstoffes Octenidindihydrochlorid unter Mundhöhlenbedingungen beeinflusst wird.

Sowohl in der präventiven, restaurativen als auch prothetischen Zahnheilkunde gibt es vielfältige Einsatzbereiche, die von antibakteriell wirkenden Kompositen oder auch anderen antibakteriell wirkenden polymeren dentalen Werkstoffen profitieren könnten.

Der Anwendungsbereich erstreckt sich z.B. von der Fissurenversiegelung, der Versorgung von Zahnhalskaries bis hin zu ausgedehnten zerviko-approximalen Läsionen.

Darüber hinaus ist auch an einen Einsatz in der Implantatprothetik sowie bei festsitzendem und herausnehmbarem Zahnersatz zu denken.

Die Anwendung einer solch antibakteriell wirkenden Komponente stellt eine neue Alternative dar, die Biofilmbildung zu beeinflussen und auch zu reduzieren.

In weiteren Untersuchungen wäre zu prüfen, ob und wie lange die antibakterielle Wirksamkeit bestehen bleibt. Es wäre auch zu untersuchen, ob im Rahmen der häuslichen Mundpflege eine Freisetzung des Agenz induziert wird.

Weiterhin wäre es interessant zu prüfen, ob die Ausbildung einer Pellikelschicht auf der Materialoberfläche eine Auswirkung auf die Effektivität von Octenidindihydrochlorid hat.

Bei der Begutachtung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der künstlich gealterten und nicht gealterten Prüfkörper konnten wir keine Auffälligkeiten in der Oberflächenstruktur bzgl. der Integrität des verwendeten Komposits erkennen. Dennoch wäre zu klären, in welchem Umfang die Zugabe des Octenidins zum Komposit bzw. die Freisetzung des Antiseptikums aus dem Komposit zu einer Veränderung der Materialeigenschaften führt.

7 Literaturverzeichnis

1. Adams D, Addy M (1994) Mouthrinses. *Adv Dent Res* 8: 291-301
2. Addy M, Handly R (1981) The effects of the incorporation of chlorhexidine acetate on some physical properties of polymerized and plasticized acrylics. *J Oral Rehabil* 8: 155-163
3. Allaker RP (2010) The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. *J Dent Res* 89: 1175-1186
4. Appelbaum B, Golub E, Holt SC, Rosan B (1979) In vitro studies of dental plaque formation: adsorption of oral streptococci to hydroxyapatite. *Infect Immun* 25: 717-728
5. Augthun M, Brauner A (1988) Antimikrobielle Wirkung unterschiedlicher Dentallegierungen auf die Keime der oralen Mikroflora in vitro. *Dtsch Zahnärztl Z* 43: 869-873
6. Aulicino FA, Pastoni F (2004) Microorganisms surviving in drinking water systems and related problems. *Ann Ig* 16: 265-272
7. Ausschill TM, Arweiler NB, Brex M, Reich E, Sculean A, Netuschil L (2002) The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *Eur J Oral Sci* 110: 48-53
8. Bailey DM, De Grazia CG, Hoff SJ, Schulenberg PL, O'Connor JR, Paris DA, McKenzie Slee A (1984) Bispyridinamines: a new class of topical antimicrobial agents as inhibitors of dental plaque. *J Med Chem* 27: 1457-1464
9. Beiswanger BB, Mallatt ME, Mau MS, Jackson RD, Hennon DK (1990) The clinical effects of a mouthrinse containing 0.1% octenidine. *J Dent Res* 69: 454-457
10. Beyth N, Yudovin-Farber I, Perez-Davidi M, Domb AJ, Weiss EI (2010) Polyethyleneimine nanoparticles incorporated into resin composite cause cell death and trigger biofilm stress in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 22038-22043

11. Beyth N, Bahir R, Matalon S, Domb AJ, Weiss EI (2008) Streptococcus mutans biofilm changes surface-topography of resin composites. Dent Mater 24: 732-736
12. Beyth N, Yudovin-Farber I, Bahir R., Domb AJ, Weiss EI (2006) Antibacterial activity of dental composites containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles against Streptococcus mutans. Biomaterials 27: 3995–4002
13. Bouwer EJ, Zehnder AJ (1993) Bioremediation of organic compounds- putting microbial metabolism to work. Trends Biotechnol 11: 360–367
14. Bowden GH (1990) Microbiology of root surface caries in humans. J Dent Res 69: 1205-1210
15. Bowden GH, Hamilton IR (1998) Survival of oral bacteria. Crit Rev Oral Biol M 9: 54-85
16. Bradshaw DJ, Marsh PD (1999) Use of continuous flow techniques in modelling dental plaque biofilms. Method Enzymol 310: 279-296
17. Brady RA, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW, Shirtliff ME (2008) Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. FEMS Immunol Med Microbiol 52: 13-22
18. Bürgers R, Eidt A, Frankenberger R, Rosentritt M, Schweikl H, Handel G, Hahnel S (2009) The anti-adherence activity and bactericidal effect of microparticulate silver additives in composite resin materials. Arch Oral Biol 54: 595-601
19. Carlehn A, Nikdel K, Wennerberg A, Holmberg K, Olsson J (2001) Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. Biomaterials 22: 481-487
20. Carlsson J (1997) Bacterial metabolism in dental biofilms. Adv Dent Res 1: 75-80

21. Carter K, Landini G, Walmsley AD (2001) Plaque removal characteristics of electric toothbrushes using an invitro plaque mode. *J Clin Periodontol* 28: 1045–1049
22. Chalmers NI, Palmer RJ, Cisar JO, Kolenbrander PE (2008) Characterization of a streptococcus sp.-veillonella sp. community micromanipulated from dental plaque. *J Bacteriol* 190: 8145-8154
23. Cheng L, Weir MD, Xu HH, Antonucci JM, Kraigsley AM, Lin NJ, Lin-Gibson S, Zhou X (2012) Antibacterial amorphous calcium phosphate nanocomposites with a quaternary ammonium dimethacrylate and silver nanoparticles. *Dent Mater* 28: 561-572
24. Cheng L, Weir MD, Zhang K, Xu SM, Chen Q, Zhou X, Xu HHK (2012) Antibacterial nanocomposite with calcium phosphate and quaternary ammonium. *J Dent Res* 91: 460-466
25. Cheng L, Weir MD, Xu HH, Kraigsley AM, Lin NJ, Lin-Gibson S, Zhou X (2012) Antibacterial and physical properties of calcium-phosphate and calcium-fluoride nanocomposites with chlorhexidine. *Dent Mater* 28: 573-583
26. Christersson LA, Zambon JJ, Genco RJ (1991) Dental bacterial plaques. Nature and role in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 18: 441-446.
27. Costerton JW (2005) Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res* 437: 7-11
28. Costerton JW (1999) Introduction to Biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 11: 217-221
29. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322
30. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM (1995) Microbial Biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49: 711-745

31. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G (1994) Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 176: 2137-2142
32. Costerton JW, Geesey GG, Cheng GK, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 41: 435-464
33. Costerton JW, Geesey GG, Cheng GK (1978) How bacteria stick. *Sci Am* 238: 86-95
34. Darouiche RO, Wall MJ Jr, Itani KM, Otterson MF, Webb AL (2010) Chlorhexidine-alcohol versus povidone-iodine for surgical-site antisepsis. *N Engl J Med* 362: 18-26
35. Davies A (1973) The mode of action of chlorhexidine. *J Periodont Res* 12: 68-75
36. Decker E-M (2001) The ability of direct fluorescence-based, two-colour assays to detect different physiological states of oral streptococci. *Lett Appl Microbiol* 33: 188-192
37. Dionysopolos P, Kotsanos N, Pataridou A (2003) Fluoride release and uptake by four new fluoride releasing restorative materials. *J Oral Rehabil* 30: 866-872
38. Dogan AA, Adiloglu AK, Onal S, Cetin ES, Polat E, Uskun E, Koksall F (2008) Short-term relative antibacterial effect of octenidine dihydrochloride on the oral microflora in orthodontically treated patients. *Int J Infect Dis* 12: e19-e25
39. Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15: 167-193
40. Ebi N, Imazato S, Noiri Y, Ebisu S (2001) Inhibitory effects of resin composite containing bactericide-immobilized filler on plaque accumulation. *Dent Mater* 17: 485-491
41. Edmiston CE, Seabrook GR, Goheen MP, Krepel CJ, Johnson CP, Lewis BD, Brown KR, Towne JB (2006) Bacterial adherence to surgical sutures: Can antibacterial-coated sutures reduce the risk of microbial contamination? *J Am Coll Surg* 203: 481-489

42. Ellepola AN, Samaranayake LP (2001) Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. *Oral Dis* 7: 11-17
43. Embleton JV, Newman HN, Wilson M (1998) Influence of growth mode and sucrose on susceptibility of streptococcus sanguinis to amine fluorides and amine fluoride-inorganic fluoride combinations. *Appl Environ Microb* 64: 3503-3506
44. Emilson CG (1994) Potential efficacy of chlorhexidine against mutans streptococci and human dental caries. *J Dent Res* 73: 682-691
45. Emilson CG, Bowen WH, Robrish SA, Kemp CW (1981) Effect of the antibacterial agents octenidine and chlorhexidine on the plaque flora in primates. *Scand J Dent Res* 89: 384-392
46. Fang M, Chen JH, Xu XL, Yang PH, Hildebrand HF (2006) Antibacterial activities of inorganic agents on six bacteria associated with oral infections by two susceptibility tests. *Int J Antimicrob Agents* 27: 513–517
47. Flemming H-C (2002) Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures. *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 629-640
48. Flemming H-C, Griebe T, Schaule G (1996) Antifouling strategies in technical systems – a short review. *Wat Sci Tech* 34: 517-524
50. Frencken JE, Imazato S, Toi C, Mulder J, Mickenautsch S, Takahashi Y, Ebisu S (2007) Antibacterial effect of chlorhexidine-containing glass ionomer cement in vivo: A pilot study. *Caries Res* 41: 102–107
51. García-Contreras R, Argueta-Figueroa L, Mejía-Rubalcava C, Jiménez-Martínez R, Cuevas-Guajardo S, Sánchez-Reyna PA, Mendieta-Zeron H (2011) Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice. *Int Dent J* 61: 297-301
52. Ghannoum MA, Elteen KA, Ellabib M, Whittaker PA (1990) Antimycotic effects of octenidine and pirtenidine. *J Antimicrob Chemother* 25: 237-245

53. Giammanco GM, Cumbo EMG, Luciani A, Gallina G, Mammina C, Pizzo G (2009) In vitro evaluation of the antibacterial activity of cured dentin/enamel adhesive incorporating the antimicrobial agent MDPB. *New Microbiol* 32: 385-390
54. Gouidera M, Bouzida J, Sayadib S, Montielc A (2009) Impact of orthophosphate addition on biofilm development in drinking water distribution systems. *J Hazard Mater* 167: 1198–1202
55. Guggenheim B, Meier A (2011) In vitro effect of chlorhexidine mouth rinses on poly-species biofilms. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 121: 432-436
56. Guggenheim B (1974) The role of microbial dental plaque in the etiology of dental caries and periodontal diseases. *Pathol Microbiol* 40: 207-226
57. Hahn R, Weiger R, Netuschil L, Briich M (1993) Microbial accumulation and vitality on different restorative materials. *Dent Mater* 9: 312-316
58. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2: 95-108
59. Hannig C, Hannig M (2009) The oral cavity-a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Invest* 13: 123–139
60. Hannig C, Hannig M, Rehmer O, Braun G, Hellwig E, Al-Ahmad A (2007) Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. *Arch Oral Biol* 52: 1048-1056
61. Hannig M, Hannig C (2007) Der initiale orale Biofilm – pathogen oder protektiv? *Oralprophylaxe & Kinderzahnheilkunde* 29: 73-82
62. Hannig M (1999) Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Invest* 3: 88–95
63. He X, Shi W (2009) Oral Microbiology: Past, present and future. *Int J Oral Sci* 1: 47–58

64. Hellwig E, Klimek J, Attin T (2007) Einführung in die Zahnerhaltung. Urban & Fischer
65. Hennessey TD (1973) Some antibacterial properties of chlorhexidine. *J Periodont Res* 12: 61-67
66. Hernández-Sierra JF, Ruiz F, Pena DC, Martínez-Gutiérrez F, Martínez AE, Guillén Ade J, Tapia-Pérez H, Castañón GM (2008) The antimicrobial sensitivity of streptococcus mutans to nanoparticles of silver, zinc oxide and gold. *Nanomedicine* 4: 237-240
67. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N (2009) Bacterial interactions in dental bio-film development. *J Dent Res* 11: 982-990
68. Hori K, Matsumoto S (2010) Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochem Engin J* 48: 424–434
69. Hori K, Yamashita S, Ishii S, Kitagawa M, Tanji Y, Unno H (2001) Isolation, characterization and application to off-gas treatment of toluene-degrading bacteria. *J Chem Eng Japan* 34: 1120–1126
70. Hübner N-O, Siebert J, Kramer A (2010) Octenidine dihydrochloride, a modern antiseptic for skin, mucous membranes and wounds. *Skin Pharmacol Physiol* 23: 244–258
71. Imazato S (2009) Bio-active restorative materials with antibacterial effects: new dimension of innovation in restorative dentistry. *Dent Mater J* 28: 11-19
72. Imazato S, Ebi N, Takahashi Y, Kaneko T, Ebisu S, Russell RRB (2003) Antibacterial activity of bactericide-immobilized filler for resin-based restoratives. *Biomaterials* 24: 3605–3609
73. Imazato S, Russell RRB, McCabet JF (1995) Antibacterial activity of MDPB polymer incorporated in dental resin. *J Dent* 23: 177-181
74. Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y, McCabe JF, Russell RRB (1994) Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite. *J Dent Res* 73: 1437-1443

75. Imazato S, Kawakami M, Trii M, Tsuchitani Y (1992) Antibacterial activity of composites containing chemically bound non-releasing antibacterial component. *J Dent Res* 72: 721
76. Itota T, Nakabo S, Iwai Y, Konishi N, Nagamine M, Torii Y (2002) Inhibition of artificial secondary caries by fluoride-releasing adhesives on root dentin. *J Oral Rehabil* 29: 523–527
77. Izutani N, Imazato S, Nakajo K, Takahashi N, Takahashi Y, Ebisu S, Russell RRB (2011) Effects of the antibacterial monomer 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) on bacterial viability and metabolism. *Eur J Oral Sci* 119: 175–181
78. Jayaraman A, Wood TK (2008) Bacterial quorum sensing: Signals, circuits and implications for biofilms and disease. *Annu Rev Biomed Eng* 10: 145-167
79. Jedrychowski JR, Caputo AA, Kerper S (1983) Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *J Oral Rehabil* 10: 373-381
80. Jones N, Ray B, Ranjit KT, Manna AC (2008) Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 279: 71-76
81. Kälicke T, Schierholz J, Schlegel U, Frangen TM, Köller M, Printzen G, Seybold D, Klöckner S, Mohr G, Arens S (2006) Effect on infection resistance of a local antiseptic and antibiotic coating on osteosynthesis implants: An in vitro and in vivo study. *J Orthop Res* 24: 1622-1640
82. Kassae MZ, Akhavan A, Sheikh N, Sodagar A (2008) Antibacterial effects of a new dental acrylic resin containing silver nanoparticles. *J Appl Polym Sci* 110: 1699–1703
83. Kocak MM, Ozcan S, Kocak S, Topuz O, Erten H (2009) Comparison of the efficacy of three different mouthrinse solutions in decreasing the level of streptococcus mutans in saliva. *Eur J Dent* 3: 57-61

84. Kohlbecker G (1989) Toxic impurities in chlorhexidine digluconate. *Dtsch Zahnärztl Z* 44: 273-276
85. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ (2002) Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 486-505
86. Kolenbrander PE (2000) Oral microbial communities: Biofilms, interactions and genetic systems. *Annu Rev Microbiol* 54: 413–437
87. Kotsanos N (2001) An intraoral study of caries induced on enamel in contact with fluoride-releasing restorative materials. *Caries Res* 35: 200–204
88. Kramer A, Hoppe H, Krull B, Pitten FA, Rosenau S (1998) Antiseptic efficacy and acceptance of octenisept compared with common antiseptic mouthwashes. *Zbl Hyg Umweltmed* 200: 443-456
89. Kramer A, Müller G (2007) Microbicidal efficacy, further biological activities, tolerance and biodegradation of octenidine-dihydrochlorid. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 2: 1-5
90. Kudou Y, Obara K, Kawashima T, Kubota M, Abe S, Endu T, Komatsu M, Okuda R (2000) Addition of antibacterial agents to MMA-TBB dentin bonding systems-Influence on tensile bond strength and antibacterial effect. *Dent Mater J* 19: 65-74
91. Kumar S, Atray D, Paiwal D, Balasubramanyam G, Duraiswamy P, Kulkarni S (2010) Dental unit waterlines: source of contamination and cross-infection. *J Hospital Infect* 74: 99-111
92. Lauderdale KJ, Malone CL, Boles BR, Morcuende J, Horswill AR (2009) Biofilm dispersal of community-associated methicillin-resistant staphylococcus aureus on orthopedic implant material. *J Orthop Res* 28: 55-61

93. Langhorst SE, O'Donnell JNR, Skrtic D (2009) In vitro remineralization of enamel by polymeric amorphous calcium phosphate composite: Quantitative microradiographic study. *Dent Mater* 25: 884-891
94. Lennon AM, Wiegand A, Buchalla W, Attin T (2007) Approximal caries development in surfaces in contact with fluoride-releasing and non-fluoride-releasing restorative materials: an in situ study. *Eur J Oral Sci* 115: 497-501
95. Leung D, Spratt DA, Pratten J, Gulabivala K, Mordan NJ, Young AM (2005) Chlorhexidine-releasing methacrylate dental composite materials. *Biomaterials* 26: 7145-7153
96. Li F, Chen J, Chai Z, Zhang L, Xiao Y, Fang M, Ma S (2009) Effects of a dental adhesive incorporating antibacterial monomer on the growth, adherence and membrane integrity of *Streptococcus mutans*. *J Dent* 37: 289-296
97. Liljemark WF, Bloomquist CG, Reilly BE, Bernards CJ, Townsend DW, Pennock AT (1997) Growth dynamics in a natural biofilm and its impact on oral disease management. *Adv Dent Res* 11: 14-23
98. Liljemark WF, Bloomquist C (1996) Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med* 7: 180-198
99. L e H, Schi ott CR (1970) The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodont Res* 5: 79-83
100. Loesche WJ (1986) Role of streptococcus mutans in human dental decay. *Microbiol Rev* 50: 353-380
101. Loesche WJ, Syed SA, Laughon BE, Stoll J (1982) The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol* 53: 223-230
102. Mabrouk N, Deffuant G, Tolker-Nielsen T, Lobry C (2010) Bacteria can form interconnected microcolonies when a self-excreted product reduces their surface motility:

- Evidence from individual-based model simulations. *Theory Biosci* 129: 1-13
103. MacDonald JA, Rittmann BE (1993) Performance standards for in situ bioremediation. *Environ Sci Technol* 27: 1974-1979
104. Marjaka IW, Miyanaga K, Hori K, Tanji Y, Unno H (2003) Augmentation of self purification capacity of sewer pipe by immobilizing microbes on the pipe surface. *Biochem Eng J* 15: 69-75
105. Marsh PD (2006) Dental plaque as a biofilm and a microbial community- implications for health and disease. *BMC Oral Health* 6:14
106. Marsh PD, Martin MV (2003) *Oral Microbiology*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
107. Marsh PD (1999) Microbiological aspects of dental plaque and dental caries. *Dent Clin North Am* 43: 599-614
108. Marsh PD (1993) Antimicrobial strategies in the prevention of dental caries. *Caries Res* 27: 72-76
109. Marshall KC, Stout R, Mitchell R (1971) Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *J Gen Microbiol* 68: 337-348
110. Modak SM, Fox CL (1973) Binding of silver sulfadiazine to the cellular components of pseudomonas aeruginosa. *J Biochem Pharmacol* 22: 2391-2404
111. Moreau JL, Sun L, Chow LC, Xu HHK (2011) Mechanical and acid neutralizing properties and bacteria inhibition of amorphous calcium phosphate dental nanocomposite. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 98: 80-88
112. Moore WE, Holdemann LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Ranney RR (1983) Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans. *Infect Immun* 42: 510-515

113. Nyvad B, Fejerskov O (1987) Scanning electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 95: 287-296
114. Olsen E, Szybalski W (1949) Aerobic microbiological corrosion of waterpipes. I-II. *Acta Chem Scand* 3: 1094-116
115. Oppermann RV, Johansen JR (1989) Effect of fluoride and non-fluoride salts of copper, silver and tin on the acidogenicity of dental plaque in vivo. *Scand Dent Res* 88: 476-480
116. Park JB, Park NH (1989) Effect of chlorhexidine on the in vitro and in vivo herpes simplex virus infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 67: 149-153
117. Patters MR, Anerud K, Trummel CL, Kornmann KS, Nalbandian J, Robertson PB (1983) Inhibition of plaque formation in humans by octenidine mouthrinse. *J Periodont Res* 18: 212-219
118. Peyton BM, Charaklis WG (1995) Microbial biofilms and biofilm reactors. *Bioprocess Technol* 20: 187-231
119. Pinheiro SL, Simionato MR, Imparato JC, Oda M (2005) Antibacterial activity of glass-ionomer cement containing antibiotics on caries lesion microorganisms. *Am J Dent* 18: 261-266
120. Quirynen M, Bollen CML (1995) The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. *J Clin Periodontol* 22: 1-14
121. Quirynen M (1994) The clinical meaning of the surface roughness and the surface free energy of intra-oral hard substrata on the microbiology of the supra- and subgingival plaque: results from in vitro and in vivo experiments. *J Dent* 22: 13-16
122. Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, van Steenberghe D (1990) The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque

- formation. An in vivo study in man. *J Clin Periodontol* 17: 138-144
123. Ribeiro J, Ericson D (1991) In vitro antibacterial effect of chlorhexidine added to glass-ionomer cements. *Scand J Dent Res* 99: 533-540
124. Rodrigues JA, Marchi GA, Serra MC, Hara AT (2005) Visual evaluation of in vitro cariostatic effect of restorative materials associated with dentifrices. *Braz Dent J* 16: 112-118
125. Rosan B, Appelbaum B, Campbell LK, Knox KW, Wicken AJ (1982) Chemostat studies of the effect of environmental control on streptococcus sanguis adherence to hydroxyapatite. *Infect Immun* 35: 64-70
126. Rosan B, Malamud D, Appelbaum B, Golub E (1982) Characteristic differences between saliva-dependent aggregation and adhesion of streptococci. *Infect Immun* 35: 86-90
127. Sawhney R, Berry V (2009) Bacterial biofilm formation, pathogenicity, diagnostics and control: An overview. *Indian J Med Sci* 63: 313-321
128. Scheie AA (1994) Mechanisms of dental plaque formation. *Adv Dent Res* 8: 246-253
129. Scheld WM, Valone JA, Sande MA (1978) Bacterial adherence in the pathogenesis of endocarditis. Interaction of bacterial dextran, platelets, and fibrin. *J Clin Invest* 61: 1394-1404
130. Sedghizadeh PP, Kumar SK, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW (2008) Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg* 66: 767-775
131. Sedgley CM, Lee EH, Martin MJ, Flannagan SE (2008) Antibiotic resistance gene transfer between streptococcus gordonii and enterococcus faecalis in root canals of teeth ex vivo. *J Endod* 34: 570-574

132. Sevinç BA, Hanley L (2010) Antibacterial activity of dental composites containing zincoxide nanoparticles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 94: 22- 31
133. Shapiro S, Giertsen E, Guggenheim B (2002) An in vitro oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Caries Res* 36: 93-100
134. Shern RJ, Little WA, Kennedy JB, Mirth DB (1987) Effects of octenidine on dental plaque and gingivitis in monkeys. *J Periodontol* 58: 628-633
135. Slavkin HC (1997) Biofilms, microbial ecology and Antoni van Leeuwenhoek. *JADA* 128: 492-495
136. Slee AM, O'Connor JR (1983) In vitro antiplaque activity of octenidine dihydrochloride (WIN 41464-2) against preformed plaques of selected oral plaque-forming microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother* 23: 379-384
137. Smales RJ, Gao W (2000) In vitro caries inhibition at the enamel margins of glass ionomer restoratives developed for the ART approach. *J Dent* 28: 249-256
138. Smith RN, Andersen RN, Kolenbrander PE (1991) Inhibition of intergeneric coaggregation among oral bacteria by cetylpyridinium chloride, chlorhexidine digluconate and octenidine dihydrochloride. *J Periodont Res* 26: 422-428
139. Spacciapoli P, Buxton D, Rothstein D, Friden P (2001) Antimicrobial activity of silver nitrate against periodontal pathogens. *J Periodont Res* 36: 108-113
140. Spratt DA, Latif J, Montebugnoli LL, Wilson M (2004) In vitro modeling of dental water line contamination and decontamination. *FEMS Microbiol Lett* 235: 363-367
141. Stanley A, Wilson M, Newman HN (1998) The in vitro effects of chlorhexidine on subgingival plaque bacteria. *J Clin Periodontol* 16: 259-264
142. Stickler D (1999) Biofilms. *Curr Opin Microbiol* 2: 270-275

143. Stoodley P, Dodds I, Boyle JD, Lappin-Scott HM (1999) Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J Appl Microbiol* 85: 19s-28s
144. Stoodley P, DeBeer D, Lewandowski Z (1994) Liquid flow in biofilm systems. *Appl Environ Microbiol* 60: 2711-2716
145. Takahashi Y, Imazato S, Kaneshiro AV, Ebisu S, Frencken JE, Tay FR (2006) Antibacterial effects and physical properties of glass-ionomer cements containing chlorhexidine for the ART approach. *Dent Mater* 22: 647-652
146. ten Cate JM (2006) Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology* 94: 1-9
147. ten Cate JM (1999) Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. *Acta Odontol Scand* 57: 325-329
148. Thome T, Mayer MPA, Imazato S, Geraldo-Martins VR, Marques MM (2009) In vitro analysis of inhibitory effects of the antibacterial monomer MDPB- containing restorations on the progression of secondary root caries. *J Dent* 37: 705-711
149. Thrower Y, Pinney RJ, Wilson M (1997) Susceptibilities of actinobacillus actinomycescomitans biofilms to oral antiseptics. *J Med Microbiol* 46: 425-429
150. Tolker-Nielsen T, Molin S (2000) Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb Ecol* 40: 75-84
151. Triolo PT Jr. (2011) Antibacterial activity and physical properties of conventional glass-ionomer cements containing chlorhexidine diacetate/ cetrimide mixtures. *J Esthet Restor Dent* 23: 46-56
152. Verkaik MJ, Busscher HJ, Rustema- Abbing M, Slomp AM, Abbas F, van der Mei HC (2010) Oral biofilm models for mechanical plaque removal. *Clin Oral Invest* 14: 403-409

153. Videla HA, Characklis WG (1992) Biofouling and microbially influenced corrosion. *Int Biodeter Biodegr* 29: 195-212
154. Walker JT, Bradshaw DJ, Bennett AM, Fulford MR, Martin MV, Marsh PD (2000) Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. *Appl Environ Microbiol* 66: 3363-3367
155. Watnick P, Kolter R (2000) Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 182: 2675- 2679
156. Weckbach S, Mörnicke A, Braunwarth H, Goroncy-Bermes P, Bischoff M, Gebhard F (2011) Octenidine in combination with polymethylmethacrylate: A new option for preventing infection. *Arch Orthop Trauma Surg* 132: 15-20
157. van der Wende E, Characklis WG, Smith DB (1989) Biofilms and bacterial drinking water quality. *Wat Res* 23: 1313-1322
158. Wilson M, Patel H, Fletcher J (1996) Susceptibility of biofilms of streptococcus sanguinis to chlorhexidine gluconate and cetylpyrimidinum chloride. *Oral Microbiol Immun* 11: 188-192
159. Wilson M (1996) Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J Med Microbiol* 44: 79-87
160. Xiao YH, Ma S, Chen JH, Chai ZG, Li F, Wang Y-J (2009) Antibacterial activity and bonding ability of an adhesive incorporating an antibacterial monomer DMAE-CB. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 90B: 813-817
161. Yamamoto K, Ohashil S, Aonol M, Kokuboz T, Yamada I, Yamauchid J (1996) Antibacterial activity of silver ions implanted in SIO2 filler on oral streptococci. *Dent Mater* 12: 227-229
162. Yaman SD, Er O, Yetmez M, Karabay GA (2004) In vitro inhibition of caries-like lesions with fluoride-releasing materials. *J Oral Sci* 46: 45-50

163. Yoshida K, Tanagawa M, Atsuta M (1999) Characterization and inhibitory effect of antibacterial dental resin composites incorporating silver-supported materials. *J Biomed Mater Res* 47: 516-522
164. Zhou G, Li Y, Xiao W, Zhang L, Zuo Y, Xue J, Jansen JA (2008) Synthesis, characterization, and antibacterial activities of a novel nanohydroxyapatite/ zinc oxide complex. *J Biomed Mater Res -Part A* 85A: 929-937
165. Zimmerman BF, Rawls HR, Querens AE (1984) Prevention of in vitro secondary caries with an experimental fluoride-exchanging restorative resin. *J Dent Res* 63: 689-692
166. Zobell CE (1943) The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J Bacterio* 46:39-56

8 Publikation / Danksagung

8.1 Publikation

Auszüge der vorliegenden Arbeit wurden in der Fachzeitschrift Dental Materials publiziert:

Rupf S, Balkenhol M, Sahrhage TO, Baum A, Chromik JN, Ruppert K, Wissenbach TK, Maurer HH, Hannig M., Biofilminhibition by an experimental dental resin composite containing octenidine dihydrochloride. Dent Mater 2012, 28: 974-984.

8.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Matthias Hannig, Direktor der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde des Universitätsklinikum des Saarlandes für die Vergabe des Themas und der mir gewährten Unterstützung bedanken.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. Stefan Rupf und Herrn Zahnarzt Tim Sahrhage die mir mit ihrem fachlichen Wissen mit Rat und Tat zur Seite standen.

Bedanken will ich mich an dieser Stelle auch bei der Firma Heraeus Kulzer für die Bereitstellung der Prüfkörper und die finanzielle Unterstützung der klinisch-experimentellen Studie.

Zum Dank verpflichtet bin ich darüber hinaus Frau Martina Birke für ihre technische Unterstützung, sowie Herrn Norbert Pütz, Anatomisches Institut (Universitätsklinikum des Saarlandes), für die Anleitung am Rasterelektronenmikroskop.

Ein großes Dankeschön geht weiterhin an die an der Studie beteiligten Probanden, ohne deren zuverlässige Mitarbeit dieses Projekt nicht hätte verwirklicht werden können.

Nicht minder wichtig war für mich die unendliche Geduld meines Mannes Sascha, der mich auch in schweren Zeiten immer wieder ermunterte das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

Danke!
