

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde,

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. M. Hannig

**Die Wirkung von Aluminiumlactat und  
Chlorhexidin enthaltenden  
Zahnpastasuspensionen auf die Bildung von  
Biofilmen *in situ***

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde*

**der Medizinischen Fakultät**

**der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2024

vorgelegt von:

Lea Lehnertz

geb. am: 27.01.1998 in Bitburg

Tag der Promotion: 03.02.2025

Dekan: Prof. Dr. Matthias Hannig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Rupf

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Boehm

*In Liebe und Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
1.1	Deutsche Zusammenfassung	1
1.2	Abstract	3
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
2.1	Literaturübersicht	5
2.1.1	Epidemiologie oraler Erkrankungen	5
2.1.2	Biofilm und Biofilmmodelle	5
2.1.3	Biofilmkontrolle	7
2.1.4	Zahnpasten	8
2.1.5	Chlorhexidin	10
2.1.6	Aluminiumlactat	11
2.1.7	Fluoride	11
2.1.8	Hydroxylapatit (HAP)	12
2.1.9	Kaliumchlorid	13
2.1.10	Strontiumacetat	13
2.1.11	Papain/Bromelain	14
2.1.12	Hyaluronsäure	14
2.2	Ziel der Arbeit / Fragestellung	15
<b>3</b>	<b>Material und Methode</b>	<b>16</b>
3.1	Teilnehmende Personen	16
3.2	Herstellung der Schienen	16
3.3	Herstellung der Prüfkörper	16
3.4	Prüfsubstanzen	17
3.5	Versuchsaufbau	19
3.6	Fluoreszenzmikroskopie	19
3.7	Rasterelektronenmikroskopie	23
3.8	Statistik	26
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>27</b>
4.1	Fluoreszenzmikroskopie	27

4.1.1	Visualisierung des <i>In-situ</i> -Biofilms.....	27
4.1.2	Biofilm-Bedeckung .....	29
4.1.3	Biofilmvitalität .....	31
<b>4.2</b>	<b>Rasterelektronenmikroskopie .....</b>	<b>34</b>
4.2.1	Biofilmmorphologie.....	34
4.2.2	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX).....	40
<b>5</b>	<b><i>Diskussion</i>.....</b>	<b>46</b>
<b>5.1</b>	<b>Fragestellung .....</b>	<b>46</b>
<b>5.2</b>	<b>Studiendesign .....</b>	<b>47</b>
<b>5.3</b>	<b>Prüfkörper .....</b>	<b>47</b>
<b>5.4</b>	<b>Auswahl der Teilnehmenden .....</b>	<b>48</b>
<b>5.5</b>	<b>Darstellung und Untersuchung des Biofilms .....</b>	<b>48</b>
5.5.1	Fluoreszenzmikroskopie .....	48
5.5.2	Rasterelektronenmikroskopie .....	50
<b>5.6</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
5.6.1	Spülung mit Wasser.....	50
5.6.2	Spülung mit Basis-Paste.....	51
5.6.3	Spülung mit Chlorhexidin .....	51
5.6.4	Spülung mit Pasten.....	52
<b>5.7</b>	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i> .....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b><i>Publikation/ Danksagung</i> .....</b>	<b>68</b>
<b>7.1</b>	<b>Publikation .....</b>	<b>68</b>
<b>7.2</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b><i>Lebenslauf</i>.....</b>	<b>70</b>
<b>9</b>	<b><i>Anhang</i>.....</b>	<b>71</b>
<b>9.1</b>	<b>Ergebnisse Datensatz .....</b>	<b>71</b>
9.1.1	Bedeckung.....	71
9.1.2	Vitalität .....	72

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Deutsche Zusammenfassung

**Ziel:** In der vorliegenden *In-situ*-Studie sollte die Wirkung verschiedener Zahnpastasuspensionen auf die intraorale Biofilmbildung untersucht werden. Die Pasten enthielten neben Chlorhexidin (CHX) und Aluminiumlactat weitere Wirkstoffe wie Hydroxylapatit, Bromelain, Papain, Strontiumacetat und Kaliumchlorid. Die Verwendung von Suspensionen erfolgte mit dem Ziel, die Biofilminhibition von Inhaltsstoffen der Zahnpasten, ohne den Einfluss des Putzens der Zähne zu untersuchen.

**Material und Methode:** In der *In-situ*-Studie trugen 6 Personen Oberkieferschienen mit bovinen Schmelzprüfkörpern für 48 h. Die Teilnehmenden spülten 4-mal während der Tragezeit nach 30 min, 12 h, 24 h und 36 h. Die Biofilme konnten sich im Zeitraum von 36 h bis 48 h reetablieren. Für die Versuche wurde aus den 4 zu untersuchenden Zahnpasten Spülsuspensionen aus je 0,5 g Paste und 2 ml sterilem Wasser hergestellt, um die während des Putzvorgangs auftretende Verdünnung der Pasten durch den Speichel zu simulieren. Zusätzlich dienten Wasser und eine Basis-Paste als Negativkontrolle und CHX-Lösung (0,2 %) als Positivkontrolle. Folgende Zahnpasten wurden verwendet: Basis-Paste (Wasser, PEG32, Sorbitol, Hydroxyethylcellulose, Silicium, Titandioxid, Sodium Lauryl Sulfat (SLS)), Standard-Paste (Natriumfluorid 1450 ppm, Aluminiumlactat (0,8 %), CHX (0,05 %), Poloxamer, Aroma, Menthol, Sorbitlösung, Hydroxyethylcellulose, Silicium, Titandioxid, SLS, Natronlauge), Sensitiv-Paste (Natriumfluorid 1450 ppm, Aluminiumlactat (0,8 %), CHX (0,05 %), Strontiumacetat (2 %), Kaliumchlorid (3 %), Poloxamer, Aroma, Menthol, Sorbitlösung, Hydroxyethylcellulose, Silicium, SLS), Hydroxylapatit-Paste (Natriumfluorid, Olafur 1450ppm, Aluminiumlactat (0,8 %), CHX (0,05 %), Hydroxylapatit (5 %), Xylitol, Calciumglycerophosphat, Saccharin Natrium, Poloxamer, Aroma, Menthol, Sorbitlösung, Hydroxyethylcellulose, Silicium, SLS), Enzym-Paste (Natriumfluorid 1450 ppm, Aluminiumlactat (0,8 %), CHX (0,05 %), EDTA, Papain (0,012 %), Bromelain (0,05 %), Calciumglycerophosphat, Hyaluronsäure (0,2 %), Magnesiumhydrogencitrat, Poloxamer, Aroma, Menthol, Sorbitlösung, Silicium, Xanthan Gum, Titandioxid, Natronlauge, SLS). Nach 48-stündiger Exposition in der Mundhöhle wurde die Biofilmbedeckung der Prüfkörper mittels Vital-Fluoreszenzmikroskopie (SYTO 9: grün- vitale Bakterien, Propidiumjodid: rot- avitale Bakterien) und anschließender quantitativer Auswertung mit dem Programm Image J und einem Scoring, das den Entwicklungsstufen der Biofilme folgt, bewertet. Eine zusätzliche Analyse mittels Raster-elektronenmikroskopie gestattete eine morphologische Bewertung der Biofilme und die energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) gab Aufschluss über die in die Biofilme eingebrachten Elemente aus den untersuchten Zahnpasten.

**Ergebnisse:** Die mit den Negativkontrollen Wasser und Basis-Paste konfrontierten Prüfkörper zeigten die höchste Biofilm-Bedeckung und Vital-Fluoreszenz aller Spüllösungen. Durch die Spülung mit

CHX-Lösung (0,2 %) konnte die Bedeckung am stärksten reduziert werden. Alle vier Zahnpasten waren in der Lage, die Biofilmneubildung im Vergleich zu Wasser effektiv zu reduzieren. Unter den Pasten zeigten mit der Enzym-Paste konfrontierte Biofilme die höchste Vitalität. Zwischen der Standard-Paste und der Sensitiv-Paste konnten nur geringe Unterschiede in der Bedeckung und Vitalität festgestellt werden. Die Hydroxylapatit-Paste wies zwar im Mittel eine höhere Biofilm-Bedeckung als die anderen wirkstoffhaltigen Pasten auf, zeigte allerdings die höchsten Werte roter Fluoreszenz unter den Suspensionen. Mittels Rasterelektronenmikroskopie und energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) konnten Zahnpastarückstände in Form von Putzkörpern und Titandioxid nachgewiesen werden.

**Schlussfolgerung:** In der Studie konnte die biofilmhemmende Wirkung aller Zahnpastasuspensionen nachgewiesen werden. Dies ist vermutlich auf die Wirkung von Aluminiumlactat und Chlorhexidin zurückzuführen, die in allen getesteten Zahnpasten mit Ausnahme der Basis-Paste vorhanden waren. Die Hydroxylapatit-Paste mit Zusatz von 5 %igem Hydroxylapatit zeigte eine stärkere Biofilm-inhibierende Wirkung. Die Enzym Paste mit Zusatz von Papain, Bromelain und Hyaluronsäure konnte im Vergleich zu den anderen drei Pasten keine weitere Biofilmreduktion erzielen. Die Sensitiv-Paste hatte ebenfalls einen positiven Effekt auf die Biofilmreduktion, jedoch sind weitere Untersuchungen notwendig, um ggf. Rückschlüsse auf den Einfluss von Kaliumchlorid oder Strontiumacetat ziehen zu können. Mit den vorliegenden Zahnpasten steht ein breites Spektrum unterschiedlicher Wirkstoffkombinationen für die Mundhygiene zur Verfügung, sodass eine bessere Anpassung an individuelle Bedürfnisse erfolgen kann.

## 1.2 Abstract

**Title:** The effect of toothpaste suspensions containing aluminum lactate and chlorhexidine on the formation of biofilms *in situ*

**Objectives:** The aim of this *in situ* study was to investigate the effect of various toothpaste suspensions on biofilm formation. In addition to chlorhexidine (CHX) and aluminum lactate, the pastes contained other active ingredients such as hydroxyapatite, bromelain, papain, strontium acetate and potassium chloride. Suspensions were used with the aim of investigating the biofilm inhibition of toothpaste ingredients without the influence of tooth brushing.

**Material and Methods:** In this *in situ* study, 6 subjects wore maxillary splints with bovine enamel specimens for 48h. The subjects rinsed 4 times during the wearing period. For the tests, rinsing suspensions were prepared from the 4 toothpastes to be tested, each consisting of 0.5 g paste and 2 ml sterile water. In addition, water and base paste served as negative control, CHX (0.2 %) as positive control. The following pastes were used: base paste (aqua, PEG32, sorbitol, hydroxyethylcellulose, silica, titanium dioxide, SLS), standard paste (sodium fluoride 1450 ppm, aluminum lactate (0.8 %), CHX (0.05 %), poloxamer, flavor, menthol, sorbitol solution, hydroxyethylcellulose, silica, titanium dioxide, SLS, sodium hydroxide), sensitive paste (sodium fluoride 1450 ppm, aluminum lactate (0.8 %), CHX (0.05 %), strontium acetate (2 %), potassium chloride (3 %), poloxamer, flavor, menthol, sorbitol solution, hydroxyethylcellulose, silica, SLS), hydroxyapatite paste (sodium fluoride, olaflur 1450 ppm, aluminum lactate (0.8 %), CHX (0.05 %), hydroxyapatite (5 %), xylitol, calcium glycerophosphate, saccharin sodium, poloxamer, aroma, menthol, sorbitol solution, hydroxyethylcellulose, silica, SLS), enzyme paste (sodium fluoride 1450 ppm, aluminum lactate (0.8 %), CHX (0.05 %), EDTA, papain (0.012 %), bromelain (0.05 %), calcium glycerophosphate, hyaluronic acid (0.2 %), magnesium hydrogen citrate, poloxamer, flavor, menthol, sorbitol solution, silica, xanthan gum, titanium dioxide, sodium hydroxide, SLS). After 48 hours of exposure in the oral cavity, the test specimens were evaluated by fluorescence microscopy followed by Image J and scoring. With the additional analysis by scanning electron microscopy, energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) was able to provide information about the present elements in addition to the morphological analysis of the bacteria and the biofilm.

**Results:** Test specimens confronted with the negative controls water and base paste showed the highest biofilm coverage and vital fluorescence of all rinsing solutions. Rinsing with CHX (0.2 %) resulted in the greatest reduction in coverage. All four toothpastes were able to effectively reduce the formation of new biofilm. Among the pastes, biofilms confronted with the enzyme paste showed the highest vitality. Only minor differences in coverage and vitality were observed between the standard paste and the sensitive paste. Although the hydroxyapatite paste exhibited a higher average biofilm coverage than the other pastes containing active substances, it showed the highest values of red fluorescence

among the suspensions. In scanning electron microscopy, toothpaste residues in the form of cleaning particles and titanium dioxide were detected by means of low dispersion X-ray spectroscopy (EDX).

**Conclusion:** The study demonstrated the biofilm-inhibiting effect of all toothpaste suspensions. This is presumably due to the effect of aluminium lactate and chlorhexidine, which were present in all the toothpastes tested with the exception of the base paste. The hydroxyapatite paste with addition of 5 % hydroxyapatite showed the strongest antibacterial effect. The enzyme paste with addition of papain, bromelain and hyaluronic acid was unable to achieve any further biofilm reduction compared to the other three pastes. The sensitive paste also had a positive effect on biofilm reduction, but further investigations are necessary to be able to draw conclusions about the influence of kalium chloride or strontium acetate. The toothpastes available provide a broad spectrum of different combinations of active ingredients for oral hygiene so that they can be better adapted to individual needs.

## 2 Einleitung

### 2.1 Literaturübersicht

#### 2.1.1 Epidemiologie oraler Erkrankungen

Der Oral Health Status Report der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aus dem Jahr 2022 zeigt, dass weltweit 3,5 Milliarden Menschen von Mundkrankheiten betroffen sind. Davon leiden etwa 2 Milliarden Menschen an Karies der zweiten Dentition und 514 Millionen Kinder an Karies der ersten Dentition. Unbehandelte Karies zählt laut dem Global Burden of Disease Report von 2019 zu den häufigsten Gesundheitsbelastungen. Die Erkrankung, die in den seltensten Fällen lebensbedrohlich ist, kann für die Betroffenen mit erheblichen Belastungen verbunden sein. Zu diesen Belastungen zählen unter anderem Schmerzen, Unbehagen, mögliche Probleme bei der Nahrungsaufnahme sowie finanzielle Aufwendungen [100,111]. Auch gingivale und parodontale Erkrankungen betreffen einen großen Anteil der Bevölkerung. Laut der fünften Deutschen Mundgesundheitsstudie wurde bei 52 % der jungen Erwachsenen im Alter von 35 bis 44 Jahren in Deutschland eine moderate bis schwere Parodontitis diagnostiziert. Bei jüngeren Senioren im Alter zwischen 65 und 74 Jahren lag bei 65 % dieser Gruppe eine parodontale Erkrankung vor [27].

#### 2.1.2 Biofilm und Biofilmmodelle

Im letzten Jahrhundert konnten Forschende bahnbrechende Erkenntnisse in der oralen Mikrobiologie erarbeiten, wobei die Forschung diesbezüglich noch nicht abgeschlossen ist [142]. Das Ergebnis ist ein breites und tiefes Wissen über das orale Mikrobiom, seine Interaktion mit dem Körper und die Art und Weise, wie es die Gesundheit beeinflusst, schützt oder zur Entwicklung der genannten oralen Erkrankungen führen kann. Moderne Technologien ermöglichen heute die Untersuchung großer mikrobieller Gemeinschaften im Zusammenhang mit verschiedenen klinischen Zuständen, was zur Formulierung der Theorie der Biofilmhomöostase bzw. der Biofilmdysbiose für die Erklärung der Ätiologie der wichtigen oralen Erkrankungen Karies und Parodontitis geführt hat. Die große Menge an Daten, die im Laufe der Zeit gesammelt wurde, hat zu einem besseren Verständnis der Ätiologie oraler Erkrankungen geführt und die Entwicklung von Strategien zur Behandlung und Prävention von Munderkrankungen gefördert [29]. Es ist von großer Bedeutung, die Struktur, den Aufbau und die Funktion des oralen Biofilms zu verstehen, sowie seine Rolle bei oralen Erkrankungen in Auseinandersetzung mit dem Wirtsorganismus herauszuarbeiten. Unter oralem Biofilm versteht man eine Gemeinschaft von Bakterien, die eingebettet in einer extrazellulären Matrix auf allen nicht-epithelialen Oberflächen in der Mundhöhle vorkommen [90]. Die Mundhöhle bietet den Mikroorganismen aufgrund der hohen Feuchtigkeit, der konstanten Temperatur und der Substratzufuhr durch die Ernährung optimale

Überlebens- und Wachstumsbedingungen [91]. Die Bakterien können sich durch Bindung an die Pellikel den Zähnen anlagern. Die Pellikel wiederum entsteht durch elektrostatische Anheftung von adsorbierten Proteinen, Enzymen und Glykoproteinen aus dem Speichel [61]. Diese Verbindung wird durch eine Wechselwirkung der Calcium- und Phosphatschicht an der Schmelzoberfläche ermöglicht [58]. Die Pellikel schützt zum einen vor Erosionen und dient als Lubricant [57]. Darüber hinaus werden ihr protektive Eigenschaften durch die Proteine Lactoferrin, Cystatine und Lysoszym zugeschrieben [35]. Außerdem wird die bakterielle Adhäsion durch Amylase und prolinreiche Proteine vermittelt, die spezifische Rezeptoren darstellen [40]. Bei der initialen Adsorption, die kurz nach der Reinigung der Zahnoberfläche einsetzt, lagern sich Speichelproteine an den Zahnschmelz an, so dass sich nach etwa 3 min eine proteinreiche, aber bakterienarme Schicht bildet. Die Calciumionen der Schmelzkristallite haben bei Kontakt mit der wässrigen Elektrolytlösung des Speichels eine stärkere Tendenz in Lösung zu gehen als die Phosphationen. Dies führt aufgrund der verbleibenden Phosphationen der Schmelzoberfläche zu einer negativen Gesamtladung. Diese Oberfläche wird von einer positiv geladenen Schicht aus Calciumionen überzogen. An diese Schicht können Speichelmoleküle binden, wodurch die Pellikel nach 30-90 min eine Dicke von 100-1000 nm erreicht. Bakterien können nun initial über schwache Wechselwirkungen mit der Pellikel interagieren, wobei diese Bindung noch reversibel ist [56]. Wenn bakterielle Adhäsine, wie z. B. Lektine oder Glukane, mit der Pellikel interagieren, wird die Anheftung der Bakterien irreversibel [90]. Als Pionierkeime bezeichnet man jene Bakterien, die als erstes an die Zahnoberfläche binden. Zu ihnen gehören *Streptococcus (S.) gordonii*, *S. sanguis* und *S. mitis*. Durch die Bindung weiterer Bakterien an die Pionierkeime über rezeptorgesteuerte Adhäsion und Koadhäsion findet eine Ausreifung des Biofilms statt. Aufgrund der Wechselwirkung der Bakterien untereinander entsteht eine bakterielle Gemeinschaft [66,102]. Wichtige Bestandteile dieser bakteriellen Gemeinschaft sind die extrazellulären Polysaccharide (EPS), in die die Mikroorganismen eingebettet sind. Dabei handelt es sich um Biopolymere mikrobiellen Ursprungs, die aus Polysacchariden, Proteinen, Glykoproteinen und Glykolipiden bestehen. Sie liegen in hydratisierter Form vor und sorgen sowohl für den Zusammenhalt der Organismen als auch für die Speicherung von Wasser [46]. Die extrazelluläre Matrix besteht zu 97 % aus Wasser und ist für die Stabilität des Biofilms verantwortlich [144]. Das Gerüst der Matrix, bestehend aus Polysacchariden, kann von Bakterien mit Hilfe von Glykosyltransferase synthetisiert werden. Bakterien können nicht nur aus Zuckern Polysaccharide herstellen, sondern sind auch in der Lage diese wieder abzubauen [6].

Möchte man in Studien den Biofilm und auch die Wirkung bestimmter Substanzen auf den Biofilm untersuchen, stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Man unterscheidet hier zwischen *in vitro*, *in vivo* und *in situ* Biofilm-Modellen. Dennoch stehen Forschende auch heute noch vor Herausforderungen in diesem Bereich [77]. Die Simulation des oralen Biofilms gestaltet sich als äußerst schwierig, da im individuellen Mundmikrobiom mehrere Dutzend und im humanen Mikrobiom mehr als 700 Bakterienspezies identifiziert wurden, von denen etwa 50% bislang noch nicht kultiviert werden

konnten [1]. Neben der Zusammensetzung des Biofilms spielen auch die umgebenden Bedingungen eine bedeutende Rolle. Hierzu zählen unter anderem die im Tagesverlauf schwankende Speichelflussrate und -zusammensetzung sowie ernährungsbedingte Schwankungen des pH-Werts. Es erweist sich als nahezu unmöglich, Modelle zu entwickeln, die alle diese Faktoren gleichzeitig berücksichtigen [1,106,120]. Bei *In-vitro*-Studien handelt es sich um Versuche, die außerhalb eines lebenden Organismus in einer experimentellen Umgebung durchgeführt werden. Die Durchführung findet häufig an Monokulturen oder auch planktonischen Bakterien statt, die im Vergleich zum oralen Biofilm keine vergleichbare Resistenz gegenüber antimikrobiellen Einflüssen aufweisen. Aufgrund dessen können Ergebnisse aus *In-vitro*-Studien häufig nicht *in vivo* bestätigt werden- sie finden allerdings Verwendung für präklinische Versuchsreihen [53]. Im Rahmen von *In-situ*-Modellen zur Untersuchung des oralen Biofilms hat sich die Verwendung von humanen oder bovinen Schmelz- und Dentinprüfkörpern oder auch von Glasprüfkörpern etabliert, die über Kunststoffschienen in der Mundhöhle platziert werden [13,143]. Auf diese Weise können Biofilme direkt in der natürlichen Umgebung der Mundhöhle generiert werden [58]. Allerdings muss auch hier erwähnt werden, dass die Reproduzierbarkeit durch Unterschiede zwischen den Teilnehmenden eingeschränkt ist [124], da sich Ernährungs- und Mundhygieneverhalten sowie die immunologische Situation interindividuell stark unterscheiden. Wünschenswert wäre ein *In-vivo*-Modell, bei dem die Proben direkt aus der Mundhöhle entnommen oder ausgewertet werden könnte. Allerdings gestaltet sich eine Analyse der Ergebnisse aufgrund der hohen interindividuellen lokalen Variabilität und unzureichender Biofilmmasse als äußerst schwierig [117].

### 2.1.3 Biofilmkontrolle

Orale Mikroorganismen spielen sowohl für die allgemeine Gesundheit als auch für die Pathogenese von Erkrankungen wie Karies, Gingivitis und Parodontitis eine wichtige Rolle. Besteht ein symbiotisches Gleichgewicht, haben die Bakterien neben ihrer Schutzfunktion eine positive Beziehung zum Wirt. Bei einem Ungleichgewicht, bezeichnet als Dysbiose, kommt es jedoch zu einer Proliferation pathogener Spezies. Auswirkungen können unter anderem die Entstehung von Karies, Gingivitis und Parodontitis sein [76]. Diese Dysbiose ist sowohl durch einen Anstieg der Biofilmmenge als auch dem vermehrten Auftreten pathogener Mikroorganismen gekennzeichnet. Ziel einer sinnvollen Biofilmkontrolle ist es daher, negative Entwicklungen durch eine quantitative Reduktion des Biofilms zu vermeiden. Dies erfolgt vor allem durch die regelmäßige Zahnreinigung und wird durch chemische Substanzen in Mundspülungen und in Zahnpasten unterstützt [78]. Unter Plaquekontrolle versteht man die regelmäßige Entfernung und Vorbeugung von Ansammlung von Biofilmen auf den Zähnen und anderen nicht-epithelialen Oberflächen, wie z. B. Füllungen, Implantaten oder Prothesen [133]. In der aktuellen S3-Leitlinie zum mechanischen Biofilmmanagement werden verschiedene Aspekte der Plaquekontrolle hervorgehoben. Für eine effektive Biofilmentfernung kann die Verwendung elektrischer Zahnbürsten empfohlen werden, die durch eine Interdentalraumreinigung, bevorzugt durch Zwischenraumbürsten, ergänzt werden soll. Für die Verwendung von Zahnpasta wird bisher kein zusätzlicher

Einfluss zur mechanischen Plaque-Reduktion durch die Zahnbürste gesehen, sie wird aber aufgrund kariespräventiver Aspekte, der Zuführung von Fluorid, und der Akzeptanz durch den Verbraucher, hier werden der Geschmack und frischer Atem genannt, empfohlen [37]. Obwohl die mechanische Plaquekontrolle eine Schlüsselrolle bei der Biofilmkontrolle spielt [142], sollte sie durch chemische Mittel ergänzt werden [38]. Zur Biofilmkontrolle gibt es viele antimikrobielle Wirkstoffe, die in Zahnpasten oder Mundspüllösungen eingesetzt werden können [91].

### 2.1.4 Zahnpasten

Zahnpasten werden seit mehreren tausend Jahren genutzt. Es wird angenommen, dass die ersten Formulierungen 3000-5000 vor Christus aus Ochsenhufen, Myrrhe, Eierschalen und Bimsstein hergestellt wurden. Etwa 1000 Jahre später fügten die Perser Austernschalen mit Gips und Kräutern hinzu. Die Römer waren anschließend die Ersten, die, wahrscheinlich um den Mundgeruch zu verbessern, Aromastoffe hinzugaben. Das größte Problem bei den antiken Zahnpasten scheint die hohe Abrasivität und der schlechte Geschmack gewesen zu sein. Im 18. Jahrhundert erfolgte dann die Entwicklung durch Mediziner, Zahnärzte und Chemiker. Ein Durchbruch für die Kariesprävention konnte 1956 erreicht werden, als die erste Zahnpasta mit Fluorid auf den internationalen Massenmarkt gebracht wurde. Im Laufe der Jahre hat sich neben der Formulierung auch die Bioverfügbarkeit von Fluoriden verbessert und die Abrasivität wurde reduziert [69]. Inzwischen sind Zahnpasten Kosmetikprodukte für verschiedenste Anwendungsgebiete, wie beispielsweise zur Prävention von Karies, Gingivitis, Parodontitis und Erosionen sowie zur Linderung von Hypersensibilitäten. Dennoch scheint die Entwicklung noch nicht abgeschlossen zu sein. Eine Verbesserung, vor allem im Hinblick auf die Substantivität der aktiven Inhaltsstoffen wird angestrebt [84]. Ebenso werden ökologische Aspekte in den Fokus genommen.

Eine Einteilung der Inhaltsstoffe kann in inaktive und aktive Inhaltsstoffe erfolgen. Unter aktiven Inhaltsstoffen versteht man präventiv oder therapeutisch wirkende Mittel, die je nach Anwendungsgebiet variieren und die in den folgenden Kapiteln genauer erläutert werden sollen. Zu den inaktiven Inhaltsstoffen zählen Substanzen, die unter anderem für die Haltbarkeit, den Geschmack, die Rheologie, den Abrieb, die Schäumung und die Farbe verantwortlich sind. Abrasionsstoffe gelten als traditionelle Hilfsstoffe und tragen in zweiter Linie zur Rheologie bei. In der Produktion muss diesbezüglich ein Mittelweg zwischen guter Reinigungsfähigkeit und wenig Abrasion auf die Zahnhartsubstanz gefunden werden. Hier kommen hauptsächlich hydratisiertes Siliciumdioxid, Kalziumkarbonat, Dikalziumphosphat-Dihydrat, Kalziumpyrophosphat, Natriummetaphosphat, Aluminiumoxid, Perlit, Nano-Hydroxylapatit und Natriumkarbonat zum Einsatz. Um eine optimale Abrasionswirkung zu erzielen, müssen die Partikelhärte, -form, -größe, -größenverteilung und -konzentration berücksichtigt werden. Tenside werden in der Zahnpasta ebenfalls eingesetzt, um eine schäumende Wirkung zu erzielen und gleichzeitig eine intraorale Dispersion zu bewirken. Sie mizellieren hydrophobe Inhaltsstoffe, wie zum

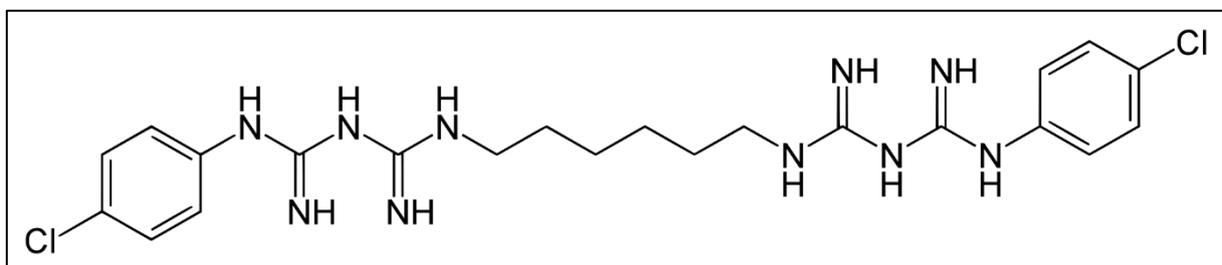
Beispiel Geschmacksstoffe, und können anionisch, kationisch, nichtionisch oder amphoter vorliegen. Der am häufigsten verwendete Vertreter ist Natrium Lauryl Sulfat (SLS), das ein anionisches Tensid darstellt [84]. Neben den genannten positiven Effekten kann SLS bei Patienten mit rezidivierenden aphthösen Ulzera negative Folgen haben, da es eine Abschuppung der Mundschleimhaut verursachen kann. Studien haben gezeigt, dass die Verwendung von SLS-freier Zahnpasta bei diesen Patienten die Anzahl und Dauer von Läsionen reduziert [5]. Darüber hinaus kann das Tensid Desquamationen der Mundschleimhaut verursachen, was zu einer aphtösen Stomatitis führen kann [50]. Aufgrund der potenziell reizenden Wirkung dieses Tensids scheint es naheliegend Alternativen zu finden, die diese Nebenwirkungen nicht aufweisen. Eine genutzte Substanz ist hier das pflanzliche Saponin. Bei Saponinen handelt es sich um Glykoside, die eine oder mehrere Zuckerketten enthalten, die an ein Triterpen- oder Steroid-Aglykon-Gerüst gebunden sind. In der Lebensmittel-, Kosmetik- und Pharmaindustrie finden sie in zunehmendem Maße Verwendung [36]. Im Vergleich zu SLS ist beim Einsatz von Saponinen die schäumende Wirkung zwar geringer, jedoch kann die reizende Wirkung reduziert sein [36].

Stoffe, die zur Aufrechterhaltung der Viskosität und Rheologie eingesetzt werden, haben die Aufgabe, durch Erzeugung einer Gelphase die Inhaltsstoffe der Zahnpasta zum einen gleichmäßig zu verteilen und zum anderen diese auch funktionsbereit zu halten. Sie sind für die Fließfähigkeit und die Stabilität zuständig. Die gebräuchlichsten Stoffe sind Carboxymethylcellulose, Hydroxymethylcellulose, Carrageenan und Xanthan. Zur Vermeidung von Verdunstung und Wasserabscheidung werden Feuchthaltemittel verarbeitet. Sie sorgen außerdem für ein glattes und glänzendes Aussehen. Aufgrund der geringen Kosten und der guten Kompatibilität werden neben Wasser meistens Glycerin und Sorbitol eingesetzt. Wasser dient daneben als wichtiges Lösungsmittel für anorganische Wirkstoffe, vor allem für Fluoride. Für einen angenehmen Geschmack werden häufig Minze, Kräuter oder Zitrone eingesetzt, die den Geschmack von Tensiden überdecken und für einen frischen Atem sorgen sollen. Daneben werden zur Verbesserung des Geschmacks Süßungstoffe wie Natriumsaccharin eingesetzt. Für die Akzeptanz von Verbrauchern ist neben dem Geschmack auch die Farbe der Zahnpasta wichtig. Gewünscht wird eine weiße Zahnpasta, die oft mit verschiedenen Farbstreifen versehen wird [84].

In der folgenden Literaturübersicht sollen die aktiven Inhaltsstoffe, die in den zu testenden Pasten enthalten sind, genauer erläutert werden.

## 2.1.5 Chlorhexidin

Eines der wichtigsten Mittel für die Biofilmkontrolle ist das Polybiguanid Chlorhexidin (CHX). Es wurde im 20. Jahrhundert bei der Suche nach einem Antimalariamittel dargestellt und stellte sich wenige Jahre später als antimikrobieller Wirkstoff heraus. Nach der 1970 veröffentlichten Studie, die zeigte, dass CHX-Spülungen die Biofilmbildung effektiv verhindern [85], erweiterte sich das Einsatzgebiet des Mittels im medizinischen, zahnmedizinischen und pharmazeutischen Bereich. CHX zählt zu den kationischen Bisbiguaniden und ist eine starke Base. Es handelt sich um ein symmetrisches Molekül mit vier Chlorphenolringen und zwei Biguanidgruppen, die durch eine zentrale Hexamethylenbrücke verbunden sind. CHX kann als Digluconat, Acetat oder in Form von Hydrochloridsalzen vorliegen. Bei physiologischem pH-Wert findet eine Dissoziation des Salzes statt und ein positives Chlorhexidin-Dikation wird freigesetzt. Aufgrund seiner positiven Ladung kann CHX an negativ geladenen Oberflächen binden und dadurch die Membranintegrität von Bakterien verändern. Es bindet an die Phospholipide der inneren Membran und kann die Permeabilität herabsetzen, wodurch Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht, wie etwa Kaliumionen, austreten können [93]. Je nach Konzentration des Wirkstoffs kann eine bakteriostatische oder eine bakterizide Wirkung erzielt werden. Die bakteriostatische Wirkung bei niedrigen Konzentrationen basiert auf der Veränderung des osmotischen Gleichgewichts der Bakterienzelle, wodurch die Freisetzung von Molekülen mit geringem Gewicht gefördert wird. Die bakterizide Wirkung bei höheren Konzentrationen beruht auf der Fähigkeit, die Permeabilität der Zellmembran zu erhöhen, wodurch intrazelluläre Bestandteile wie Kalium freigesetzt werden. Dadurch wird die Proteinstruktur der Zelle verändert und die Zytoplasmamembran fällt aus [131]. CHX ist wirksam gegen grampositive und gramnegative Bakterien sowie gegen Pilze und fakultative Anaerobier [131]. Es kann auch mit anderen Substanzen mit negativ geladener Oberfläche interagieren, was zu einer Bindung mit Speichelproteinen führen kann und somit die Bildung der Pellicel stört. Darüber hinaus kann CHX an die bereits gebildete Pellicel sowie an Hart- und Weichgewebe binden. Die Wirkdauer beträgt mehr als 12 h [92,93]. Die Wirkdauer einer Substanz *in situ* wird als Substantivität bezeichnet und ist ausschlaggebend für die Effektivität *in situ* [20].



**Abbildung 1: chemische Struktur CHX (<https://de.wikipedia.org/wiki/Chlorhexidin#/media/Da-tei:Chlorhexidin.svg>)**

In der Zahnmedizin ist CHX vielseitig einsetzbar. Verwendet wird es beispielweise zur adjuvanten Plaquekontrolle, zur postoperativen Biofilminhibition, für die Behandlung von Gingivitis und Parodontitis, bei Patienten, die nicht fähig zu einer adäquaten Mundhygiene sind und bei Ulzerationen. Die

Substanz kann in verschiedenen Formen angewendet werden, wie zum Beispiel in Mundspüllösungen, Sprays, Zahnpasten, Gelen, Lacken und in Trägern mit langsamer Freisetzung [93]. Nebenwirkungen sind in zahlreichen Studien beschrieben worden. Am häufigsten treten Verfärbungen, vor allem auf der Zahnhartsubstanz approximal, bukkal, auf freiliegenden Wurzeloberflächen sowie auf Füllungen auf. Einige Patienten bemängeln den Geschmack der Substanz und beschreiben Geschmacksempfindungsstörungen sowie einen brennenden Mundraum und eine brennende Zunge. In Einzelfällen werden Schmerzen sowie Schwellungen in der Mundhöhle beschrieben [47,48].

### 2.1.6 Aluminiumlactat

In den Zahnpasten der vorliegenden *In-situ*-Studie ist jeder zu untersuchenden Zahnpasta neben CHX auch Aluminiumlactat beigelegt. Aluminiumlactat ( $C_9H_{15}AlO_9$ ) ist ein Salz der Milchsäure mit eiweißkoagulierenden, adstringierenden und hämostatischen Eigenschaften [45]. Durch die Präzipitation von Proteinen kann der adstringierende Effekt erklärt werden, wodurch die entzündete Gingiva kurzzeitig abschwillt und die Reinigung der zuvor von ihr bedeckten Zahnoberflächen ermöglicht wird. [22]. Es wird vermutet, dass das Salz in der Lage ist, eine koagulierende Membran zu bilden, die die Gingiva für eine kurze Zeit vor exogenen Reizen schützt [45]. Es gilt als entzündungshemmend und schmerzstillend [51]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Aluminiumlactat in einer Kombinationspaste mit CHX akute Gingivitis und Parodontitis bekämpfen kann [75]. Darüber hinaus besitzt das Salz antimikrobielle Eigenschaften und zeigt eine Hemmung der initialen Biofilmbildung. Insbesondere in Kombination mit CHX konnte eine signifikante Inhibition der Biofilmbildung festgestellt werden [82,129]. Neben diesen Eigenschaften kann Aluminiumlactat auch bei Hypersensibilitäten eingesetzt werden. Es kommt zur Ausfällung von Eiweißen in den Dentintubuli, sodass die Übertragung des Reizes unterbrochen wird und somit eine Desensibilisierung überempfindlicher Zahnhälse stattfindet [65].

### 2.1.7 Fluoride

Fluoride zählen zu den wichtigsten Substanzen in Mundhygieneprodukten. Sie sind maßgeblich für den weltweit zu beobachtenden Rückgang der Kariesprävalenz verantwortlich [19]. Fluoride sind Salze der Fluorwasserstoffsäure und treten sowohl in der Umwelt als auch in jedem Organismus auf [136]. Ein bedeutender Meilenstein für ihre Anwendung bei der Kariesprophylaxe in Zahnpasten kann ins 20. Jahrhundert datiert werden, als die erste fluoridierte Zahnpasta höchstwahrscheinlich 1955 in Amerika von Procter & Gambia verkauft wurde. Die positive Wirkung von Fluoriden für die Kariesprävention konnte in klinischen Studien nachgewiesen werden. Im Vergleich zu nicht fluoridhaltigen Zahnpasten konnte sowohl bei Zähnen der 1. Dentition als auch bei Zähnen der 2. Dentition eine Verringerung des Auftretens neuer Karies beobachtet werden [134]. Fluoride können in verschiedenen Formen in Zahnpasten enthalten sein. Man unterscheidet ionisch gebundenes Fluorid und kovalent gebundenes Fluorid, wobei man die ionischen Verbindungen nochmals in anorganisch und organisch

unterteilen kann. Natrium- und Zinnfluorid kann zum anorganischen eingruppiert werden, Aminfluorid zählt zum organischen Fluorid. Zum kovalent gebundenen Fluorid zählt Natriummonofluorophosphat [7,84,141]. Liegt in dentalen Biofilmen ein Ungleichgewicht zwischen De- und Remineralisierung vor und die Demineralisierung überwiegt, resultiert ein Herauslösen von Anteilen des Zahnschmelzes. Das Gleichgewicht wird durch das Hinzufügen von Fluorid-, Calcium- und Phosphationen in Richtung der Remineralisation beeinflusst [84].

Wird beim Zähneputzen eine Zahnpaste mit Fluorid verwendet, wird das Fluorid in den Speichel freigesetzt und diffundiert sowohl in die Pellikel und mikrobielle Biofilme, als auch in die Zahnhartsubstanzen und in die Mundschleimhaut. In Zahnpasten wird Natriumfluorid, Zinnfluorid oder Aminfluorid zugesetzt [107]. Eine wichtige Rolle bei den De- und Remineralisationsprozessen spielt der pH-Wert. Ist die Säureproduktion in der Plaque nach Nahrungsaufnahme erhöht, senkt sich durch die erniedrigten Calcium- und Phosphatkonzentrationen der pH-Wert. Fluorapatit, das nach Fluoridzufuhr gebildet wird, ist bis zu einem pH-Wert von 4,7 stabil und kann im sauren Milieu schneller gebildet werden als Calciumphosphat, was die Grundlage für die Remineralisierung mit Fluorid darstellt [7].

### 2.1.8 Hydroxylapatit (HAP)

Obwohl Behandlungen mit Fluoriden den beständigsten Nutzen bei der Verhinderung von Kariesentstehung und der Remineralisierung von Anfangsläsionen zu haben scheinen, ist mittlerweile die Wirksamkeit von weiteren Stoffen für die Kariesprävention untersucht worden [8]. Die Wirkung von Fluoriden wird als Goldstandard angesehen, an denen andere Remineralisierungssysteme gemessen werden [7]. Obwohl *in-situ*-Studien in der Vergangenheit gezeigt haben, dass Hydroxylapatit eine Remineralisierung von Initialkaries bewirken und Demineralisation verhindern kann [8], wird die kariesprotektive Wirkung der Substanz in Frage gestellt. Es gibt mehrere Studien und Metaanalysen, die die Wirkung von Fluoriden mit der von Hydroxylapatit (HAP) vergleichen. In der aktuellen Meta-Analyse von Wierichs et al. konnte keine Evidenz für die Wirksamkeit von Nano-HAP gefunden werden [138], jedoch wird in den Übersichtsarbeiten von Anil et al. und Limeback et al. die positive Wirkung von Hydroxylapatit hervorgehoben. Nach Anil et al. berichten die meisten der untersuchten Studien über eine Vielzahl von therapeutischen und präventiven Effekten im Hinblick auf die Remineralisation, eine verminderte Demineralisation und die Kariesprävention [9]. Auch Limeback et al. behaupten eine geringere Kariesinzidenz durch Hydroxylapatit, insbesondere bei Kindern [83].

Hydroxylapatit ist ein Mineral mit hexagonaler Kristallstruktur und der Summenformel  $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$  [108], das neben Hydroxid-Ionen auch Calcium- und Phosphat Ionen enthält und im menschlichen Körper Bestandteil von Zähnen und Knochen ist [55]. Als Nanopartikel mit einer Größe von etwa 20 nm kann es sowohl mit der Schmelzoberfläche als auch mit den Mikroorganismen interagieren [59,62,71]. Hydroxylapatit hat das Potential, den Zahn zu remineralisieren [67,71], wobei eine Konzentration von 10 % HAP in Zahnpasten optimal zu sein scheint [68]. Nano-HAP ist klein genug,

um mit der Bakterienmembran zu interagieren und es konnten antiadhäsive Eigenschaften nachgewiesen werden [59]. Sowohl mit 5 %igem als auch mit 8 %igem Hydroxylapatit konnte eine signifikant reduzierte Biofilmbildung und Biofilmreduktion aufgezeigt werden [82,101]. Die Kristalle liegen in Form von Prismen vor und sind etwa 100-1000 nm lang, 68 nm breit und 26 nm dick. 1970 wurde es erstmals von der NASA bei Astronauten eingesetzt, die durch die Schwerkraft Mineralien aus Knochen und Zähnen verloren hatten. In Japan sind Zahnpasten mit Hydroxylapatit seit 1980 auf dem Markt und es wurde 1993 als antikariöses Mittel deklariert [26]. Erst 2006 wurde in Europa eine Zahnpasta mit HAP auf den Markt gebracht. Da Hydroxylapatit im menschlichen Körper vorliegt und eine funktionelle Ähnlichkeit mit Zähnen und Knochen aufweist, ist das Material sehr biokompatibel, was für medizinische Anwendungen von großem Interesse ist. Neben der Verwendung in der Chirurgie zur Auffüllung von Knochendefekten, wird es in der Zahnmedizin zur Förderung der Remineralisation eingesetzt. Es kann in Form von Nanopartikeln mit einer Größe von 0,1-100 nm zum Einsatz kommen oder in Mikrocluster Form vorliegen [26,71].

### 2.1.9 Kaliumchlorid

Kaliumchlorid ist das Kaliumsalz der Salzsäure und wird in der Zahnmedizin hauptsächlich in Zahnpasten zur Behandlung von überempfindlichen Zähnen angewendet. Zur Behandlung von Dentinhypersensibilität existieren zwei Ansätze: die Blockierung der Nervenreaktion oder die Okklusion der Dentintubuli [11]. Kaliumchlorid wirkt, indem es entlang der Tubuli zur Pulpa diffundiert und dort die Reaktion der A-beta und A-delta Fasern unterdrückt [2]. In vielen Studien wird eine signifikante Reduktion der Hypersensibilität postuliert. Es konnte bestätigt werden, dass Kaliumchlorid zu einer Verringerung der Sensibilität führt und die Empfindlichkeit gegenüber Berührungs- und Luftreizen herabsetzt [31,94,104].

### 2.1.10 Strontiumacetat

Neben Kaliumchlorid wird in der Zahnmedizin Strontiumacetat zur Behandlung von Dentinhypersensibilitäten eingesetzt. Strontiumacetat ist das Strontiumsalz der Essigsäure und seine Wirkung beruht auf der Tubulusokklusion, die sich in mehreren Studien bestätigt hat. Eine Studie, die die Rasterelektronenmikroskopie mit zusätzlicher EDX-Analyse nutzte, konnte lediglich das Vorhandensein von Strontium in den Tubuli feststellen, jedoch keine Tubulusokklusion [2]. Eine Metaanalyse von Grünberg et al. bestätigt die Wirksamkeit von Strontiumacetat. Der Wirkstoff kann die Dentinhypersensibilität signifikant reduzieren und somit eine Schmerzlinderung bewirken. Bei Vorliegen von Dentinüberempfindlichkeit wird eine tägliche Anwendung von Strontiumacetat empfohlen [52]. Eine weitere Übersichtsarbeit bestätigte ebenfalls eine Verbesserung bei Luftapplikation, des Tastgefühls und der selbst gerichteten Messungen durch die Anwendung von Strontiumacetat [110].

### 2.1.11 Papain/Bromelain

Papain und Bromelain sind aus Früchten gewonnene Enzyme, die seit Jahrzehnten in der Medizin eingesetzt werden. In der Zahnmedizin werden sie unter anderem als Weißmacher in Zahnpasten verwendet [72,73]. Bromelain ist eine Cysteinprotease und wird aus der Schale oder dem Stamm der Ananas gewonnen [33]. Es wurde 1891 entdeckt und ist in der Lage, die Spaltung von Proteinen in Aminosäuren zu katalysieren. Es besitzt fibrinolytische, antithrombotische, entzündungshemmende und antiödematöse Eigenschaften und hat zahlreiche Anwendungen im zahnmedizinischen und medizinischen Bereich. Im medizinischen Bereich kann es zur Behandlung von Sinusitis, Bronchitis, Angina pectoris, chirurgischen Traumata, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diarrhoe und Arthrose eingesetzt werden [25]. In der Zahnmedizin wurde es zunächst zur Überkappung der Pulpa und als Medikament in der Endodontologie eingesetzt. Heute wird es allerdings hauptsächlich Zahnpasten zugesetzt, um einen Bleicheffekt zu erzielen und um sich die entzündungshemmende Wirkung zu Nutze zu machen [3,72]. Außerdem wird es nach Entfernung von Weisheitszähnen zur Reduktion von Schmerzen, Schwellungen und Entzündungen empfohlen [105].

Papain ist ein Enzym, das aus der Papayafrucht, genauer gesagt aus dem Milchsaft der Frucht, gewonnen wird. Es gehört als pflanzliches, proteolytisches Enzym zur Familie der Cysteinproteasen und kann organische Moleküle aus Aminosäuren spalten. In der Medizin wird es seit langem zur Behandlung von Sportverletzungen, Traumata und Allergien eingesetzt [39]. Papain wirkt analgetisch und entzündungshemmend und kann bei Sinusitis und Kopfschmerzen eingesetzt werden [89]. In der Zahnmedizin wird in einigen Studien berichtet, dass Papain für biochemische oder chemomechanische Dentinexkavationsverfahren eingesetzt werden kann [86,109].

### 2.1.12 Hyaluronsäure

Hyaluronsäure (HA) ist ein hochmolekulares Glykosaminoglykan mit einem Molekulargewicht von 4.000-20.000.000 Da, das natürlicherweise als Bestandteil der extrazellulären Membran von Bindegewebe, Synovialflüssigkeit und anderen Geweben vorkommt. Es handelt sich um eine makromolekulare Kette von Disacchariduntereinheiten, die aus Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin bestehen [23].

Hyaluronsäure wird seit vielen Jahren in der Medizin, Pharmakologie und Kosmetik eingesetzt. In der Dermatologie findet der Wirkstoff Anwendung als Dermalfiller, in der Chirurgie zur Verhinderung von Narbenbildung und zur Verbesserung der Wundheilung. In der Orthopädie kann Hyaluronsäure zur Behandlung von Arthrose und rheumatischer Arthritis angewendet werden. In der Zahnmedizin findet HA hauptsächlich Anwendung in der Parodontologie. Neben der entzündungshemmenden Wirkung hat der Wirkstoff auch antiödematöse und antioxidative Eigenschaften. Hyaluronsäure ist in der Lage, Prostaglandine, Metalloproteinasen und andere bioaktive Moleküle zu binden, was die entzündungshemmende Wirkung erklärt. Durch die intra- und extrazelluläre Interaktion kann die

Hyaluronsäure mit Wachstumsfaktoren interagieren und somit den osmotischen Druck regulieren, wodurch die strukturelle und homöostatische Integrität des Gewebes erhalten wird. Zusätzlich ist HA in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies abzufangen und als Antioxidans durch die Stabilisierung des Gewebes zu wirken [30]. Verschiedene Studien belegen den positiven Effekt der Hyaluronsäure in der Parodontologie bei der Behandlung von Patienten mit Gingivitis und Parodontitis. In einer *In-vitro*-Studie wurde gezeigt, dass HA sowohl die Biofilmbildung als auch das Wachstum von *Porphyromas gingivalis*, einem der Schlüsselkeime von parodontalen Erkrankungen, in ähnlichem Maße unterdrücken kann wie CHX [4]. Bei Patienten mit parodontalen Erkrankungen konnten in frühen Stadien die Anwesenheit von niedermolekularem HA festgestellt werden, das Gewebeschädigungen signalisieren und somit Immunzellen mobilisieren kann. Im Gegensatz dazu kann hochmolekulares Hyaluron die Immunreaktion unterdrücken und starke Entzündungen hemmen [23]. In anderen Studien wurde gezeigt, dass die zusätzliche Verabreichung von Hyaluron in Form von Gel nicht nur zu einer Verbesserung der Gingivitis [70], sondern auch zu einer Reduzierung verschiedener Scores, wie Blutung auf Sondierung, Sondierungstiefen oder klinischem Attachmentverlust nach der subgingivalen Reinigung führen kann [115].

## 2.2 Ziel der Arbeit / Fragestellung

Ziel der vorliegenden Studie war es, mit Hilfe eines *In-situ*-Biofilmmodells die Wirkung verschiedener Zahnpasten in Form von wässrigen Suspensionen auf die Bildung und die Vitalität von intraoralen Biofilmen zu untersuchen. Neben CHX und Aluminiumlactat waren den Zahnpasten zusätzliche Wirkstoffe, wie Hydroxylapatit, Bromelain, Papain, Strontiumacetat und Kaliumchlorid beigefügt, wobei geprüft werden sollte, ob hier auch eine zusätzliche Hemmung der Biofilmbildung oder Veränderungen der Biofilmvitalität resultieren. Die Untersuchung konzentrierte sich auf die Biofilmneubildung und die Biofilmvitalität durch Anwendung von Suspensionen der Zahnpasten. Die Anwendung als Suspension sollte zum einen eine kontrollierte Konzentration der Substanzen sicherstellen und zum anderen die Wirkung des Putzens der Zähne vermeiden, da bisher kaum Studien zur antimikrobiellen Aktivität von Zahnpasten in der Mundhöhle vorliegen. Als Negativkontrollen wurden Wasser und eine Basis-Paste ohne aktive Wirkstoffe genutzt. Die Auswertung sollte neben der Fluoreszenzmikroskopie zur Bestimmung der Bedeckung und Vitalität jedes Prüfkörpers um die Rasterelektronenmikroskopie zur genaueren morphologischen Beschreibung der Bakterien und des Biofilms erweitert werden.

## 3 Material und Methode

### 3.1 Teilnehmende Personen

Bei den Teilnehmenden handelte es sich um 3 Frauen und 3 Männer (n=6) mit einem Altersmedian von 25,5 und einer Range von 31, die im zahnmedizinischen Bereich tätig sind. Die Testpersonen waren entweder Studierende der Zahnmedizin oder Mitarbeitende der Klinik für Zahnerhaltung des Universitätsklinikum des Saarlandes. Sie wiesen eine gute Mundhygiene und einen unauffälligen allgemeinen Gesundheitszustand auf. Bei allen Probanden lagen ein kariesfreies Gebiss und gesunde parodontale Zustände vor. Eine Antibiotikagabe in den letzten 6 Monaten konnte ausgeschlossen werden.

Die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigte das Versuchsprotokoll und erklärte, dass weder berufsrechtliche noch ethische Bedenken gegen die Studie bestehen (Ethikvotum Kenn.-Nr. 101/22, erweitert Kenn.-Nr. 198/22).

### 3.2 Herstellung der Schienen

Nach einer Alginatabformung im Oberkiefer wurde ein Gipsmodell zur Herstellung der Schienen angefertigt. Mit Hilfe von Tiefziehfolien (Scheu-Dental, Iserlohn, Deutschland, Maße: 125 mm x 125 mm x 1 mm) und Tiefziehgeräten (Erkopress ES 2004, Erkodent GmbH, Pfalzgrafenweiler, Deutschland) wurden anschließend die Schienen aus Kunststoff hergestellt. Sie wurden jeweils für den 1. und 2. Quadranten mit einer Ausdehnung vom 1. Prämolare bis zum 2. Molare beidseitig angepasst, um den Tragekomfort zu erhöhen und weder die Phonetik noch die Ästhetik einzuschränken. Zur besseren Retention des später aufzutragenden Silikons wurden zusätzlich Retentionsperforationen bukkal angebracht.

### 3.3 Herstellung der Prüfkörper

Grundlage der Schmelzprüfkörper stellten bovine Zähne dar. Hergestellt wurden diese nach Extraktion unterer Frontzähne der 2. Dentition von Rindern des Schlachthofes in Zweibrücken. Hierbei wurden nur die Labialflächen verwendet, aus denen mit einer Trennschleifmaschine (Woco 50, Conrad GmbH, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland) rechteckige Rohlinge zurechtgeschnitten wurden. Diese wurden anschließend mit einer Nassschleifmaschine (Phoenix 3000 Variable Speed Grinder-Polisher, Illinois, USA) und Schleifpapier (wasserfestes Silikon-Carbid-Schleifpapier 240 Grit – 2500 Grit, Buehler, Düsseldorf, Deutschland) bearbeitet. Für die Form der Prüfkörper wurde eine rechteckige Form mit einer Länge von ca. 5 mm und einer Mindestschichtstärke von 1 mm gewählt. So konnte einerseits die Retention im Silikon und andererseits eine leichtere Handhabung mit der Pinzette gewährleistet werden. Anschließend erfolgte eine Politur mit Schleifpapier in aufsteigender Körnung bis P2500. Zur Beurteilung der Probenoberfläche wurde das Lichtmikroskop (Zoom-Stereomikroskop)

SMZ 140, Motic GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit 10facher Vergrößerung eingesetzt. Wurden Prüfkörper auf Vorrat hergestellt, erfolgte eine Lagerung in 0,1 %iger Thymol Lösung (Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg, Deutschland) bei 4 °C. Unmittelbar vor der Verwendung für die Versuche wurden sie erneut mit P2500 Körnung aufpoliert. Anschließend fand, anhand eines Reinigungsprotokolls, eine Reinigung und Desinfektion statt. Die Prüfkörper wurden 3 min lang in 3%iger Natriumhypochlorit- Lösung (DAC 500ml, Hedinger, Stuttgart, Deutschland) auf einem Wippschüttler (Rocky®, Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau, Deutschland) gereinigt. Nach anschließendem Abspülen unter fließendem Wasser kamen die Prüfkörper für 5 min in demineralisiertes Wasser in einem Ultraschallbad (Sonorex RK 100 H, Bandelin, Berlin, Deutschland). Danach erfolgte die Desinfektion mit 70 %igem Isopropylalkohol für 15 min auf dem Wippschüttler. Nach anschließendem Spülen mit sterilem Wasser wurden die Prüfkörper für mindestens 6 h bei 4 °C in sterilem Wasser gelagert. Für die Durchführung der Versuche wurden die Prüfkörper mittels Silikon (President light body, Coltene/Whaledent GmbH und Co.KG, Langenau, Deutschland) auf die zuvor gereinigte und desinfizierte Schiene aufgebracht. Je Quadrant wurden jeweils 2 Prüfkörper bukkal fixiert.



**Abbildung 2: Darstellung einer Schiene mit angebrachten Schmelzprüfkörpern im ersten und zweiten Quadranten mit Ausrichtung der polierten Schmelzoberfläche nach bukkal. Je Quadrant wurden jeweils zwei Prüfkörper mit Silikon angebracht.**

### 3.4 Prüfsubstanzen

Die Teilnehmenden spülten mit insgesamt 7 Suspensionen. Wasser und CHX (Chlorhexidin 0,2%-digluconat Lösung, Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg, Deutschland) dienten als Negativ- und Positivkontrollen und wurden als gebrauchsfertige Substanzen bereitgestellt. Die restlichen 5 Testsubstanzen stellte die Firma Dr. Theis Naturwaren GmbH in Form von Zahnpasten zur Verfügung. Für die Versuche wurde aus den Zahnpasten eine Suspension zum Spülen mittels Vortexer (Vibrationsschüttler Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., New York, USA) aus je 0,5 g Paste und 2 ml sterilem Wasser hergestellt, um die Verdünnung der Zahnpasta durch den Speichel während des Putzens zu simulieren.

In der folgenden Tabelle sind die Zahnpasten mit den Inhaltsstoffen aufgelistet.

**Tabelle 1: In der Studie genutzte Lösungen und Zahnpasten**

Paste	Abkürzung	Bestandteile mit prozentualem Anteil
Steriles Wasser	Wasser	
Basispaste	Basis-Paste/ B-P	Wasser, Polyethylenglykol (PEG) 32, Sorbitol (14 %), Hydroxyethylcellulose, Silicium, Titandioxid, Sodium Lauryl Sulfat (SLS)
Chlorhexidin (CHX)	CHX	CHX (0,2 %)
Lacalut aktiv	Standard-Paste/ STD-P	Natriumfluorid 1500 ppm, Aluminiumlactat (0,8 %), CHX (0,05 %), Poloxamer, Aroma, Menthol, Sorbitlösung (21 %), Hydroxyethylcellulose, Silicium, Titandioxid, SLS, Natronlauge
Lacalut Zahnfleischschutz und Sensitivität	Sensitiv-Paste/ S-P	Natriumfluorid 1450 ppm, Aluminiumlactat (0,8 %), CHX (0,05 %), Strontiumacetat (2 %), Kaliumchlorid (3 %), Poloxamer, Aroma, Menthol, Sorbitlösung (21 %), Hydroxyethylcellulose, Silicium, SLS
Lacalut Zahnfleischschutz und gesunder Zahnschmelz	Hydroxylapatit-Paste/ HAP-P	Natriumfluorid, Olafur 1450 ppm, Aluminiumlactat (0,8 %), CHX (0,05 %), Hydroxylapatit (5 %), Xylitol, Calciumglycerophosphat, Saccharin Natrium, Poloxamer, Aroma, Menthol, Sorbitlösung (17,5 %), Hydroxyethylcellulose, Silicium, SLS
Lacalut Zahnfleischschutz und sanftes weiß	Enzym-Paste/ ENZ-P	Natriumfluorid 1450 ppm, Aluminiumlactat (0,8 %), CHX (0,05 %), EDTA, Papain (0,012 %), Bromelain (0,05 %), Calciumglycerophosphat, Hyaluronsäure (0,2 %), Magnesiumhydrogencitrat, Poloxamer, Aroma, Menthol, Sorbitlösung (21 %), Silicium, Xanthan Gum, Titandioxid, Natronlauge, SLS

### 3.5 Versuchsaufbau

Für die Versuchsreihe mussten die Teilnehmenden 7 Zyklen durchlaufen. Zwischen den jeweiligen Zyklen wurde eine Auswaschphase von 14 Tagen gewährleistet. Ein Tragezyklus belief sich auf 48 h, in der die Testpersonen mit der jeweiligen Spülsuspension oder Lösung in bestimmten Zeitabständen für jeweils 60 s spülen musste (Tabelle 2). Während der Spülzeit verblieb die Schiene in der Mundhöhle. Beim Essen und Trinken, mit Ausnahme des Wassertrinkens, wurde die Schiene in einem feuchten Milieu gelagert und 30 min nach Nahrungsaufnahme wieder eingesetzt. Während der gesamten Tragezeit wurde auf weitere Zahnpasta oder Mundspüllösungen verzichtet. Lediglich das Zähneputzen mit Wasser war gestattet. Nach der Tragedauer von 48 h wurden die Schienen aus der Mundhöhle entfernt und die Prüfkörper vorsichtig mit einer Pinzette abgelöst. Zur Vorbereitung für die Auswertung wurden die Prüfkörper mit destilliertem Wasser abgesprüht, um Speichel und nicht adhärente Zellen von der Oberfläche zu entfernen. Anschließend konnten die Proben für die Auswertungen vorbereitet werden.

**Tabelle 2: Spülprotokoll**

Spülung (für jeweils 60 s)	Zeitpunkt (t in h)
Einsetzen der Schiene	0
Spülung 1	0,5
Spülung 2	12
Spülung 3	24
Spülung 4	36
Entnahme der Prüfkörper	48

### 3.6 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Darstellung des Biofilms und zur Beurteilung der Bedeckung und der Biofilm-Vitalität wurde ein Fluoreszenzmikroskop (Axio Skop, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) verwendet. Die Prüfkörper wurden mit dem LIVE/DEAD® BacLight™ Kit (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) mit zwei verschiedenen Farbstoffen gefärbt. Bei den Farbstoffen handelt es sich zum einen um Propidium-Iodid (PI) und zum anderen um SYTO 9. Beide Farbstoffe sind in der Lage Nukleinsäuren anzufärben, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer spektralen Eigenschaften und ihrer Fähigkeit in die zytoplasmatische Membran einzudringen. PI ist ein rot fluoreszierender Farbstoff, der Nukleinsäuren anfärbt und in Zellen mit geschädigter Membran eindringt. SYTO 9 ist hingegen grün fluoreszierend und kann sowohl Bakterien mit intakter als auch Bakterien mit geschädigter Membran

durchdringen. Liegen beide Farbstoffe in einer Zelle vor, verdrängt PI das SYTO9 aufgrund der höheren Affinität zu Nukleinsäuren. Folglich lassen sich so die Bakterien mit intakter Membran grün und Bakterien mit geschädigter Membran rot darstellen [16]. Somit werden grün fluoreszierende Bakterien als vital, rot fluoreszierende als avital bewertet. Es ist möglich, die einzelnen Stammlösungen bis zu einem Jahr lichtgeschützt bei -20 °C zu lagern. Die Färbelösung wird hergestellt, indem 1 µl SYTO9 und 1 µl Propidium Iodid des LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability kit mit 1000 µl Natriumchloridlösung (0.9 %) unter Verwendung eines Rüttlers vermischt werden. Dieser Ansatz kann einen Monat lang bei 4 °C in einem lichtundurchlässigen Behältnis aufbewahrt werden.

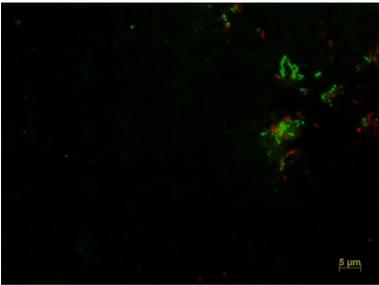
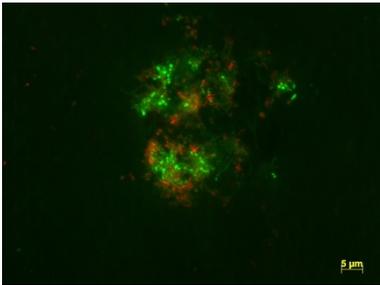
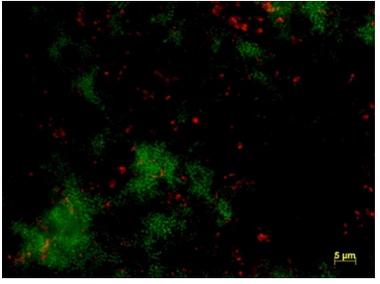
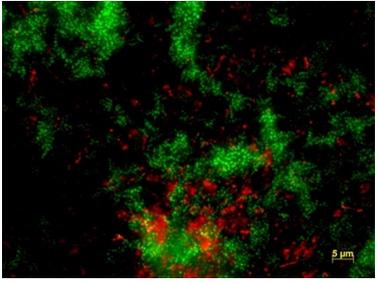
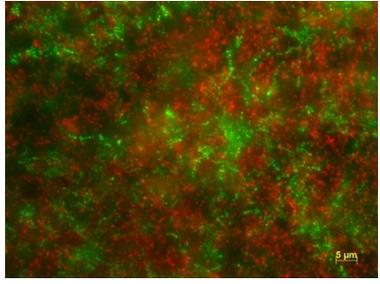
Nach dem Absprühen mit destilliertem Wasser wurden die Prüfkörper in einer feuchten Kammer zwischengelagert. Die feuchte Kammer in einer Mikrotiterplatte wurde mit einem staubfreien, mit destilliertem Wasser befeuchteten Präzisionstuch (Kimtech® Science Präzisionstücher, USA) vorbereitet. Nach dem Abtupfen der Prüfkörper wurden unter einem Lichtmikroskop mit 10-facher Vergrößerung Markierungen für die spätere Auswertung angebracht. Nach dem Anfärben der Prüfkörper mit 10 µl der Färbelösung mussten diese mindestens 10 min in einer Dunkelkammer inkubiert werden. Nach den 10 min konnte die Färbelösung mit einem Präzisionstuch abgetupft und in NaCl (0,9 %) geschwenkt werden, um die restliche Färbelösung zu entfernen. Nach erneutem Trocknen konnte die Probe parallel zum Boden auf eine Kugel Putty Paste (Optosil® Comfort Putty, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) gelegt werden, die auf einem Objektträger (Leit-Taps, Art. Nr. G3347, Plano, Wetzlar, Deutschland) aufgebracht war. Anschließend wurde 5 µl Mounting Oil des BacLight™ bacterial viability kit (Artikelnummer L17012, Molecular Probes, Eugene, USA) auf die Oberfläche aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt.

Die Analyse der Prüfkörper erfolgte mit dem Programm Axio Imager M2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland). Zur Darstellung der lebenden und toten Zellen wurden nacheinander zwei verschiedene Lichtfilter verwendet. Für die Anregung von SYTO 9 wurde Licht mit einer Wellenlänge von 485 nm erzeugt, die Emission erfolgte bei 500 nm. Für das Propidiumiodid wurde Licht mit einer Wellenlänge von 535 nm benötigt für eine Emission bei 617 nm. Pro Prüfkörper wurden, anhand der vorher angefertigten Markierung, 6 Bilder bei einer 1000-fachen Vergrößerung aufgenommen und gespeichert. Zur Analyse der angefertigten Bilder wurde unter anderem das Programm ImageJ (Image J 1.52, NIH, Bethesda, Maryland, USA) herangezogen. Vor der Auswertung wurden sowohl Epithelzellen als auch die Eigenfluoreszenz der Prüfkörper, in diesem Fall Schmelzprismen, beachtet und manuell mit Image J ausgeschnitten. Das Programm ermöglicht die Bestimmung der Bedeckung und der Vitalität durch Berechnung der Pixel. Für die Bedeckung wurde nach der Bestimmung der Gesamtfläche die von Bakterien besiedelte Fläche ermittelt. Die Bedeckung wurde dann durch die Berechnung des Anteils der ausgewählten Fläche an der Gesamtheit bestimmt. Zur Bestimmung der Biofilm-Vitalität wurden sowohl der rote als auch der grüne Kanal in der Grauskala gespeichert und anschließend über

Image J ausgewertet. Nach Bestimmung des Gesamtwertes beider Kanäle wurde der prozentuale Anteil der Vitalität ermittelt.

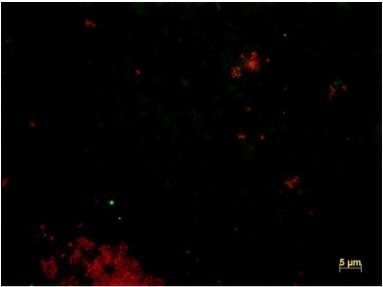
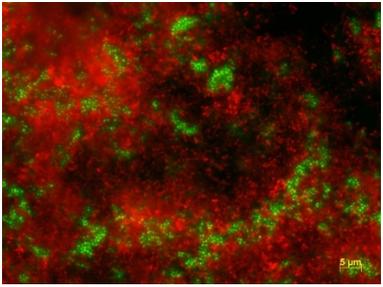
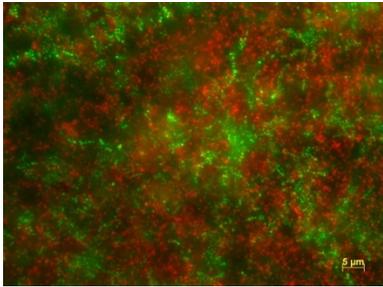
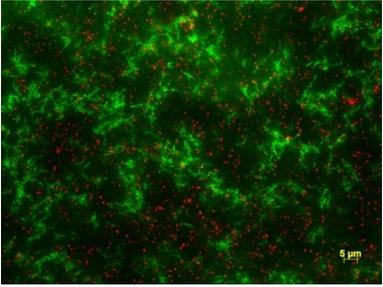
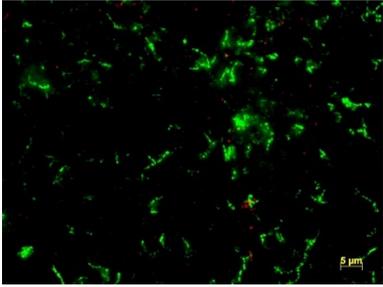
Neben der Analyse mit Image J wurde als Kontrollmethode ein etabliertes Scoringssystem zur weiteren Analyse der Bedeckung und Vitalität verwendet. Die Quantifizierung der Biofilmmenge erfolgte anhand einer Skala von 1-6, die sich an den Phasen der Biofilmbildung orientiert. Score 1 steht dabei für Pellikelschichten mit nur verstreut anhaftenden Mikroorganismen. Score 2, 3 und 4 für eine geringe mikrobielle Besiedlung und Score 5 und 6 für etablierte Biofilme mit ausgeprägter Struktur und einer hohen Dichte an Mikroorganismen. Jedem Prüfkörper konnten aufgrund der 6 aufgenommenen Aufnahmen jeweils 6 Score-Werte, zugeordnet werden, siehe Tabelle 3 [118].

**Tabelle 3: Klassifikation zur Bestimmung der *In-situ*-Bedeckung von Prüfkörpern mit oralen Biofilmen**

Score 1	Score 2	Score 3
Separat verteilte, einzelne Bakterien	Isolierte Bakterienagglomerate (n<100 Bakterien)	Inselförmige Bakterienagglomerate (n>1000 Bakterien)
		
Score 4	Score 5	Score 6
Bakterienkolonien, die annähernd 50 % der Oberfläche bedecken oder große, mehrschichtige Agglomerate	Bakterienkolonien, die mehr als 50 % der Oberfläche bedecken	Mehrschichtiger bakterieller Biofilm, der mind. 90 % der gesamten Oberfläche bedeckt
		

Zur Vitalitätsbestimmung wurde ebenfalls eine Klassifikation mit 5 Kategorien gewählt, die sich an dem Verhältnis von roter zu grüner Fluoreszenz orientiert. Auch hier wurden jedem Prüfkörper 6 Score-Werte zugeordnet [118].

**Tabelle 4: Klassifikation zur Bestimmung der Vitalfluoreszenz von oralen *In-situ*-Biofilmen**

Score 1	Score 2	Score 3
Hauptsächlich rote Fluoreszenz, Verhältnis zwischen roter zu grüner Fluoreszenz 90:10 oder höher	Mehr rote Fluoreszenz, Verhältnis zwischen roter und grüner Fluoreszenz 75:25 oder höher	Verhältnis zwischen roter und grüner Fluoreszenz etwa 50:50
		
Score 4	Score 5	
Mehr grüne Fluoreszenz, Verhältnis zwischen grüner und roter Fluoreszenz 75:25 oder höher	Hauptsächlich grüne Fluoreszenz, Verhältnis zwischen grüner zu roter Fluoreszenz 90:10 oder höher	
		

### 3.7 Rasterelektronenmikroskopie

Zur Verifizierung der Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie und zur Beurteilung der Morphologie des adhärenen Biofilms wurde zusätzlich die Rasterelektronenmikroskopie (REM) herangezogen. Zur Analyse der Prüfkörper mussten diese fixiert, gewaschen, dehydriert und getrocknet werden (siehe Tabelle 5). Nach dem Tragen wurden die Prüfkörper mit destilliertem Wasser abgesprüht und in vorbereiteten Mikrotiterplatten gelagert. Zunächst fand eine Fixierung in 2 %igem Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer für mindestens eine Stunde bei 4 °C mit Verdunstungsschutz statt. Anschließend wurden die Prüfkörper dreimal für jeweils 10 min mit 0,1 M Cacodylatpuffer bei Raumtemperatur gewaschen. Nachfolgend fand die Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe ebenfalls bei Raumtemperatur statt. Nach der Entwässerung mussten die Prüfkörper im Abzug über Nacht trocknen und konnten danach auf die Rasterteller zur Auswertung aufgebracht werden. Zur Fixierung auf den Tellern wurde eine leitfähige Klebefolie aus Aluminium (Leit- Tabs, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) aufgebracht und anschließend fand eine Beschichtung mit Kohlenstoff statt.

**Tabelle 5: Vorbereitung der Prüfkörper für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung (REM).**

Arbeitsschritt	Zeit	Chemikalien
Fixierung	mind. 1 h bei 4 °C	1 ml Fixierlösung (2 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer)
Waschung	3x 10 min	1 ml 0,1 M Cacodylatpuffer bei Raumtemperatur
Entwässerung	2x 5 min	50 % EtOH (vergällt)
	1x5 min	70 % EtOH (vergällt)
	1x5 min	80 % EtOH (vergällt)
	1x5 min	90 % EtOH (vergällt)
	2x10 min	100 % EtOH (nicht vergällt)
Trocknung	über Nacht	bei Raumtemperatur

Die Proben wurden anschließend mit dem Rasterelektronenmikroskop (XL 30 ESEM FEG, FEI Company, Eindhoven, Niederlande) unter Vakuum ausgewertet. Dafür wurden pro Prüfkörper 6 Bilder einer repräsentativen Stelle mit verschiedenen Vergrößerungen (25x, 500x, 1000x, 5000x, 10000x, 20000x) aufgenommen. Außerdem wurde eine Energiedispersive Röntgenspektroskopie- (EDX) Analyse durchgeführt, wodurch eine Detektion von den Biofilmen anlagernde Bestandteile der Zahnpasten möglich ist. Bei diesem Verfahren werden die Atome der Probe durch einen Elektronenstrahl mit einer bestimmten Energie angeregt und senden Strahlung mit einer für das jeweilige Element spezifischen Energie aus. Die Elementzusammensetzung der Probe kann aus den durch die Elektronenanregung erzeugten charakteristischen Röntgenpeaks bestimmt werden, wodurch Rückschlüsse auf einzelne Bestandteile der Zahnpasta möglich sind [99].

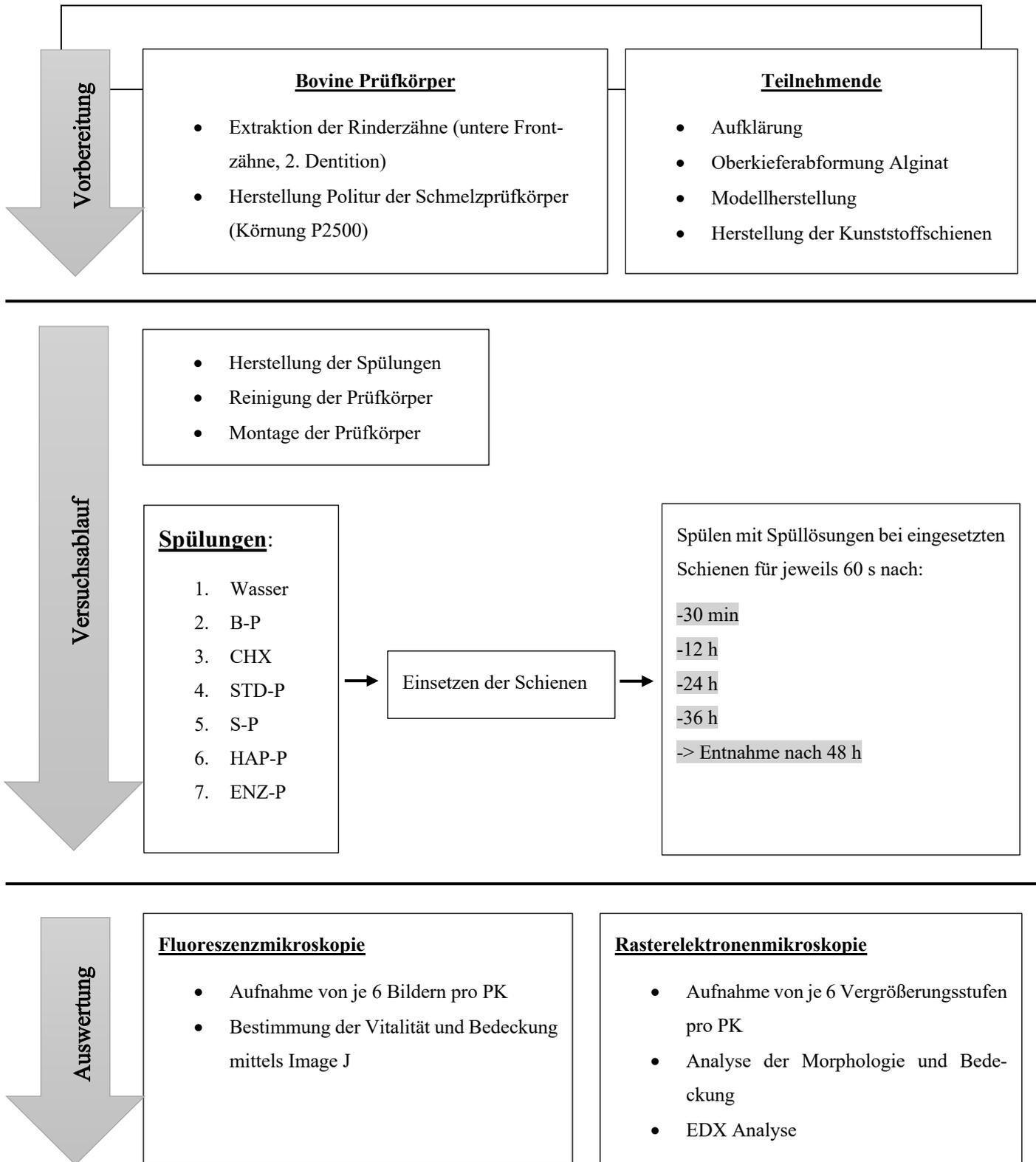


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes. Abkürzungen:PK=Prüfkörper, EDX-Analyse=Energiedispersive Röntgenspektroskopie B-P=Basis-Paste, STD-P=Standard-Paste, S-P= Sensitiv-Paste, HAP-P= Hydroxylapatit-Paste, ENZ-P=Enzym-Paste, CHX=Chlorhexidin

### 3.8 Statistik

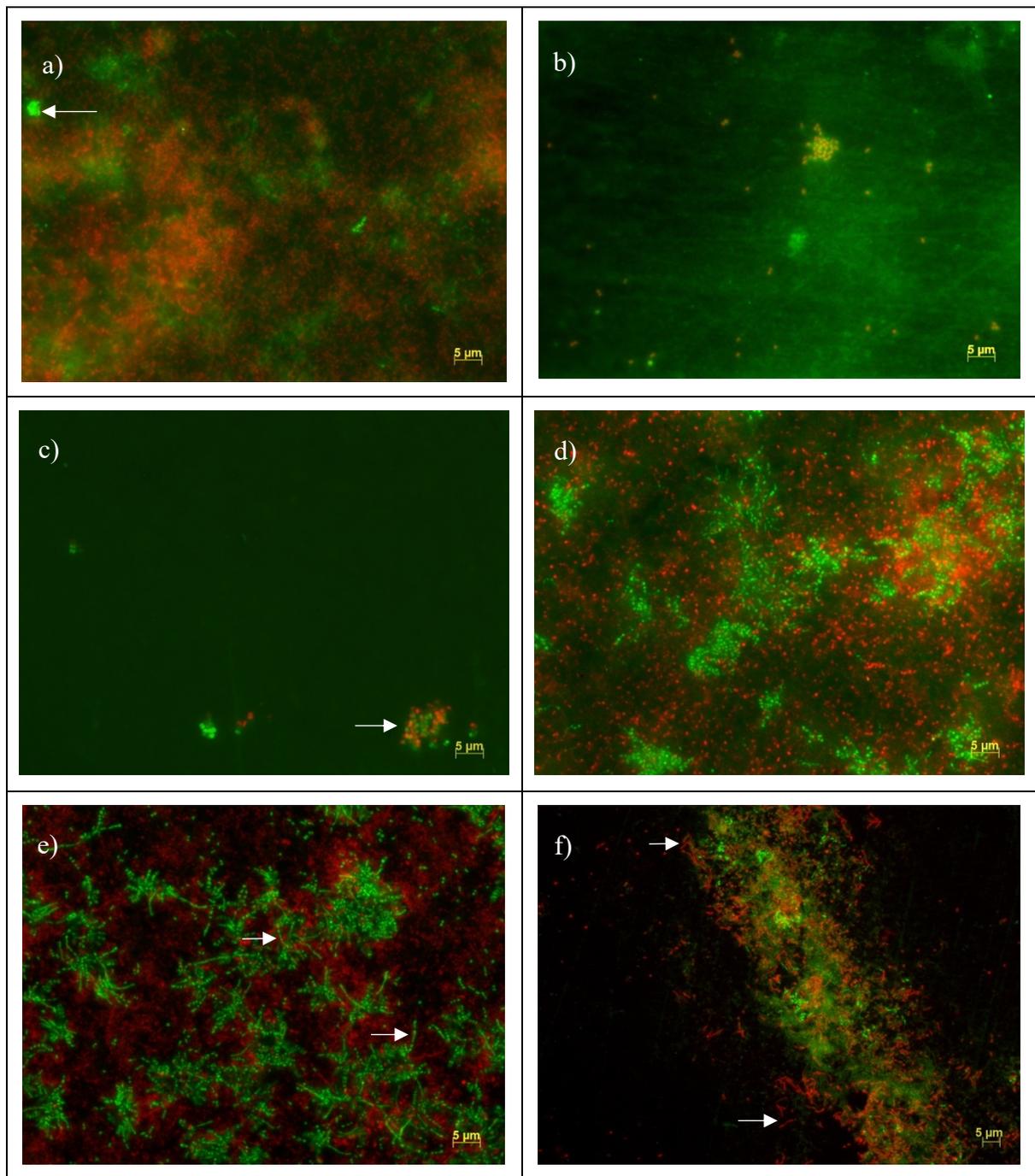
Die statistische Auswertung wurde mithilfe des Programms Graphpad Prism10 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) durchgeführt. Die Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Anschließend wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet, um Unterschiede zwischen den verschiedenen Spüllösungen zu ermitteln. Zum Vergleich der Ergebnisse der Biofilmanalyse für die Zahnpastasuspensionen mit Wasser und Basis-Paste wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Bei einem p-Wert  $< 0,05$  wurden die Unterschiede als signifikant bewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Fluoreszenzmikroskopie

#### 4.1.1 Visualisierung des *In-situ*-Biofilms

Durch die Auswertung mit dem LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability kit konnte eine fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung zwischen vitalen und toten Bakterien erfolgen. Darüber hinaus war es möglich, die Morphologie der Bakterien und des *in situ* gebildeten Biofilms zu beschreiben, die im zweiten Schritt ebenfalls rasterelektronenmikroskopisch analysiert wurden. Bei der Auswertung wurden sowohl Epithelzellen als auch die Eigenfluoreszenz der Prüfkörper, in diesem Fall Schmelzprismen, beachtet. Es konnten individuelle Unterschiede von Biofilmbedeckung und -vitalität zwischen den Teilnehmenden festgestellt werden. Morphologisch lagen hauptsächlich Kokken vor, die einzeln, in Form von Ketten oder aber auch als Kolonien auftraten. Stäbchen waren ebenfalls nachweisbar, jedoch in geringerer Anzahl.



**Abbildung 4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mittels LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability kit angefärbter Biofilme, Darstellung von 48h in-situ-Biofilmen nach unterschiedlichen Spülungen.**

**a):** Spülung mit Wasser, Darstellung nicht adhärenter Zellen (Pfeil), die nicht in die Auswertung mit eingeflossen sind, ebenso die wie in b) gezeigte Eigenfluoreszenz der Schmelzprismen (CHX Spülung) **c)** Spülung mit HAP-P, Darstellung einzelner Kokken. **d)** Spülung mit B-P, Anordnung der Kokken in Kolonien **e)** Spülung mit S-P, Darstellung von Bakterienketten **f)** Spülung mit STD-P, einzelne Stäbchen sind erkennbar.

### 4.1.2 Biofilm-Bedeckung

Die Auswertung der angefertigten Bilder ergab für die Spülung mit Wasser mit im Mittel 71,84 % die höchste Bedeckung für alle Spüllösungen. Bei der Spülung mit der Basis-Paste lag die mittlere Bedeckung bei 47,02 %. Die Biofilm-Bedeckung reduzierte sich bei der Standard-Paste auf 31,02 % und bei der Sensitiv-Paste auf 28,97 %. Die HAP-Paste konnte die Bedeckung auf 40,37 % und die Enzym-Paste auf 29,54 % reduzieren, während die Spülung mit CHX eine Bedeckung von 9,55 % aufwies (Abbildung 5).

Der Kruskal-Wallis-Test zeigte einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen den verschiedenen Spülungen. Zwischen der Wasserspülung und der Spülung mit der Basis-Paste gab es keinen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ). Im Vergleich zu Wasser konnte eine signifikante Reduktion der Biofilmbedeckung ( $p < 0,05$ ) bei der Spülung mit der Standard-Paste, der Enzym-Paste, der Sensitiv-Paste und CHX festgestellt werden. Vergleicht man die Werte der Basis-Paste mit den anderen Spüllösungen, so ist lediglich zur CHX-Spülung eine signifikante Reduktion ( $p < 0,05$ ) zu beobachten.

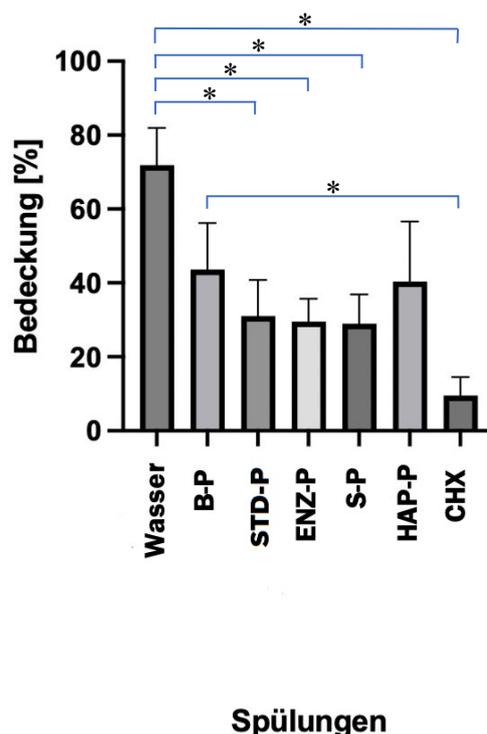
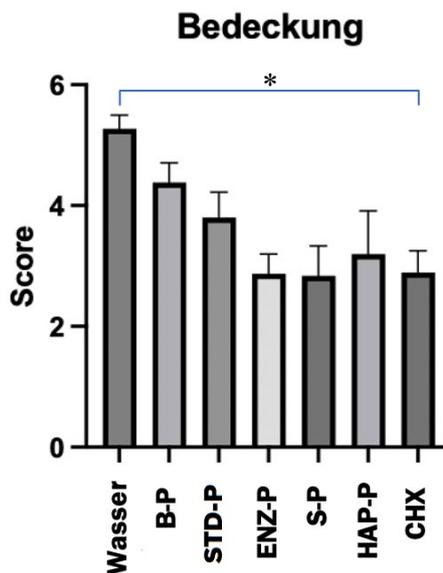


Abbildung 5: Dargestellt ist die prozentuale Biofilm-Bedeckung der Prüfkörper in Abhängigkeit von den Spülungen. Die Mittelwerte sind angegeben in % der Prüfkörperoberfläche. Die aufgesetzten Linien auf den Säulen geben die Standardabweichung an. Die Unterschiede zwischen Wasser und den Spülungen mit der Standard-Paste, der Enzym-Paste, der Sensitiv-Paste und CHX waren statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). CHX konnte ebenfalls eine signifikante Reduktion ( $p < 0,05$ ) zu der Basis-Paste aufzeigen. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind im Diagramm mit \* gekennzeichnet. Abkürzungen: B-P=Basis-Paste, STD-P=Standard-Paste, ENZ-P=Enzym-Paste, S-P= Sensitiv-Paste, HAP-P= Hydroxylapatit-Paste, CHX=Chlorhexidin

Das zusätzlich durchgeführte Scoring zeigt ähnliche Ergebnisse, wie in Abbildung 6 dargestellt. Der Kruskal-Wallis-Test ergab jedoch hier keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Spülungen. Mit der Wasserspülung konnte ein Score von 5 erreicht werden, mit der Basis-Paste ein Score von 4. Zwischen den beiden Negativkontrollen lag kein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) vor. Mit dieser Methode der Bewertung der Biofilmbedeckung konnte nur zwischen CHX und Wasser eine signifikante Reduktion ( $p < 0,05$ ) festgestellt werden.

Die Standard-Paste erzielte einen durchschnittlichen Score von 3, während die Enzym-Paste und die Sensitiv-Paste einen Score von 2 erreichten. Die Hydroxylapatit-Paste hatte einen Mittelwert von 3, während die CHX-Spüllösung den niedrigsten Wert von 2 aufwies (s. Abbildung 6).



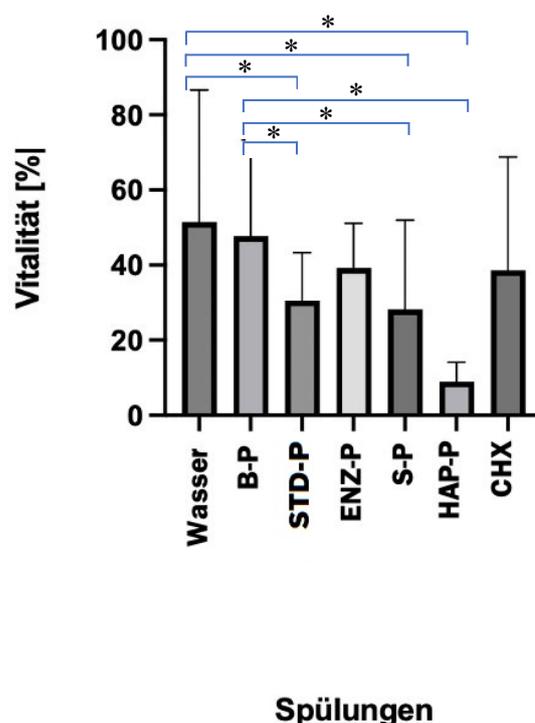
### Spülungen

**Abbildung 6:** Darstellung der Biofilm-Bedeckung der Prüfkörper in Abhängigkeit von den Spülungen nach Auswertung mit der Scoring-Klassifikation (siehe Tabelle 3) Die Höhe der einzelnen Balken entspricht dem Mittelwert der Scores, wobei die aufgesetzten Linien die Standardabweichung angeben. Der Unterschied zwischen Wasser und CHX war statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind im Diagramm mit \* gekennzeichnet. Abkürzungen: B-P=Basis-Paste, STD-P=Standard-Paste, ENZ-P=Enzym-Paste, S-P= Sensitiv-Paste, HAP-P= Hydroxylapatit-Paste, CHX=Chlorhexidin

### 4.1.3 Biofilmvitalität

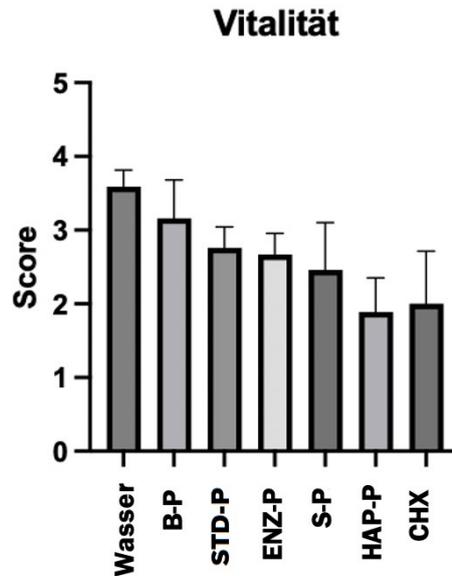
Die Spülungen mit Wasser und der Suspension der Basis-Paste wiesen mit 54,21 % und 51,47 % die höchsten Vitalitätswerte auf. Die Standard-Paste zeigte eine Vitalität von 30,51 %, die Spülung mit der Sensitiv-Paste eine Vitalität von 28,18 %. Mit der Hydroxylapatit-Paste konnte eine Reduktion auf 9,27 % erreicht werden, während die Enzym-Paste die Vitalität auf 39,21 % und die CHX-Spülung die Vitalität auf 38,65 % reduzieren konnte (siehe Abbildung 7).

Der Kruskal-Wallis-Test ergab einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Spüllösungen. Im Vergleich zur Wasserspülung konnte eine signifikante Reduktion ( $p < 0,05$ ) mit der Standard-Paste, der Sensitiv-Paste und der Hydroxylapatit-Paste erzielt werden. Vergleicht man die Werte der Basis-Paste mit den anderen Spüllösungen, so zeigt sich ebenfalls eine signifikante Reduktion ( $p < 0,05$ ) gegenüber den Spülungen mit der Standard-Paste, der Sensitiv-Paste und der Hydroxylapatit-Paste.



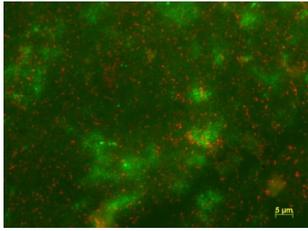
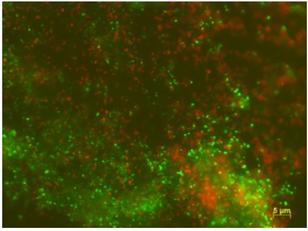
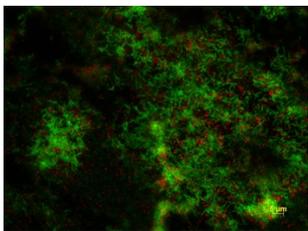
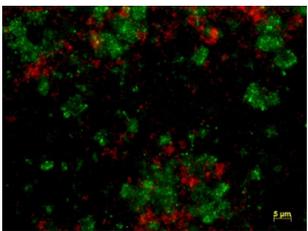
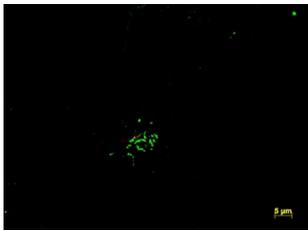
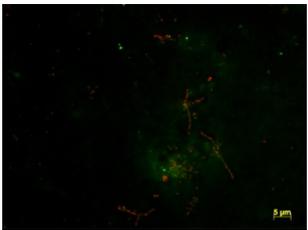
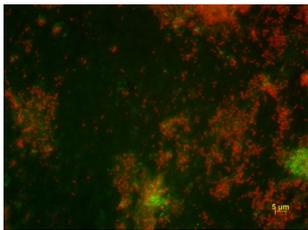
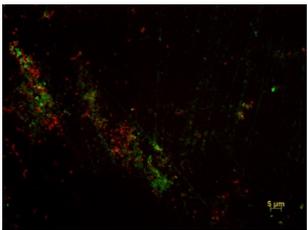
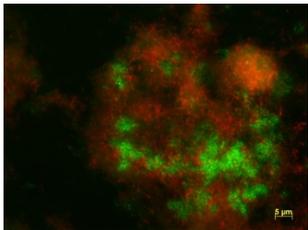
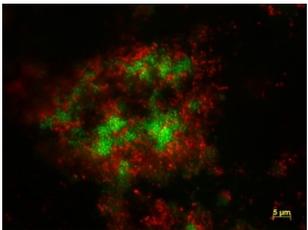
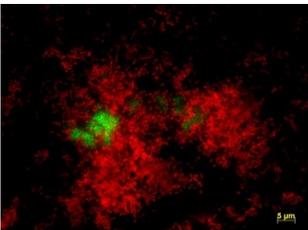
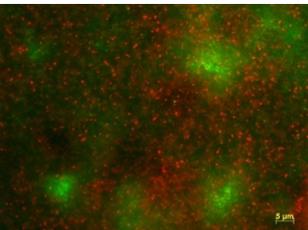
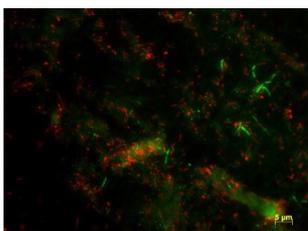
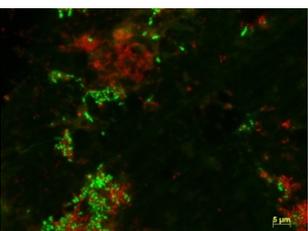
**Abbildung 7:** Darstellung der Vitalität der Biofilme bei den einzelnen Spüllösungen angegeben in %. Die Höhe der einzelnen Balken entspricht dem Mittelwert des grünen Fluoreszenzanteils, wobei die aufgesetzten Linien die Standardabweichung angeben. Der Unterschied zwischen Wasser und Standard-Paste, Sensitiv-Paste und Hydroxylapatit-Paste war statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Im Vergleich zur Spülung mit der Basis-Paste konnte die Vitalität ebenfalls mit der Standard-Paste, der Sensitiv-Paste und der Hydroxylapatit-Paste signifikant ( $p < 0,05$ ) reduziert werden. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind im Diagramm mit \* gekennzeichnet. Abkürzungen: B-P=Basis-Paste, STD-P=Standard-Paste, ENZ-P=Enzym-Paste, S-P= Sensitiv-Paste, HAP-P= Hydroxylapatit-Paste, CHX=Chlorhexidin

Bei den Spülungen mit Wasser und Basis-Paste lagen die höchsten Scores mit 4 und 3 vor. Sowohl bei der Standard-Paste als auch bei der Enzym-Paste betrug das Scoring im Mittel 3. Das Scoring bei der Hydroxylapatit-Paste, der Sensitiv-Paste und bei der CHX-Spülung betrug im Mittel 2. Mit dem Kruskal-Wallis-Test konnte keine signifikante Differenz ( $p < 0,05$ ) zwischen den Spüllösungen festgestellt werden. Weder im Vergleich zur Wasserspülung noch im Vergleich zur Basis-Paste konnte eine signifikante Reduktion ( $p < 0,05$ ) erreicht werden. Repräsentative Aufnahmen sind in Abbildung 9 dargestellt.



**Spülungen**

**Abbildung 8:** Darstellung der Biofilm-Vitalität nach den Spülungen unter Verwendung der Scoring Klassifikation. Die Höhe der einzelnen Balken entspricht dem Mittelwert der Scores, wobei die aufgesetzten Linien die Standardabweichung angeben. Abkürzungen: B-P=Basis-Paste, STD-P=Standard-Paste, ENZ-P=Enzym-Paste, S-P= Sensitiv-Paste, HAP-P= Hydroxylapatit-Paste, CHX=Chlorhexidin

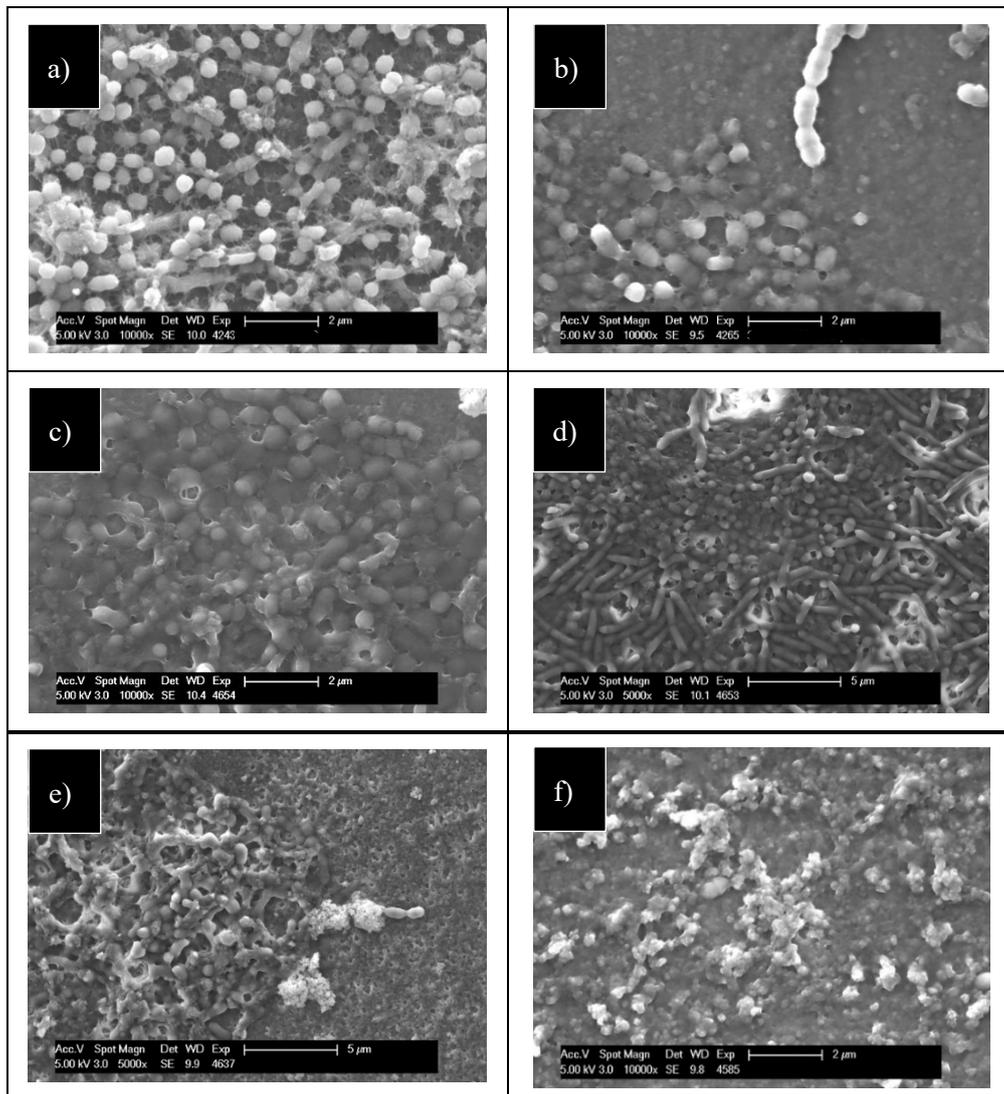
a) Wasser			<p><b>Abbildung 9: Repräsentative Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie: die Bilder wurden nach einer Tragedauer von 48h mit dem Mikroskop nach Färben des Biofilms mittels LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability kit aufgenommen. Dabei spülten die Testpersonen innerhalb der Tragedauer viermal für jeweils 60s.</b></p> <p>a) die mit Wasser umspülten Prüfkörper weisen eine hohe Bedeckung mit mehrschichtigem Biofilm auf, wobei der grün fluoreszierende Anteil überwiegt. b) Spülung mit Basis-Paste (B-P), große Kolonien mit &gt;1000 Bakterien sichtbar, der grün fluoreszierende Anteil überwiegt. c) durch die Spülung mit Chlorhexidin (CHX) ist eine starke Reduktion der Bedeckung und Vitalität zu erkennen. Sichtbar sind einschichtige Bakterienagglomerate mit &lt;100 Bakterien, wobei diese hauptsächlich grün fluoreszieren. d) Spülung mit Standard-Paste (STD-P), Bakterien sind teilweise in inselförmigen Kolonien organisiert, wobei der Anteil rot fluoreszierender Bakterien überwiegt. e) Spülung mit Sensitiv-Paste (S-P), Vorliegen von Bakterienkolonien mit &gt;1000 Bakterien, wobei die rot fluoreszierenden Bakterien überwiegen. f) Spülung mit Hydroxylapatit-Paste (HAP-P), ein hoher Anteil der Prüfkörperoberfläche ist mit mehrschichtigem Biofilm bedeckt, allerdings liegen hier hauptsächlich rot fluoreszierende Bakterien vor. g) die Spülung mit der Enzym-Paste (ENZ-P) konnte die Bedeckung der Prüfkörperoberfläche reduzieren. Der Anteil von rot zu grün fluoreszierenden Bakterien scheint ausgeglichen zu sein.</p>
b) B-P			
c) CHX			
d) STD-P			
e) S-P			
f) HAP-P			
g) ENZ-P			

## 4.2 Rasterelektronenmikroskopie

### 4.2.1 Biofilmmorphologie

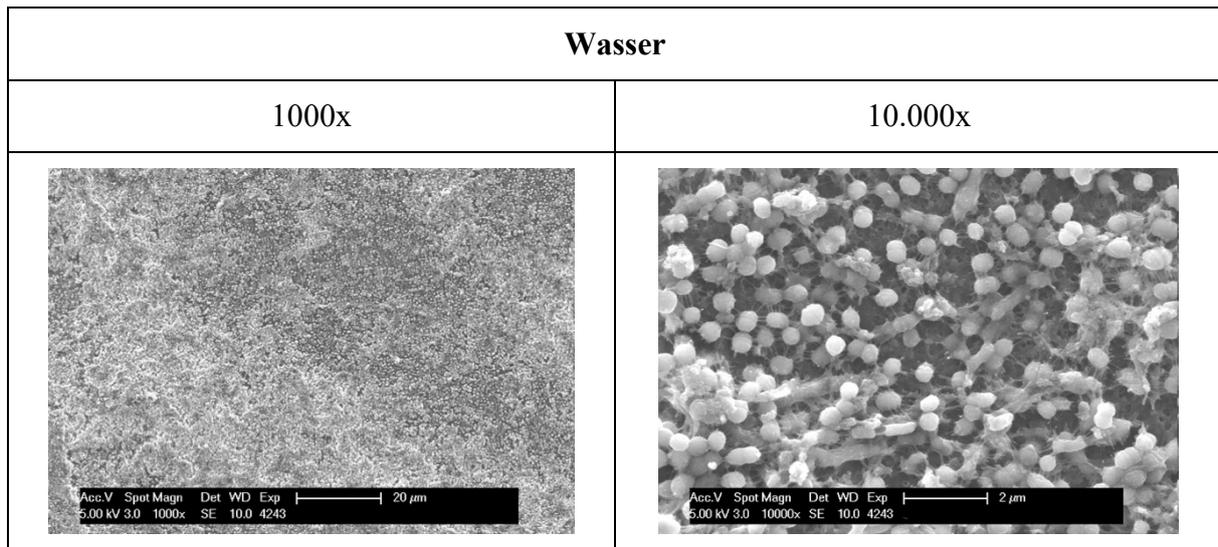
Zur zusätzlichen Bewertung der Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde die Rasterelektronenmikroskopie herangezogen. Dies ermöglicht eine Beurteilung der Morphologie der einzelnen Bakterien und des *in situ* gebildeten Biofilms. Auch hier kann die anteilige Bedeckung der Oberflächen visualisiert werden. Wie auch schon bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung, konnten hier hauptsächlich Kokken, teilweise in Ketten oder auch in Kolonien organisiert, festgestellt werden. Vereinzelt waren stäbchenförmige Bakterien auf der Schmelzoberfläche sichtbar. Bei den Spülsuspensionen auf Basis der Zahnpasten waren in den meisten Fällen Rückstände der jeweiligen Paste zu sehen, die wiederum mit der energiedispersiven Röntgenspektroskopie genauer analysiert wurden (siehe Abbildung 10).

Die mit Wasser umspülten Prüfkörper wiesen auch in der Rasterelektronenmikroskopie mehrschichtiger Biofilme auf. Es lagen keine bakterienfreien Bereiche vor und adhärente Bakterien waren erkennbar, die in einer Biofilmmatrix vorlagen. Bei höherer Vergrößerung ist die intakte Morphologie der Bakterien erkennbar, die sich zum Teil im Zellteilungsprozess befinden (siehe Abbildung 11). Auch bei der Spülung mit der Basis-Paste lagen mehrschichtige Biofilme vor und die Morphologie der Bakterien erschien intakt. Auffallend war hier, dass keine Rückstände der Paste vorlagen (siehe Abbildung 12). Durch die Spülung mit CHX konnte die Bedeckung stark reduziert werden. Auf den Prüfkörpern befanden sich große bakterienfreie Areale und die veränderte Pellikelschicht kennzeichnete sich durch globuläre Partikel in einer Größe von etwa 200nm. Bei den Proben war keine intakte Morphologie der Bakterien mehr zu erkennen (siehe Abbildung 13). Bei der Spülung mit der Standard-Paste wurden sowohl Bakterienagglomerate als auch nur von der Pellikel bedeckte Bereiche beobachtet. Bei höheren Vergrößerungen war die Muzinschicht auf den einzelnen Bakterien sichtbar und die Bakterien zeigten teilweise eine intakte Morphologie. Einige Bakterien befanden sich in der Zellteilung. Vereinzelt konnten hier Zahnpastarückstände detektiert werden, die im Nachhinein durch die EDX-Analyse bestätigt werden konnten (siehe Abbildung 14). Die mit der Sensitiv-Paste umspülten Prüfkörper wiesen einen alterierten Biofilm auf. Große Areale waren hier nur von der Pellikel bedeckt und die vorhandenen Bakterien konnten keine intakte Morphologie mehr aufweisen. Auch hier waren Zahnpastarückstände nur sporadisch vorhanden (siehe Abbildung 15). Das Spülen mit der Hydroxylapatit-Paste führte ebenfalls zu einem alterierten Biofilm. Nur wenige Bakterien zeigten eine intakte Morphologie und Zellteilungen waren selten zu beobachten. Bei dieser Spülung lagerten sich häufig Zahnpastarückstände ab (Abbildung 16). Die mit der Enzym-Paste umspülten Prüfkörper wiesen hingegen nur wenige bakterienfreie Areale auf, wobei auch hier alterierte Biofilme vorlagen. Die Morphologie der Bakterien erschien nicht mehr intakt. Zahnpastarückstände traten sehr häufig auf (siehe Abbildung 17).

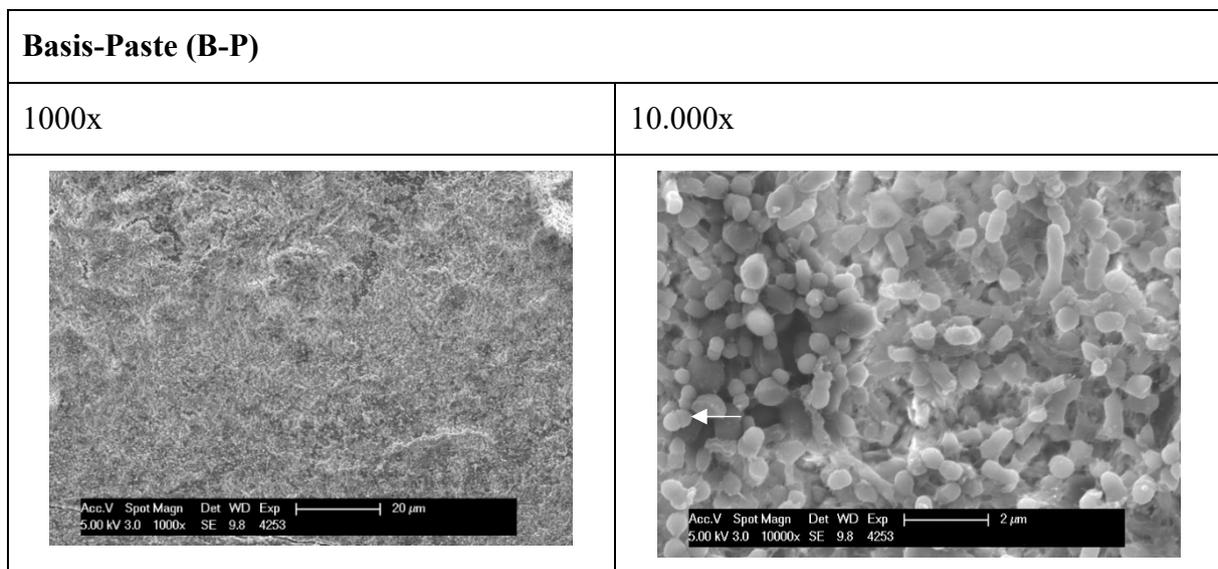


**Abbildung 10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen: repräsentative Aufnahmen zur Darstellung der vorliegenden Bakterien und Zahnpastarückstände**

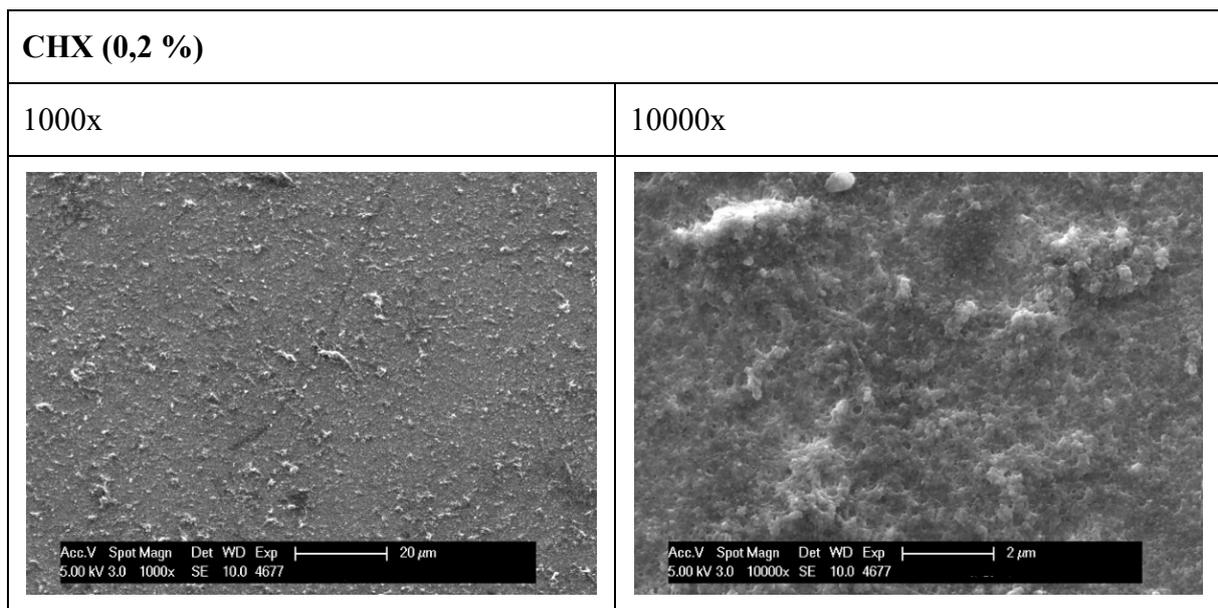
**a) Vorliegen von überwiegend Kokken b) Vorliegen der Kokken in Form von Ketten c) Koloniebildung der Kokken d) Nachweis mehrerer Stäbchen e) +f) Nachträglich mittels EDX-Analyse nachgewiesene Zahnpastarückstände**



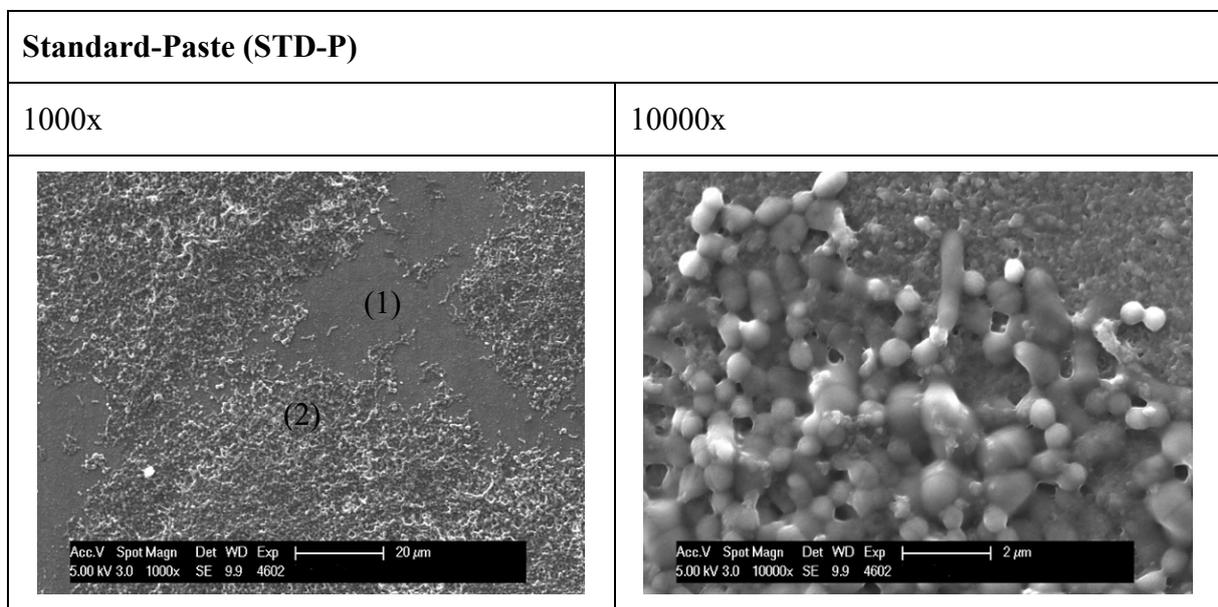
**Abbildung 11:** Repräsentative Aufnahme nach dem Spülen mit Wasser in 1000- und 10000- facher Vergrößerung. Die Tragedauer beträgt 48 h, wobei viermal mit der Spüllösung gespült wurde. Die Prüfkörper weisen eine hohe Biofilmbedeckung mit mehrschichtigem Biofilm auf und es sind keine bakterienfreien Bereiche sichtbar. Die 10000- fache Vergrößerung zeigt Bakterien mit intakter Morphologie, welche sich noch im Zellteilungsprozess befinden. Erkennbar sind hier hauptsächlich Kokken, welche Fimbrien aufweisen, wodurch eine Verbindung mit anderen Bakterien, der Matrix und der Pellikel möglich ist. Zwischen den Bakterien sind Ablagerung globulärer Partikel erkennbar.



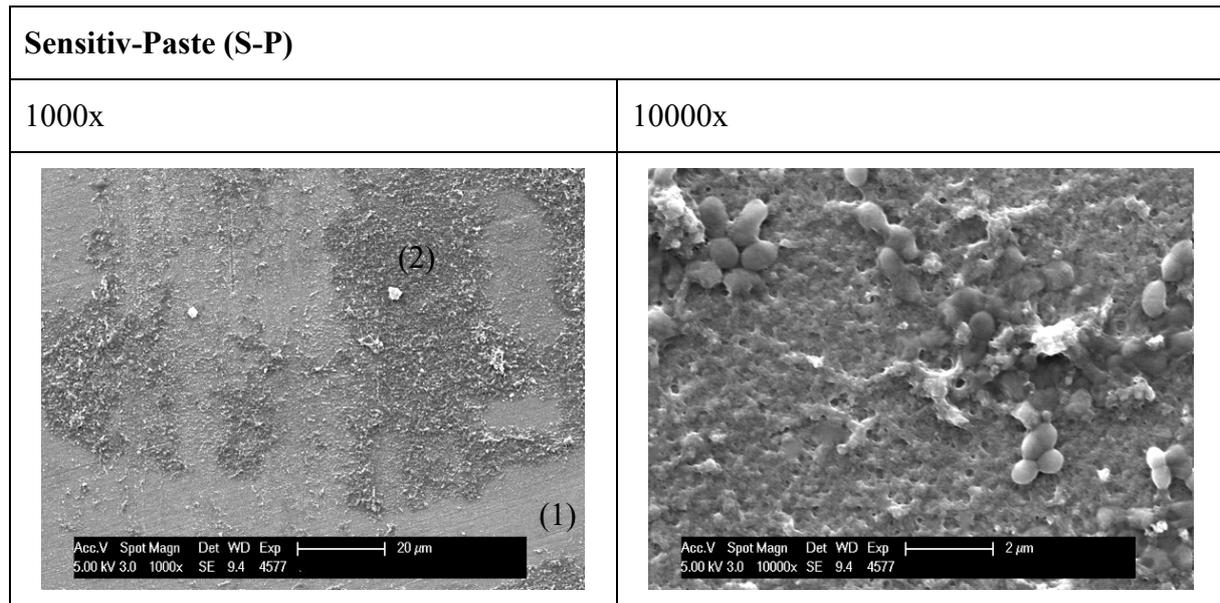
**Abbildung 12:** Repräsentative Aufnahme nach der Spülung mit der B-P in 1000- und 10000- facher Vergrößerung. Die Tragedauer beträgt 48 h, wobei viermal mit der Spüllösung gespült wurde. Ersichtlich ist ein mehrschichtiger Biofilm ohne bakterienfreie Areale. Die Morphologie der Bakterien ist intakt und die Bakterien befinden sich teilweise im Zellteilungsprozess (Pfeil). Sichtbar sind hier die globulären Partikel mit Muzinschicht.



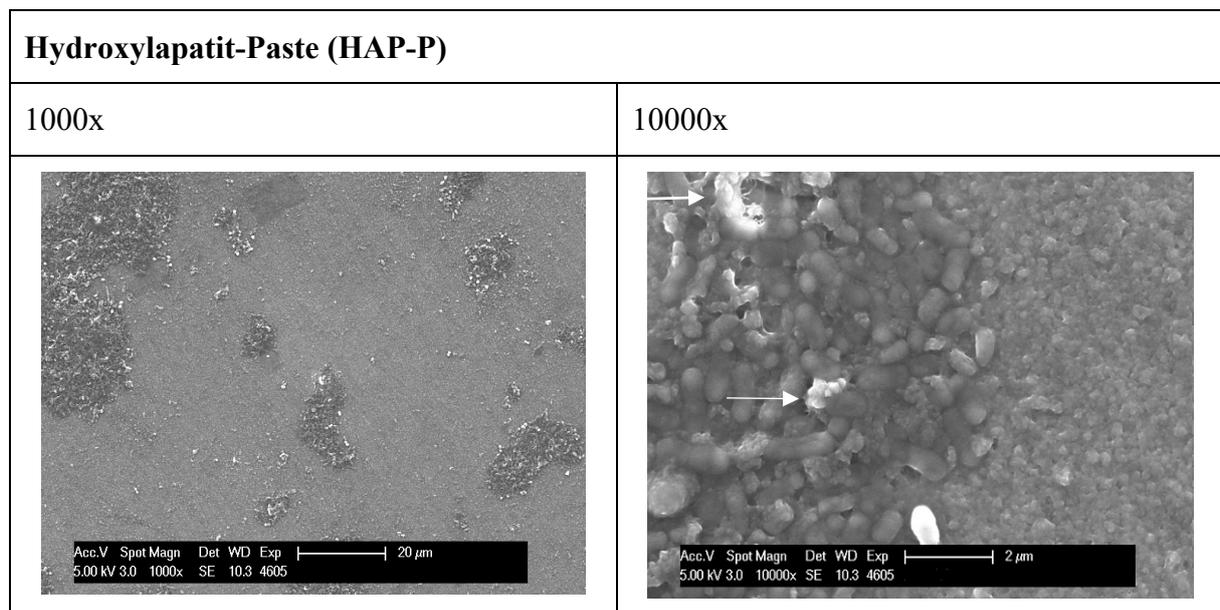
**Abbildung 13: Repräsentative Aufnahme nach dem Spülen mit CHX (0,2 %) in 1000- und 10000- facher Vergrößerung. Die Tragedauer beträgt 48 h, wobei viermal mit der Spüllösung gespült wurde. Erkennbar ist eine sehr geringe Bedeckung der Schmelzoberfläche und die veränderte Pellikelschicht ist gekennzeichnet durch globuläre Partikel in einer Größe von etwa 200nm. Die Morphologie der Bakterien ist nicht mehr intakt.**



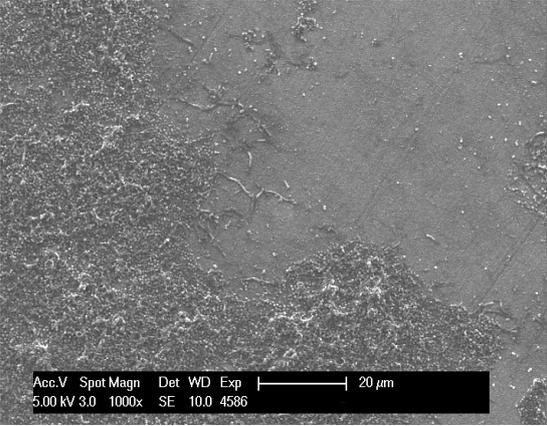
**Abbildung 14: Repräsentative Aufnahme nach der Spülung mit der STD-P in 1000- und 10000- facher Vergrößerung. Die Tragedauer beträgt 48 h, wobei viermal mit der Spüllösung gespült wurde. Es liegt neben der Bedeckung mit der Pellikel (1) eine dünne Schicht von Bakterien (2) vor. Ablagerungen von Zahnpastarückständen sind sichtbar, die im zweiten Schritt mit der EDX-Analyse verifiziert werden konnten.**



**Abbildung 15:** Repräsentative Aufnahme nach der Spülung mit der S-P in 1000- und 10000- facher Vergrößerung. Die Tragedauer beträgt 48 h, wobei viermal mit der Spüllösung gespült wurde. Es liegen sowohl bakterienfreie (1) als auch eine mit Bakterien bedeckte Oberfläche (2) vor. Der Biofilm weist eine veränderte Struktur auf und die Bakterienmorphologie ist nicht mehr intakt.



**Abbildung 16:** Repräsentative Aufnahme nach der Spülung mit der HAP-P in 1000- und 10000- facher Vergrößerung. Die Tragedauer beträgt 48 h, wobei viermal mit der Spüllösung gespült wurde. Teile der Oberfläche sind mit alteriertem Biofilm bedeckt, andere Teile nur mit der Pellikel. Bei der höheren Vergrößerung lassen sich auch hier Zahnpastarückstände (Pfeile) erkennen. Nur wenige Bakterien zeigen eine intakte Morphologie.

Enzym-Paste (ENZ-P)	
1000x	10000x
	

**Abbildung 17: Repräsentative Aufnahme nach der Spülung mit der ENZ-P in 1000- und 10000- facher Vergrößerung. Die Tragedauer beträgt 48 h, wobei viermal mit der Spüllösung gespült wurde. Die Schmelzoberfläche ist teilweise von der Pellicel, teilweise von alteriertem Biofilm bedeckt. Die Morphologie der Bakterien erscheint nicht mehr intakt.**

## 4.2.2 Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

Die EDX Analyse dient als Ergänzung zur Fluoreszenzmikroskopie zur Bestimmung von Zahnpastarückständen. Bei den verschiedenen Prüfkörpern konnten bei den selbst hergestellten Spüllösungen auf Basis von Zahnpasta Rückstände detektiert werden, die sich auf Putzkörper in Form von Siliciumrückständen und den Weißmacher Titandioxid zurückführen lassen. Sowohl bei der Spülung mit der Standard-Paste als auch bei der Spülung mit der Sensitiv-Paste traten die Rückstände nur sporadisch auf. Bei beiden Spüllösungen konnten erhöhte Werte von Silicium durch die Analyse nachgewiesen werden, was auf den Verbleib von Abrasionstoffen der Zahnpaste schließen lässt (siehe Abbildung 20, 21). Die bei der Standard-Paste erhöhten Sauerstoff- und Aluminiumanteile könnten einen Schluss auf das in der Spüllösung enthaltene Aluminiumlactat zulassen (siehe Abbildung 20). Bei der Hydroxylapatit-Paste lagen zahlreiche Rückstände der Zahnpasta vor. Durch die Flächenanalyse der Prüfkörper und die Zusammensetzung der einzelnen Anteile konnte auf das enthaltene Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$ ) geschlossen werden (siehe Abbildung 23). Die mit der Enzym-Paste umspülten Prüfkörper wiesen ebenfalls häufig Zahnpastarückstände auf. Diese waren vor allem durch einen hohen Anteil an Titan und Sauerstoff gekennzeichnet, welche in dieser Zahnpasta als Weißmacher in Form von Titandioxid fungieren (siehe Abbildung 24).

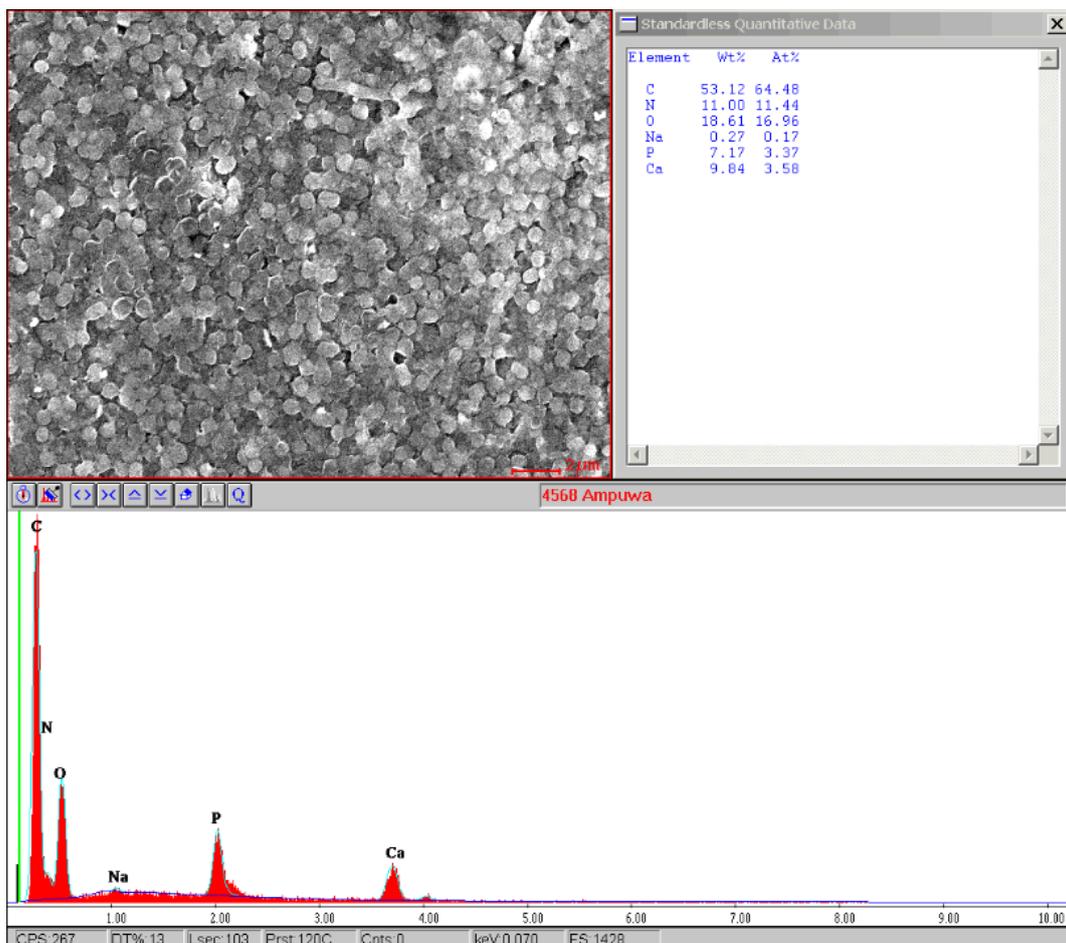


Abbildung 18: EDX Flächenanalyse nach der Spülung mit Wasser

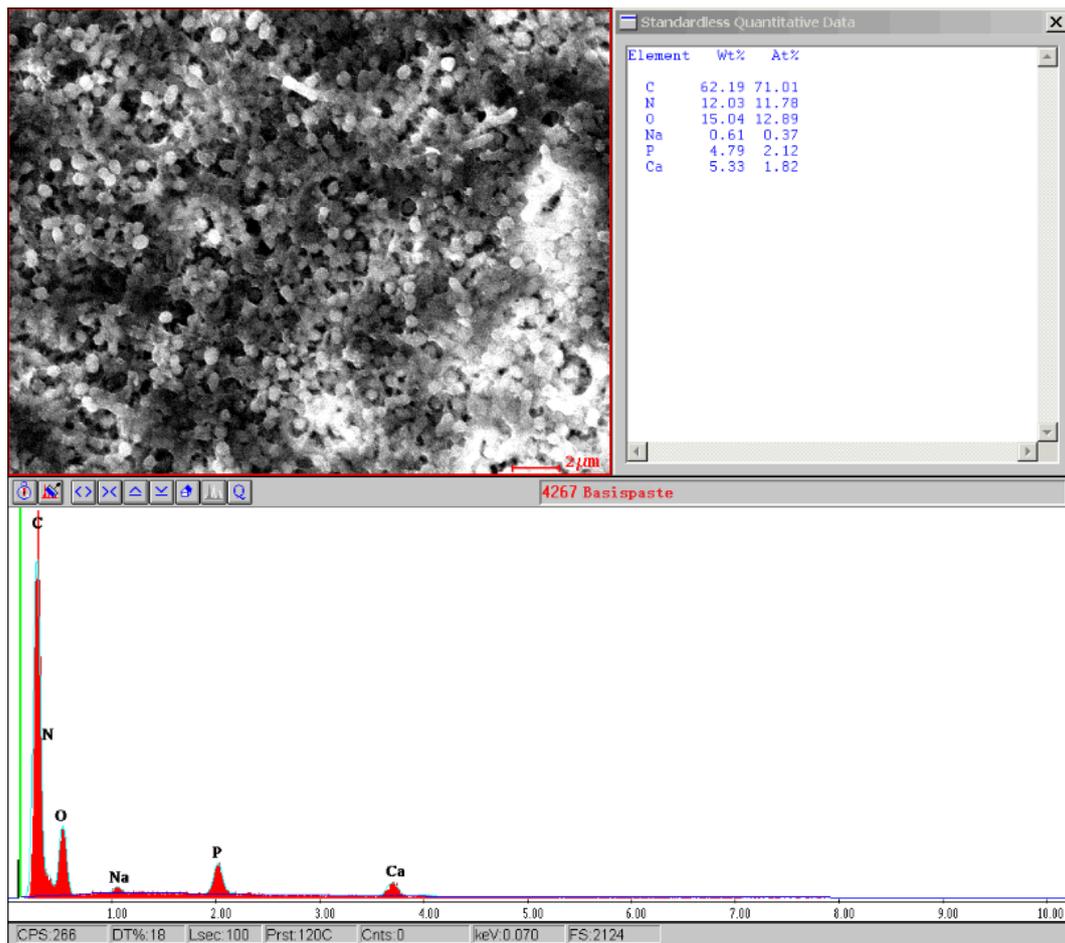


Abbildung 19: EDX Flächenanalyse nach Spülung mit B-P, kein Hinweis auf Rückstände der Paste auf den Prüfkörpern.

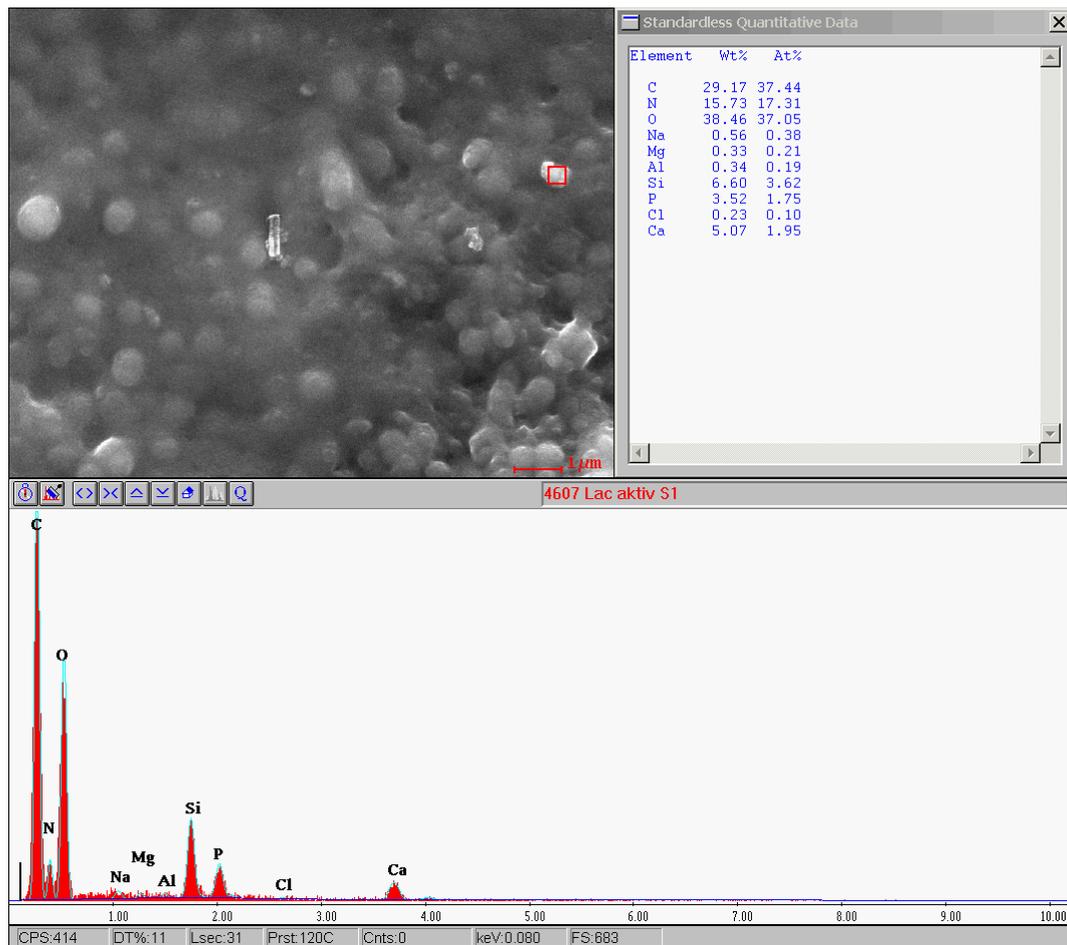


Abbildung 20: EDX Analyse nach Spülung mit der STD-P, durch die Punktanalyse konnte ein erhöhter Anteil an Sauerstoff (38,46 Gew.-%) und Aluminium (0,34 Gew.-%) festgestellt werden. Die erhöhten Sauerstoff- und Aluminiumanteile könnten einen Schluss auf das in der Spüllösung enthaltene Aluminiumlactat zulassen. Der erhöhte Siliciumanteil von 6,60 Gew.-% gibt Hinweis auf verbliebene Abrasionsstoffe der Zahnpasta.

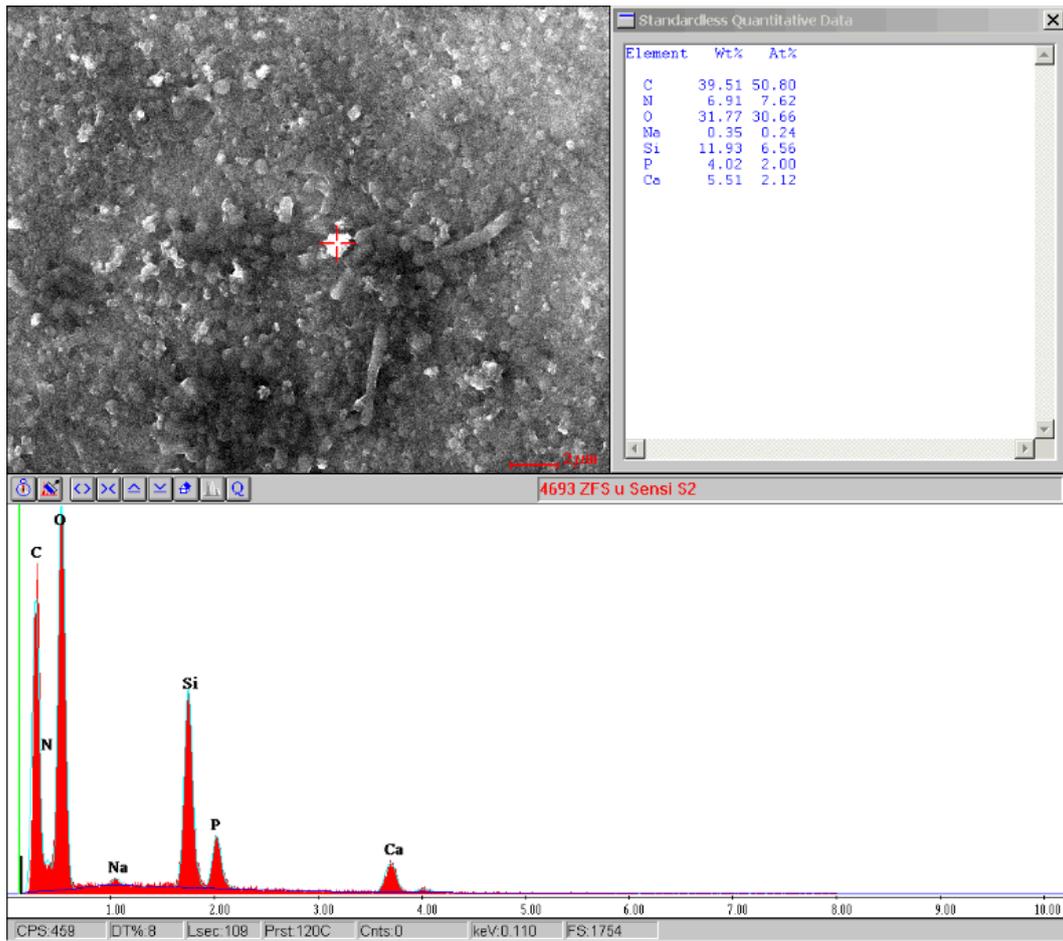


Abbildung 21: EDX Analyse nach Spülung mit der S-P, die Punktanalyse ergibt mit 11,93 Gew.-% einen erhöhten Wert an Silicium, was auf Rückstände der Abrasionsstoffe zurückzuführen ist

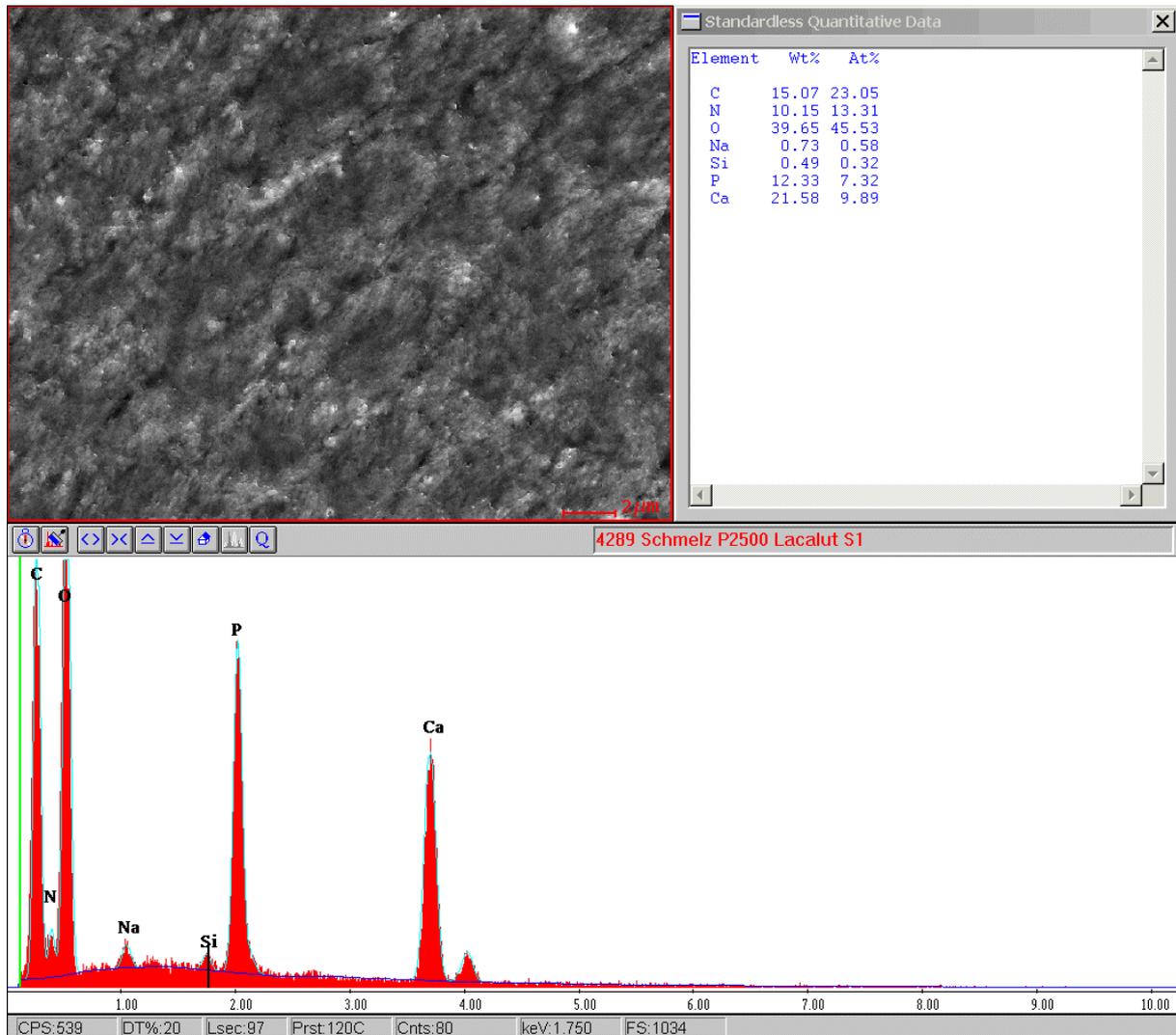
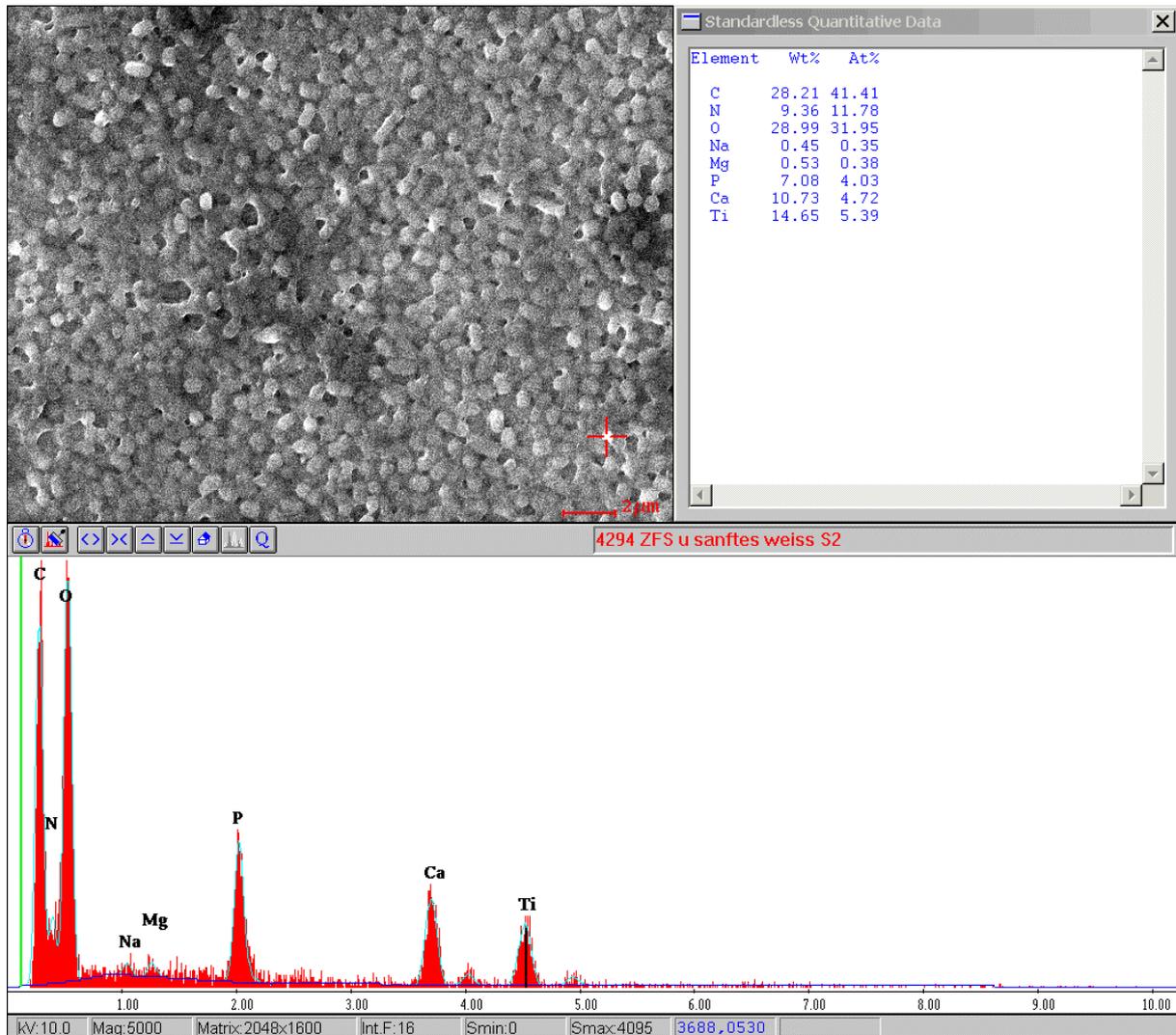


Abbildung 23: EDX Analyse nach Spülung mit der HAP-P, im Vergleich zur Negativkontrolle wurde bei der Flächenanalyse ein erhöhter Anteil an Calcium (21,58 Gew.- %), Sauerstoff (39,65 Gew.- %) und Phosphor (12,33 Gew.- %) festgestellt. Dies lässt den Schluss auf das in der Spüllösung enthaltene Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$ ) zu. Der zusätzlich erhöhte Siliciumanteil von 0,49 Gew.- % gibt Hinweis auf verbliebene Grundinhaltsstoffe der Zahnpasta.



**Abbildung 24: EDX Analyse nach Spülung mit der ENZ-P, durch die Punktanalyse konnte ein erhöhter Anteil an Titan (14,65 Gew.-%) und Sauerstoff (28,99 Gew.-%) nachgewiesen werden, was auf den Verbleib von Zahnpasta zurückzuführen ist.**

## 5 Diskussion

### 5.1 Fragestellung

Ziel dieser Studie war es, die Wirkung von Zahnpastasuspensionen auf den Biofilm zu untersuchen. Die Untersuchung sollte Erkenntnisse liefern, inwiefern die Zahnpasten allein, das heißt ohne den Einfluss des Putzens, die Biofilmneubildung beeinflussen. In vielen Studien wurde die Wirksamkeit einzelner Inhaltsstoffe, wie zum Beispiel die von CHX (siehe Kapitel 2.1.5), Aluminiumlactat [129] oder Hydroxylapatit [82] auf die Biofilmbildung nachgewiesen. Ziel war es, die Unterschiede von Wirkstoffkombinationen hinsichtlich der Biofilmreduktion herauszuarbeiten. Viele Studien, die sich mit der Wirkung von Zahnpasta auf den Biofilm beschäftigen, nutzen das aktive Putzen der Prüfkörper mit Zahnpasta zur Versuchsdurchführung und/oder konzentrieren sich auf die Wirkung des beim Putzen entstehenden Schaums. In dieser Studie sollte lediglich die Wirkung der Inhaltsstoffe ohne mechanische Reinigung der Prüfkörper, jedoch unter Berücksichtigung von *in situ* vorkommenden Verdünnungseffekten, herausgearbeitet werden.

Als Spüllösungen wurden neben den Negativkontrollen Wasser und einer Basis-Paste ohne aktive Wirkstoffe eine Positivkontrolle mit Chlorhexidin (0,2 %) eingesetzt. Die Basis-Paste beinhaltete Grundstoffe von Zahnpasten wie PEG, Sorbitol, Hydroxyethylcellulose, Silicium, Titandioxid und SLS. CHX (0,2 %) diente als Positivkontrolle und sollte vor allem einen Vergleich zu den anderen Pasten darstellen, die ebenfalls CHX enthalten. Die Kombination von CHX und Natriumlaurylsulfat in einer Zahnpasta wird seit einer Publikation von Barkvoll et al. im Jahre 1989 kontrovers diskutiert [15]. Dieses Ergebnis, das nur auf der Verwendung von CHX-haltigen Mundspüllösungen nach der Verwendung von SLS-haltigen Zahnpasten beruhte, wurde jedoch widerlegt. Die Wirksamkeit von CHX in Zahnpasten wurde anschließend in mehreren Studien bestätigt [43,125]. Zu den Nebenwirkungen von CHX Spüllösungen gehören allerdings die Verfärbungen von Zahnoberflächen und Zunge (s. Kapitel 2.1.5). Bei der Verwendung von Zahnpasten mit 0,05 % CHX konnte diese Nebenwirkung in Langzeitstudien nicht nachgewiesen werden. Als Ursache wird von den Autoren eine zu geringe CHX-Konzentration vermutet, was Fragen zu einer überhaupt vorhandenen antimikrobiellen Wirksamkeit aufwirft [116]. Zusätzlich ist hier anzumerken, dass Verdünnungseffekte die effektive Konzentration weiter senken. Derzeit liegen wenige Studien vor, die die Wirkung von Zahnpasten auf die Biofilmneubildung nachweisen. Der direkte Einfluss in Form von Suspensionen ohne die Putzwirkung wurde *in situ* bisher nicht untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein Studiendesign entwickelt, das neben den 5 Zahnpasten auch eine Positiv- und Negativkontrolle beinhaltet.

## 5.2 Studiendesign

In der Vergangenheit wurden für ähnliche Studien unterschiedliche Modelle zur Analyse ausgewählt (siehe Kapitel 2.1.2). Sowohl *In-situ*- als auch *In-vitro*-Modelle kommen in Frage. In der durchgeführten Studie wurde ein *In-situ*-Modell zur Durchführung der Versuche gewählt. Im Gegensatz zu *In-vitro*-Studien haben *In-situ*-Studien per se eine höhere klinische Relevanz und unterscheiden sich im Aufbau und in der Durchführung. Vor allem in der Mundhöhle ist das *In-situ*-Modell zu bevorzugen, da Mikroorganismen hier einen komplexen Biofilm bilden und Speichel und Gewebe entscheidende Faktoren darstellen. Einige Bestandteile des Speichels sorgen zudem für eine Adhäsion der Mikroorganismen, was in *In-vitro*-Studien nicht derart dargestellt werden kann. Zudem erweist sich der Biofilm der Mundhöhle resistenter gegenüber antibakteriellen Substanzen [10]. Im Gegensatz dazu werden *In-vitro*-Studien häufig mit einzelnen oder der Kombination weniger Bakterien durchgeführt und die zu untersuchenden Substanzen haben eine längere Einwirkzeit. Dies ist einer der Gründe, warum die Ergebnisse von *In-situ*-Studien häufig von denen von *In-vitro*-Studien abweichen [53].

In der vorliegenden Studie wurde ein sogenanntes Cross-Over-Design gewählt, das in der Regel eine hohe Aussagekraft und statistische Effizienz aufweist. Bei diesem Design durchlaufen die Teilnehmenden zwei oder mehr Versuchsreihen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. In diesem Fall spülen alle Personen mit allen Spülungen und stellen ihre eigene Kontrolle dar. Dadurch wird die Variabilität zwischen den Testpersonen aus dem Vergleich zwischen den Gruppen herausgenommen. Aus diesem Grund sind Imbalancen in randomisierten kontrollierten Crossover-Designs eher selten [81]. Eine Auswaschphase zwischen den einzelnen Versuchen hat sich etabliert, was in der vorliegenden Studie vor allem die Substantivität von CHX berücksichtigt. CHX reichert sich nach einmaliger Anwendung bis zu 12 h in der Mundhöhle an und kann die Bakterienzahl im Speichel beeinflussen [93]. Nach 24 h ist dieser Einfluss jedoch überwunden [32]. Zwischen jedem Versuch wurde eine Auswaschphase von 14 Tagen gewährleistet. Die Tragedauer der einzelnen Versuche wurde auf 48 h festgelegt, da dem System Mundhöhle eine längere Zeit zur Adaptation gegeben werden sollte als die sonst üblichen Tragezeiten von 24 Stunden. Vor allem konnte nach 24 h unter dem Einfluss der CHX-haltigen Zahnpasten nicht genügend Biofilm nachgewiesen werden, so dass eine Diskriminierung zwischen den Zahnpasten nicht zu erwarten war.

## 5.3 Prüfkörper

Die 168 genutzten Prüfkörper wurden aus bovinen Zähnen hergestellt. Humane Zähne wären zwar ebenfalls nutzbar, jedoch unterscheiden sich Rinderzahnschmelz und humaner Zahnschmelz in ihrer strukturellen und chemischen Zusammensetzung nicht wesentlich voneinander, obwohl Rinderzähne größere Schmelzkristalle und eine andere interprismatische Substanz aufweisen [87]. Die Gewinnung von Prüfkörpern aus humanen Zähnen in dieser Größenordnung ist aus mehreren Gründen sehr

schwierig. Zähne werden häufig aufgrund von Karies oder auch in Folge von anderen größeren Defekten extrahiert, wodurch eine Aufbereitung genügend großer Schmelzproben häufig nicht möglich ist. Für die Untersuchung von Biofilmen ist die Verwendung von bovinen Prüfkörpern etabliert [103]. Auch Aspekte der Akzeptanz der Studienteilnehmer spielten bei humanen Präparaten eine Rolle, während bei der Nutzung von Rinderzahnschmelz keine Bedenken bestanden. Dadurch, dass die Rinder in der Zucht ähnlichen Umweltbedingungen ausgesetzt sind, wird eine Reproduzierbarkeit als gegeben angenommen [137].

### 5.4 Auswahl der Teilnehmenden

An der Studie nahmen 6 Versuchspersonen teil. Bei den Teilnehmenden handelte es sich entweder um Studierende der Zahnmedizin oder zahnärztliches Personal. Vor Versuchsbeginn konnten anamnestisch Erkrankungen ausgeschlossen werden, die einen Einfluss auf den Speichel und die Speichelflussrate haben. Ebenfalls lag keine Antibiotikaeinnahme innerhalb der letzten 6 Monate vor. Die Personen wiesen ein kariesfreies Gebiss und gesunde orale Zustände auf. Studien wie diese sind sowohl für die Teilnehmenden als auch für die forschenden Personen sehr aufwändig in der Durchführung und in der Vor- und Nachbereitung. Die Personen mussten die Schienen jeweils 48 h tragen und neben der regulären Mundhygiene mit Mundpflegeprodukten auch auf den Konsum von Nikotin und Alkohol verzichten. Sie wurden angehalten, die Schiene lediglich zum Essen aus der Mundhöhle zu entfernen und während der Tragezeit nur Wasser zu trinken. Um den Anforderungen als Testperson mit Blick auf Compliance und Zuverlässigkeit gerecht zu werden, wurden nur Personen rekrutiert, die auch in der Forschung und im Labor tätig sind. Aufgrund der vielen Rahmenbedingungen war nur eine Anzahl von 6 Personen realisierbar, allerdings werden viele, vergleichbare Studien mit der gleichen Anzahl durchgeführt [13,59,122,129].

### 5.5 Darstellung und Untersuchung des Biofilms

#### 5.5.1 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Visualisierung und Beurteilung der Bakterien wurde die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt, die eine Unterscheidung zwischen vitalen und avitalen Bakterien ermöglicht. Obwohl eine Unterscheidung zwischen Stäbchen und Kokken möglich ist, wurde zur besseren Visualisierung zusätzlich die Rasterelektronenmikroskopie eingesetzt. Die angewandte Technik hat sich als geeignete Methode zur Untersuchung des Biofilms und der Wirkung antimikrobieller Substanzen auf den Biofilm etabliert [12]. Zur Darstellung des Biofilms wurden 2 Färbelösungen verwendet, zum einen Propidium Iodid (PI) und zum anderen SYTO 9. Beide Farbstoffe sind in der Lage, sich in die doppelsträngige DNA der Bakterien einzulagern. Dabei ist zu unterscheiden, dass sich SYTO9 sowohl in lebenden als auch in toten Zellen einlagert, während sich PI nur in toten Zellen einlagern kann. Liegen beide Farbstoffe in einer Zelle vor, ist PI in der Lage SYTO 9 zu verdrängen. Dementsprechend erscheinen lebende

Zellen nach der Färbung grün und tote Zellen rot [16]. Diese Methode hat sich als zuverlässig erwiesen, ist einfach durchzuführen und zeigt einen guten Farbkontrast zwischen den grünen und roten Bakterien [18,34].

Die vorliegende Methode und ihre Auswertung sollten jedoch auch kritisch hinterfragt werden. Es scheint eine Korrelation zwischen dem Färbevermögen und dem physiologischen Zustand der einzelnen Bakterien zu geben. Daraus kann geschlossen werden, dass Bakterien mit hoher Wachstumsrate und aktivem Stoffwechsel stärker fluoreszieren als Bakterien mit inaktivem Stoffwechsel, was bei der Auswertung berücksichtigt werden muss [16]. In mehreren Studien wurde postuliert, dass die Zellen nach der Färbung ihre Lebensfähigkeit verlieren. Diese Aussage konnte durch verschiedene Auswertungen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die ungefärbten Kontrollen intakte Bakterien aufwiesen, während bei den gefärbten Bakterien eine Lyse und Zerstörung der anhaftenden Bakterien nachgewiesen werden konnte [128,140]. Bei der Aufnahme der Bilder der einzelnen Prüfkörper wurde daher eine kurze Bearbeitungszeit von nicht mehr als 10 min angestrebt. Ein weiterer Aspekt, der bei der Auswertung berücksichtigt werden muss, ist die fehlende Differenzierung zwischen oberflächlichen und tieferen Plaqueschichten bei einem mehrschichtigen Biofilm [12]. Dies kann sich auf die Auswertung auswirken, da das Fluoreszenzmikroskop die Belichtungszeit automatisch anpasst. Liegt eine Probe mit dickem und dünnem Biofilm in einer Region vor, erfolgt eine Anpassung der Belichtungszeit in Richtung des dickeren Biofilms. Dies führt in einigen Fällen zu einer kürzeren Belichtungszeit für den dünneren Biofilm, wodurch dieser als weniger hell dargestellt wird, was bei der späteren Auswertung der Einzelbilder fälschlicherweise nicht korrekt beurteilt werden kann.

Zur Bestimmung der Bedeckung und der Vitalität wurden zwei Analyseverfahren angewendet. Zum einen wurde die Software Image J verwendet, zum anderen ein Scoring. Image J wurde im Jahre 1987 eingeführt und zählt zu den etabliertesten wissenschaftlichen Auswertungsprogrammen [123]. Die Bakterien können zur Bestimmung der Bedeckung und der Vitalität anhand von Pixeln ausgewertet werden. Um die Bedeckung zu bestimmen, wurden die farbigen Bilder bewertet, zur Bestimmung der Vitalität jeweils die grauen Bilder des grünen und roten Kanals. Ein Nachteil bei der Auswertung besteht in der bereits erwähnten Problematik bei heterogenen Biofilmen. Um solche Ergebnisse zu verifizieren und die Biofilmbedeckung zu beschreiben, wurde ein Scoring verwendet, das sich an den Stadien der Biofilmbildung orientiert. Somit kann eine Zuordnung zu den einzelnen Phasen stattfinden. Die erste Phase, die Pellikelbildung, stellt die Voraussetzung für die Biofilmbildung dar. Darauf folgt eine unspezifische, reversible Wechselwirkung zwischen der vorhandenen Pellikelschicht und Mikroorganismen. Es folgt die Phase der irreversiblen Wechselwirkung durch bakterielle Adhäsine. Nach der Anheftung einzelner Bakterien beginnt die Koadhäsion und weitere Bakterien lagern sich an, wodurch Kolonien entstehen. Die Entwicklung horizontaler und vertikaler Schichten führt zur Ausbreitung des Biofilm und schlussendlich auch zu Absiedlungen aus dem reifen Biofilm [58,142].

Der Vorteil des Scorings liegt in der schnelleren Auswertung im Vergleich zur digitalen Software und dem Ausschluss von humanen Zellen und der Hintergrundfluoreszenz. Eine Bewertung des Biofilms und dessen Zuordnung sind nur deskriptiv möglich. Insbesondere bei Prüfkörpern mit mehrschichtigem Biofilm, bei denen viele rote und grüne Bakterien vorhanden sind, kann es hier zu Ungenauigkeiten in der Auswertung kommen. Nach den Auswertungen mit beiden Analyseverfahren konnten Unterschiede in der statistischen Auswertung festgestellt werden. Obwohl die statistische Auswertung Unterschiede aufweist, stimmen die Ergebnisse der Auswertemethoden tendenziell überein.

### 5.5.2 Rasterelektronenmikroskopie

Um die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie zu verifizieren, wurde die Rasterelektronenmikroskopie verwendet. Auch wenn mit diesem Verfahren keine Unterscheidung zwischen vitalen und avitalen Bakterien möglich ist, kann eine genauere Analyse des Biofilms und der Bakterien hinsichtlich ihrer Struktur durchgeführt werden. Vorteilhaft bei diesem Verfahren ist die bis zu 20.000-fache Vergrößerung. Zusätzlich wurden neben der Beurteilung der einzelnen Bakterien auch EDX Analysen durchgeführt, mit denen Rückstände der jeweiligen Spüllösung identifiziert werden konnten. Aufgrund der zeitaufwändigen Vorbereitungsmaßnahmen der Prüfkörper und der fehlenden Unterscheidung zwischen avitalen und vitalen Bakterien sollte die Rasterelektronenmikroskopie nicht als alleinige Auswertungsmethode herangezogen werden, sondern wird ergänzend zur Fluoreszenzmikroskopie und für die bessere Visualisierung der Biofilme eingesetzt.

## 5.6 Ergebnisse

Bei den Teilnehmenden konnten zwar interindividuelle Unterschiede bezüglich der Biofilmmenge und der bakteriellen Vitalität festgestellt werden, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant. Der ANOVA-Test ergab keine signifikanten Unterschiede in der Vitalität ( $p = 0,42$ ) und in der Bedeckung ( $p = 0,76$ ). Durch diese Vergleichbarkeit unter den Teilnehmenden wird eine zuverlässige Gegenüberstellung der Ergebnisse gewährleistet.

### 5.6.1 Spülung mit Wasser

Bei der Negativkontrolle mit Wasser zeigte sich die höchste Bedeckung sowie Vitalität aller Spüllösungen. Sowohl das Scoring als auch die Auswertung mit ImageJ ergaben eine mittlere Bedeckung und Vitalität von  $\geq 50\%$  bzw. einem Score von  $\geq 4$ . Der hohe Scorewert deutet auf einen etablierten Biofilm hin. Diese Ergebnisse stimmen mit vergleichbaren Untersuchungen und der Literatur überein [44,121]. Die mit Wasser gespülten Prüfkörper zeigten sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch rasterelektronenmikroskopisch mehrschichtige Biofilme und große Bakterienagglomerate.

### 5.6.2 Spülung mit Basis-Paste

Die Basis-Paste diente nicht nur als weitere Negativkontrolle, sondern wurde auch zur Bestimmung der Wirksamkeit der Grundinhaltsstoffe eingesetzt, um einen Vergleich zu den Zahnpasten herstellen zu können. Im Vergleich zur Wasserspülung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Vitalität ( $p = 0,69$ ) und in der Bedeckung ( $p = 0,13$ ). Dennoch wiesen die mit der Basispaste gespülten Prüfkörper in ihrer Tendenz eine geringere Bedeckung mit Biofilm auf als die mit Wasser gespülten Prüfkörper. Bei der Wasserspülung betrug die Bedeckung im Mittel 71,84 % bzw. einen Score von 5, während die Basispaste die Bedeckung im Durchschnitt auf 47,02% bzw. einen Score von 4 reduzieren konnte. Score 5 beschreibt die nahezu vollständige Bedeckung der Prüfkörper mit einem etablierten Biofilm, während der Biofilm bei Score 4 die Oberfläche noch nicht vollständig bedeckt. Rasterelektronenmikroskopisch wurden bei der Spülung mit der Basispaste mehrschichtige Biofilme beobachtet und die Morphologie der Bakterien erschien überwiegend intakt. Im Vergleich zur rasterelektronenmikroskopischen Auswertung der Wasserspülung ist eine geringere Bedeckung zu erkennen, was die fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse bestätigt. Die Ergebnisse belegen somit die Wirksamkeit der Basiskomponenten. Die Wirksamkeit der Basispaste könnte auf den Inhaltsstoff Sorbitol zurückzuführen sein. Sorbitol wird in erster Linie als Feuchthaltemittel in Zahnpasten eingesetzt (siehe Kapitel 2.1.4.). Es handelt sich um ein natürlich vorkommendes, hydriertes Kohlenhydrat, das in vielen Lebensmitteln verwendet wird. Mundspülungen, Kaugummis oder Lutschtabletten enthalten Sorbitol häufig als antikariogenen alternativen Süßstoff. In einer *in vitro* Studie konnte eine hemmende Wirkung auf die Biofilmbildung von *S. mutans* nachgewiesen werden [24]. Um diese These zu untermauern, sind weitere Untersuchungen mit Sorbitol allein notwendig. Im Gegensatz zu den vier getesteten Zahnpasten zeigte jedoch das Spülen mit Basis-Paste eine höhere Bedeckung und Vitalität. Im Umkehrschluss unterstreicht dieses Ergebnis die Wirkung der zusätzlichen Inhaltsstoffe der jeweiligen Zahnpasta.

### 5.6.3 Spülung mit Chlorhexidin

Die 0,2 %ige CHX Spüllösung wurde in dieser Versuchsreihe als Positivkontrolle eingesetzt. Der Wirkstoff weist antibakterielle und antiadhärente Eigenschaften auf und gilt als Goldstandard in der Biofilmkontrolle (s. 2.1.5). Die mit CHX umspülten Prüfkörper wiesen die geringste Biofilm-Bedeckung für alle Spüllösungen und Suspensionen auf, was auf die antiadhärente Wirkung zurückzuführen ist. CHX kann mit Substanzen mit negativ geladener Oberfläche interagieren, wodurch eine Bindung mit Speichelproteinen möglich wird. Dadurch kann CHX an die bereits gebildete Pellikel und an Hart- und Weichgewebe binden [92,93]. Die veränderte Pellikelschicht wurde rasterelektronisch gekennzeichnet durch globuläre Partikel in einer Größe von etwa 200nm. Die Vitalitätswerte scheinen im Vergleich zu den Versuchsreihen vorerst höher zu sein, jedoch ist dieser Wert sowohl nach der Auswertung mit Image J als auch nach dem Scoring nicht sonderlich aussagekräftig. Begründet

werden können diese Ergebnisse mit der geringen Bedeckung der Prüfkörper. Dadurch werden oft nur vereinzelte, vitale Bakterien detektiert und das Verhältnis von vitalen zu avitalen Bakterien kann schnell falsch eingeschätzt werden, da es sich nicht um Biofilme, sondern um zufällig angelagerte Bakterien handeln kann. Die Bedeckung ergab sowohl zur Wasserspülung als auch zur Basis-Paste signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) und ist mit 9,55 % als gering einzustufen. Beim Scoring wies die CHX-Spüllösung den niedrigsten Wert auf. Somit konnte nur zwischen CHX und Wasser eine signifikante Reduktion ( $p < 0,05$ ) festgestellt werden, zwischen CHX und der Basis Paste lagen tendenzielle Unterschiede ( $p = 0,054$ ) vor. Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie konnte die geringe Bedeckung bestätigt werden. Obwohl diese Methode keine Aussage über die Vitalität der Bakterien zulässt, weisen die Prüfkörper nur wenige bakterienbedeckte Areale auf und es sind nur vereinzelt Bakterien zu finden. Zudem erschien der Biofilm verändert und die Struktur der Bakterien kann als nicht mehr intakt eingestuft werden. Die antiadhärente Wirkung von CHX wurde in dieser Studie sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch rasterelektronenmikroskopisch bestätigt.

#### 5.6.4 Spülung mit Pasten

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle getesteten Pasten eine Biofilmreduktion gegenüber Wasser bewirken konnten, da sowohl die Bedeckung als auch die Vitalität deutlich reduziert wurden. Eine Reduktion der Vitalität und der Bedeckung auf  $\leq 40$  % und einen Score von  $\leq 3$  konnte erreicht werden. Um die Unterschiede zwischen den einzelnen Spüllösungen zu verdeutlichen, ist ein Rückschluss auf die jeweiligen Inhaltsstoffe notwendig. Als Grundkomponenten sind in den verschiedenen Pasten Natriumfluorid, Aluminiumlactat (0,8 %), CHX (0,05 %), Poloxamer, Menthol, Aroma, Sorbitlösung sowieso Silicium enthalten. In früheren Studien konnte sowohl die Wirkung von CHX als auch von Aluminiumlactat auf die Biofilmreduktion nachgewiesen werden [93,129,131]. Im Gegensatz dazu konnten in der vorliegenden Studie die Unterschiede von Wirkstoffkombinationen in Form von Spüllösungen ohne mechanische Reinigung untersucht werden. Die Analyse erfolgte unter Berücksichtigung von *in situ* vorkommenden Verdünnungseffekten. Obwohl alle Pasten einen positiven Effekt auf die Biofilmreduktion besitzen und rasterelektronenmikroskopisch alterierte Biofilme aufwiesen, gibt es einige Unterschiede zwischen ihnen. Vergleicht man die fluoreszenzmikroskopischen Werte der Standard-Paste mit denen der Sensitiv-Paste, so zeigen sich nur geringe Unterschiede. Die Standardpaste konnte die Bedeckung auf 31,02 % bzw. einen Score von 3 und die Vitalität auf 30,51 % bzw. einen Score von 3 reduzieren. Rasterelektronenmikroskopisch wurden bei der Spülung mit der Standard-Paste sowohl Bakterienagglomerate als auch nur von der Pellicel bedeckte Bereiche beobachtet. Bei höheren Vergrößerungen zeigten einige Bakterien teilweise eine intakte Morphologie, einige Bakterien befanden sich in der Zellteilung. Mit der Sensitiv-Paste konnte eine höhere Reduktion der Bedeckung (28,97 % bzw. Score von 2) und der Vitalität (28,18 % bzw. Score von 2) nachgewiesen werden. Rasterelektronenmikroskopisch konnten diese Ergebnisse belegt werden. Die mit der Sensitiv-Paste umspülten Prüfkörper wiesen einen alterierten Biofilm auf. Große Areale waren hier nur von der

Pellikel bedeckt und die vorhandenen Bakterien konnten keine intakte Morphologie mehr aufweisen. Die geringen Unterschiede könnten auf den Zusatz von Strontiumacetat oder Kaliumchlorid zurückzuführen sein, was in weiteren Untersuchungen durch die Testung der Einzelsubstanzen zu prüfen wäre. Obwohl in der Enzym-Paste weitere Inhaltsstoffe wie Papain (0,012 %), Bromelain (0,05 %) oder Hyaluronsäure (0,2 %) enthalten sind, ist die Vitalität mit 39,21 % und einem Scoring von 3 unter den Pasten in dieser Versuchsreihe am höchsten. Die mittelwertige Bedeckung der Enzym-Paste (29,54 % bzw. Score von 2) kann mit den Mittelwerten der Standard-Paste und der Sensitiv-Paste verglichen werden. Dort gab es keine signifikanten Differenzen. Rasterelektronisch wiesen die mit der Enzym-Paste umspülten Prüfkörper hingegen nur wenige bakterienfreie Areale auf, wobei auch hier alterierte Biofilme vorlagen. Die Morphologie der Bakterien erschien nicht mehr intakt. Bromelain, welches in der Enzym-Paste enthalten ist, wird in einer *In-vitro*-Studie die Möglichkeit mit der Zahnoberfläche zu interagieren, zugesprochen. Es ist in der Lage, die Oberflächenspannung der Bakterien zu verringern, indem es Speichelproteine und Glykoproteine hydrolysiert. Diese Proteine sind bakterielle Botenstoffe, die dazu dienen, an der Zahnoberfläche zu haften [80]. Eine weitere *In-vitro*-Studie konnte eine wachstumseinschränkende Wirkung auf *Streptococcus mutans* nachweisen, allerdings in höheren Konzentrationen ab 35% [114]. Aufgrund der gleichen Grundformulierung der Pasten lässt sich bei der Enzym-Paste schlussfolgern, dass die zusätzlichen Stoffe Papain, Bromelain und Hyaluronsäure in dieser Studie keine zusätzliche antibakterielle Wirkung zeigen. Ob diese fehlende Wirkung auf eine zu geringe Konzentration in den Zahnpasten oder eine mögliche Wechselwirkung beziehungsweise Inhibition durch andere Inhaltsstoffen zurückzuführen ist, bleibt Bestandteil weiterer Forschung.

Davon abzugrenzen ist die HAP-Paste, die sich von den Werten her am stärksten von allen anderen Spülungen unterscheidet. Obwohl hier mit 40,37% und einem Score von 3 im Mittel die höchste Bedeckung unter den Pasten vorliegt, konnte eine starke antibakterielle Wirkung festgestellt werden. Mit 9,27 % und einem Score von 2 konnte diese Lösung im Vergleich zu allen anderen getesteten Substanzen die Vitalität am stärksten reduzieren. Fluoreszenzmikroskopisch führte das Spülen mit der Hydroxylapatit-Paste ebenfalls zu einem alterierten Biofilm. Nur wenige Bakterien zeigten eine intakte Morphologie und Zellteilungen waren selten zu beobachten. Diese Wirkung ist am ehesten auf den Zusatz von Hydroxylapatit zurückzuführen, was in einer Studie von Nobre und Mirela bestätigt werden konnte [101]. Eine weitere mögliche Erklärung für die Wirkung von HAP und CHX könnte in einer synergistischen Beziehung zwischen den beiden Stoffen liegen. In früheren Studien wurden HAP und CHX entweder einzeln untersucht und verglichen [101,122] oder als Kombinationspaste wie in der vorliegenden Studie analysiert. Zukünftige Studien sollten daher potenzielle Synergieeffekte zwischen HAP und CHX untersuchen.

Alle Zahnpasten dieser Studien enthielten 0,05% CHX, wobei durch Verdünnung der Suspension und unter Berücksichtigung der Verdünnung durch den Speichel eine geringere Konzentration erreicht wurde. Die ausschließlich biofilminhibierende Wirkung wurde aufgrund der zugesetzten Wirkstoffe

nicht analysiert, außerdem wurde in dieser Studie nur die Kurzzeitanwendung untersucht, so dass derzeit keine Aussage über die Langzeitanwendung getroffen werden kann. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Langzeitanwendung einer 0,05%igen CHX-Paste mit Aluminiumlactat eine positive Wirkung auf den Gingiva-Index hat, ohne dass Nebenwirkungen auftraten. Die Autoren vermuten eine zu geringe CHX-Konzentration, was Fragen zu einer überhaupt antimikrobiellen Wirksamkeit aufwirft [116]. In anderen *In-situ*-Studien konnte gezeigt werden, dass durch niedrige Konzentrationen von 0,06% Chlorhexidin in Mundspülungen eine deutliche Veränderung stattfindet und ein signifikanter Unterschied zur Placebospülung besteht [28,64,113]. Auch bei Konzentrationen von 0,05 % und 0,025 % konnte *in vitro* eine antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden [96]. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, um festzustellen, ob eine Zahnpasta mit vergleichbarer niedriger Dosierung von Chlorhexidin ebenfalls diese Effekte hervorrufen kann.

Abschließend stellt sich die Frage, ob eine Zahnpasta mit CHX langfristig zur Mundhygiene empfohlen werden kann. Auch wenn die in Kapitel 2.1.5 beschriebenen Nebenwirkungen bei der niedrig dosierten Formulierung nicht beobachtet werden konnten, darf eine mögliche Resistenzentwicklung von Mikroorganismen nicht außer Acht gelassen werden. Ein niedrig konzentriertes Biozid kann nicht nur in der Mundhöhle, sondern auch im Abwassermikrobiom zu Resistenzentwicklungen führen. Es wurde über Ausbrüche im Zusammenhang mit kontaminierten CHX-Lösungen berichtet, was auf die Anpassungsfähigkeit von Bakterien hinweist. Obwohl selten, wurden klinische Isolate mit verminderter Empfindlichkeit gegenüber CHX beobachtet, beispielsweise beim multiresistenten *Staphylococcus aureus*. Studien unterstreichen die Notwendigkeit einer erhöhten Wachsamkeit gegenüber resistenten Bakterien in der Zahnplaque und weisen auf das potenzielle Risiko einer langfristigen Anwendung antimikrobieller Mittel hin. Werden Antiseptika jedoch mit Vorsicht und in den richtigen Situationen eingesetzt, wird das Gesamtrisiko einer erworbenen Resistenzentwicklung als gering eingeschätzt [119,135]. Ein weiteres Problem bei der Langzeitanwendung ist die Wirkung von CHX auf die Stickstoffmonoxid (NO)-Synthese. In der Mundhöhle sind verschiedene Bakterien in der Lage, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren, einer wichtigen Vorstufe des Moleküls Stickstoffmonoxid. Der größte Anteil des mit der Nahrung aufgenommenen Nitrats stammt aus Blatt- und Wurzelgemüse. NO wird eine wichtige homöostatische Rolle in biologischen Prozessen des Körpers zugeschrieben [97]. Eine verminderte Bioverfügbarkeit des Moleküls ist ein Kennzeichen einer endothelialen Dysfunktion, die ein Bindeglied zwischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Adipositas, Diabetes und periodontalen Erkrankungen darstellt [49,98]. Das orale Mikrobiom ist sehr formbar und reagiert schnell auf innere und äußere Einflüsse. Daher spielt es eine Schlüsselrolle für die menschliche Gesundheit und kann zur Verbesserung der NO-Produktion positiv beeinflusst werden [21]. Studien haben gezeigt, dass die Anwendung von CHX über einen Zeitraum von bis zu sieben Tagen die Nitratproduktion um 90% reduziert [17,74]. Bescos et al. stellten zudem fest, dass die Nutzung von CHX zu einer deutlichen Verringerung der Nitratproduktion durch die Reduktion bestimmter Bakterienarten wie *Veillonella* und

*Aktinomyzeten* führt [17]. Eine Langzeitanwendung könnte daher drastische Auswirkungen auf das orale Mikrobiom und den systemischen NO-Spiegel haben.

Angesichts der beschriebenen Nebenwirkungen von Chlorhexidin stellt sich die Frage nach alternativen antimikrobiell wirksamen Substanzen, die keine derartigen Nebenwirkungen aufweisen. In der Literatur werden einige Substanzen diskutiert und bereits in Mundspüllösungen und Zahnpasten eingesetzt, wie z.B. Cetylpyridiniumchlorid (CPC) oder ätherische Öle (EO). CPC, eine quaternäre Ammoniumverbindung, wird wegen seiner antimikrobiellen Wirkung Lutschtabletten und Mundspüllösungen zugesetzt. Es besitzt ein breites antimikrobielles Spektrum mit bakterizider Wirkung auf grampositive Bakterien. CPC ist einer der häufigsten Inhaltsstoffe in Mundspüllösungen und liegt in der Regel in einer Konzentration von 0,05 % vor [132]. Mehrere *In-situ*-Studien haben gezeigt, dass dieser Inhaltsstoff den Biofilm reduzieren kann [88,127,139]. Als Mundspülung zeigt es signifikante Vorteile bei der Reduktion von Plaqueansammlung und Gingivitis [63] und ist in der Lage, Gingivitis und Plaqueparameter signifikant zu reduzieren [42,79]. Eine weitere Alternative können ätherische Öle sein, die bereits in Mundspülungen als auch in Zahnpasten enthalten sind. Ätherische Öle (EO) sind Stoffgemische aus pflanzlichen Ausgangsprodukten mit antimikrobieller und antiinflammatorischer Wirkung. In den meisten Produkten handelt es sich um Gemische von Ölen, zum Beispiel eine Kombination aus Menthol, Thymol, Eukalyptol oder Teebaum- und Nelkenöl [14,126]. Metaanalysen konnten eine antimikrobielle Aktivität und eine Reduktion von Plaque und Gingivitis bestätigen [41,54]. Die Langzeitanwendung von EO erwies sich als unproblematisch, da keine unerwünschten Verschiebungen in der supragingivalen mikrobiellen Zusammensetzung auftraten. Auch eine Veränderung der Resistenz gegenüber antiseptischen Mitteln wurde nicht beobachtet, was darauf hindeutet, dass EO die Resistenzentwicklung nicht fördert [126]. In einer Studie von Mitsui et al. konnte außerdem gezeigt werden, dass das orale Mikrobiom und die Nitratreduktion durch ätherische Öle nicht signifikant beeinflusst wird [95]. Ätherische Öle scheinen somit eine zuverlässige Alternative zu CHX zu sein [112,126,130].

## 5.7 Schlussfolgerung

In der vorliegenden *In-situ*-Studie wurde der biofilminhibierende Effekt aller getesteten Zahnpastasuspensionen bei wiederholter Anwendung über 48 h nachgewiesen. Die antimikrobielle Wirkung von CHX (0,05%) und Aluminiumlactat (0,8%) konnte bestätigt werden. Neben der Grundformulierung der jeweiligen Paste konnte durch Zugabe von aktiven Wirkstoffen gezeigt werden, dass die HAP-Paste mit 5 %igem Hydroxylapatit den größten antibakteriellen Effekt zeigte. Die Enzym-Paste mit Zugabe von Papain, Bromelain und Hyaluronsäure konnte im Vergleich zu den anderen drei Pasten keine weitere Reduktion des Biofilms bewirken. Auch die Sensitiv-Paste hatte ebenfalls einen positiven Effekt auf die Biofilmreduktion, jedoch sind weitere Untersuchungen notwendig, um gegebenenfalls Rückschlüsse auf Kaliumchlorid oder Strontiumacetat ziehen zu können. Da in der Langzeitanwendung von Chlorhexidin Nebenwirkungen wie Verfärbungen der Zähne, Resistenzentwicklungen und gesundheitliche Probleme durch Reduktion des Nitratstoffwechsels auftreten können, scheinen ätherische Öle (EO) eine zuverlässige Alternative zu sein.

## 6 Literaturverzeichnis

Literatur gem. Vorgaben des Medizinischen Fakultät der UdS.

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE (2005) Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *J Clin Microbiol* 43:5721–5732
2. Addy M, West NX (2013) The role of Toothpaste in the Aetiology and Treatment of Dentine Hypersensitivity. S.Karger AG
3. Agrawal P, Nikhade P, Patel A, Mankar N, Sedani S (2022) Bromelain: A Potent Phytomedicine. *Cureus* 14:e27876
4. Alharbi MS, Alshehri FA, Alobaidi AS, Alrowis R, Alshibani N, Niazy AA (2023) High molecular weight hyaluronic acid reduces the growth and biofilm formation of the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Saudi Dent J* 35:141–146
5. Alli BY, Erinoso OA, Olawuyi AB (2019) Effect of sodium lauryl sulfate on recurrent aphthous stomatitis: A systematic review. *J Oral Pathol Med* 48:358–364
6. Allison DG (2003) The biofilm matrix. *Biofouling* 19:139–150
7. Amaechi BT, van Loveren C (2013) Fluorides an Non-Fluoride Remineralization Systems. S.Karger AG URL: <https://karger.com/books/book/242/Toothpastes>
8. Amaechi BT, AbdulAzees PA, Alshareif DO, Shehata MA, Lima PP de CS, Abdollahi A, Kalkhorani PS, Evans V (2019) Comparative efficacy of a hydroxyapatite and a fluoride toothpaste for prevention and remineralization of dental caries in children. *BDJ Open* 5:18
9. Anil A, Ibraheem WI, Meshni AA, Preethanath RS, Anil S (2022) Nano-Hydroxyapatite (nHAp) in the Remineralization of Early Dental Caries: A Scoping Review. *Int J Environ Res Public Health* 19:5629
10. Anwar H, Strap JL, Costerton JW (1992) Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 36:1347–1351
11. Arnold WH, Gröger C, Bizhang M, Naumova EA (2016) Dentin abrasivity of various desensitizing toothpastes. *Head Face Med* 12:16
12. Arweiler N, Auschill T, Donos N, Sculean A (2002) Antibacterial effect of an enamel matrix protein derivative on in vivo dental biofilm vitality. *Clin Oral Investig* 6:205–209
13. Arweiler NB, Hellwig E, Sculean A, Hein N, Auschill TM (2004) Individual vitality pattern of in situ dental biofilms at different locations in the oral cavity. *Caries Res* 38:442–447

14. Aziz ZAA, Ahmad A, Setapar SHM, Karakucuk A, Azim MM, Lokhat D, Rafatullah M, Ganash M, Kamal MA, Ashraf GM Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. *Curr Drug Metab* 19:1100–1110
15. Barkvoll P, Rølla G, Svendsen K (1989) Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium lauryl sulfate in vivo. *J Clin Periodontol* 16:593–595
16. Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann H-U, Egli T (2007) Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 73:3283–3290
17. Bescos R, Ashworth A, Cutler C, Brookes ZL, Belfield L, Rodiles A, Casas-Agustench P, Farnham G, Liddle L, Burleigh M, White D, Easton C, Hickson M (2020) Effects of Chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. *Sci Rep* 10:5254
18. Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R (1999) LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods* 37:77–86
19. Bratthall D, Hänsel-Petersson G, Sundberg H (1996) Reasons for the caries decline: what do the experts believe? *Eur J Oral Sci* 104:416–422; discussion 423–425, 430–432
20. Brex M (1997) Strategies and agents in supragingival chemical plaque control. *Periodontol* 2000 15:100–108
21. Bryan NS, Burleigh MC, Easton C (2022) The oral microbiome, nitric oxide and exercise performance. *Nitric Oxide* 125–126:23–30
22. Buddecke E (2013) *Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin*. Walter de Gruyter
23. Casale M, Moffa A, Vella P, Sabatino L, Capuano F, Salvinelli B, Lopez MA, Carinci F, Salvinelli F (2016) Hyaluronic acid: Perspectives in dentistry. A systematic review. *Int J Immunopathol Pharmacol* 29:572–582
24. Chan A, Ellepola K, Truong T, Balan P, Koo H, Seneviratne CJ (2020) Inhibitory effects of xylitol and sorbitol on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* biofilms are repressed by the presence of sucrose. *Arch Oral Biol* 119:104886
25. Chandwani ND, Maurya N, Nikhade P, Chandwani J (2022) Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of calcium hydroxide, triple antibiotic paste and bromelain against *Enterococcus Faecalis*: An In Vitro study. *J Conserv Dent* 25:63
26. Chen L, Al-Bayatee S, Khurshid Z, Shavandi A, Brunton P, Ratnayake J (2021) Hydroxyapatite in Oral Care Products—A Review. *Materials* 14:4865
27. Cholmakow-Bodechtel C (2016) Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V). Deutscher

Zahnärzte Verlag DÄV, Köln

28. Claydon N, Smith S, Stiller S, Newcombe RG, Addy M (2002) A comparison of the plaque-inhibitory properties of stannous fluoride and low-concentration chlorhexidine mouthrinses. *J Clin Periodontol* 29:1072–1077
29. Colombo APV, Tanner ACR (2019) The Role of Bacterial Biofilms in Dental Caries and Periodontal and Peri-implant Diseases: A Historical Perspective. *J Dent Res* 98:373–385
30. Dahiya P, Kamal R (2013) Hyaluronic Acid: A Boon in Periodontal Therapy. *North Am J Med Sci* 5:309–315
31. Davari A, Ataei E, Assarzadeh H (2013) Dentin Hypersensitivity: Etiology, Diagnosis and Treatment; A Literature Review. *J Dent* 14:136–145
32. Davies R m., Børglum Jensen S, Rindom Schiøtt C, Løe H (1970) The effect of topical application of chlorhexidine on the bacterial colonization of the teeth and gingiva. *J Periodontal Res* 5:96–101
33. de Lencastre Novaes LC, Jozala AF, Lopes AM, de Carvalho Santos-Ebinuma V, Mazzola PG, Pessoa Junior A (2016) Stability, purification, and applications of bromelain: A review. *Biotechnol Prog* 32:5–13
34. Decker EM (2001) The ability of direct fluorescence-based, two-colour assays to detect different physiological states of oral streptococci. *Lett Appl Microbiol* 33:188–192
35. Deimling D, Hannig C, Hoth-Hannig W, Schmitz P, Schulte-Mönting J, Hannig M (2007) Non-destructive visualisation of protective proteins in the in situ pellicle. *Clin Oral Investig* 11:211–216
36. Deore SL, Khadabadi SS, KP C, PG B, Wane TP, Nagpurkar YR, Chanekar PD, Jain RG (2009) Properties and pharmacological applications of saponins.
37. Deutsche Gesellschaft für Parodontologie (DG PARO), Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK) (2018) Häusliches mechanisches Biofilmmangement in der Prävention und Therapie der Gingivitis. URL: <https://www.dgzmk.de/haeusliches-mechanisches-biofilmmangement-in-der-praevention-und-therapie-der-gingivitis>
38. Deutsche Gesellschaft für Parodontologie (DG PARO), Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK) (2018) Häusliches chemisches Biofilmmangement in der Prävention und Therapie der Gingivitis. URL: <https://www.dgzmk.de/haeusliches-chemisches-biofilmmangement-in-der-praevention-und-therapie-der-gingivitis>
39. Dietrich RE (1965) Oral proteolytic enzymes in the treatment of athletic injuries: a double-blind study. *Pa Med* 68:35–37
40. Douglas CW (1994) Bacterial-protein interactions in the oral cavity. *Adv Dent Res* 8:254–262

41. Eid Alroudhan I, Gamal M, Ganji KK, Khan AM, Alsharari KN, Alruwaili MK, Al Waqdani NH (2021) The Effectiveness of Mouthwashes With Various Ingredients in Plaque Control: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Altern Ther Health Med* 27:52–57
42. Elias-Boneta AR, Toro MJ, Mateo LR, Ahmed R, Morrison BM, Miller JM, Pilch S, Stewart B (2015) Efficacy of two fluoride-free, alcohol-free mouthwashes containing 0.075% or 0.07% CPC in controlling established dental plaque and gingivitis over a 6-week period on adults in Puerto Rico. *Am J Dent* 28 Spec No A:14A-20A
43. Elkerbout TA, Slot DE, Bakker EWP, Van der Weijden GA (2016) Chlorhexidine mouthwash and sodium lauryl sulphate dentifrice: do they mix effectively or interfere? *Int J Dent Hyg* 14:42–52
44. Feng J, Cheng L, Zhou X, Xu HHK, Weir MD, Meyer M, Maurer H, Li Q, Hannig M, Rupf S (2015) In situ antibiofilm effect of glass-ionomer cement containing dimethylaminododecyl methacrylate. *Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater* 31:992–1002
45. Fiedler HP (1967) Zur Prophylaxe der Zahnfleischentzündungen und Parodontopathien.
46. Flemming H-C, Neu TR, Wozniak DJ (2007) The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. *J Bacteriol* 189:7945–7947
47. Flötra L, Gjermo P, Rölla G, Waerhaug J (1971) Side effects of chlorhexidine mouth washes. *Scand J Dent Res* 79:119–125
48. Flötra L (1973) Different modes of chlorhexidine application and related local side effects. *J Periodontal Res* 8:41–44
49. Förstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33:829–837, 837a–837d
50. Gordon HP (1986) Surfactant-induced alterations of permeability of rabbit oral mucosa in vitro. *Exp Mol Pathol* 44:132–137
51. Grauber W, Waegelein M (1950) Die adstringierende Wirkung von Aluminiumlactat (Lacalut)-Lösung.
52. Grünberg C, Bauer F, Crispin A, Jakob M, Hickel R, Draenert ME (2017) Effectiveness of dentifrices with new formulations for the treatment of dentin hypersensitivity - A meta-analysis. *Am J Dent* 30:221–226
53. Guggenheim B, Giertsen E, Schüpbach P, Shapiro S (2001) Validation of an in vitro Biofilm Model of Supragingival Plaque. *J Dent Res* 80:363–370
54. Haas AN, Wagner TP, Muniz FWMG, Fiorini T, Cavagni J, Celeste RK (2016) Essential oils-containing mouthwashes for gingivitis and plaque: Meta-analyses and meta-regression. *J Dent* 55:7–15

55. Habibah TU, Amlani DV, Brizuela M (2023) Hydroxyapatite Dental Material. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513314/>
56. Hannig C, Hannig M, Attin T (2005) Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci* 113:2–13
57. Hannig C, Becker K, Häusler N, Hoth-Hannig W, Attin T, Hannig M (2007) Protective effect of the in situ pellicle on dentin erosion—an ex vivo pilot study. *Arch Oral Biol* 52:444–449
58. Hannig C, Hannig M (2009) The oral cavity—a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig* 13:123–139
59. Hannig C, Basche S, Burghardt T, Al-Ahmad A, Hannig M (2013) Influence of a mouthwash containing hydroxyapatite microclusters on bacterial adherence in situ. *Clin Oral Investig* 17:805–814
60. Hannig M (2021) Chlorhexidine retention in the oral cavity and the effects of chlorhexidine and octenidine mouth rinsing on the dental biofilm.
61. Hannig M, Joiner A (2006) The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci* 19:29–64
62. Hannig M, Hannig C (2010) Nanomaterials in preventive dentistry. *Nat Nanotechnol* 5:565–569
63. Haps S, Slot DE, Berchier CE, Van der Weijden GA (2008) The effect of cetylpyridinium chloride-containing mouth rinses as adjuncts to toothbrushing on plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. *Int J Dent Hyg* 6:290–303
64. Haydari M, Bardakci AG, Koldslund OC, Aass AM, Sandvik L, Preus HR (2017) Comparing the effect of 0.06% -, 0.12% and 0.2% Chlorhexidine on plaque, bleeding and side effects in an experimental gingivitis model: a parallel group, double masked randomized clinical trial. *BMC Oral Health* 17:118
65. Higuchi Y, Kurihara H, Nishimura F, Miyamoto M, Arai H, Nakagawa M, Murayama Y, Suido H, Tanii S (1996) Clinical evaluation of a dental rinse containing aluminum lactate for treatment of dentinal hypersensitivity. *J Clin Dent* 7:9–12
66. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N (2009) Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res* 88:982–990
67. Huang R, Li M, Gregory RL (2011) Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence* 2:435–444
68. Huang SB, Gao SS, Yu HY (2009) Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion in vitro. *Biomed Mater* 4:034104

69. Jardim JJ, Alves LS, Maltz M (2009) The history and global market of oral home-care products. *Braz Oral Res* 23:17–22
70. Jentsch H, Pomowski R, Kundt G, Göcke R (2003) Treatment of gingivitis with hyaluronan. *J Clin Periodontol* 30:159–164
71. Jeong SH, Jang SO, Kim KN, Kwon HK, Park YD, Kim BI (2006) Remineralization Potential of New Toothpaste Containing Nano-Hydroxyapatite. *Key Eng Mater* 309–311:537–540
72. Joiner A (2010) Whitening toothpastes: A review of the literature. *J Dent* 38:e17–e24
73. Kalyana P, Shashidhar A, Meghashyam B, SreeVidya K, Sweta S (2011) Stain removal efficacy of a novel dentifrice containing papain and Bromelain extracts – an in vitro study. *Int J Dent Hyg* 9:229–233
74. Kapil V, Khambata RS, Jones DA, Rathod K, Primus C, Massimo G, Fukuto JM, Ahluwalia A (2020) The Noncanonical Pathway for In Vivo Nitric Oxide Generation: The Nitrate-Nitrite-Nitric Oxide Pathway. *Pharmacol Rev* 72:692–766
75. Keil E (1969) Therapeutische Beeinflussung akuter und chronischer Gingivitiden mit „Lacalut spezial“. *DZZ*
76. Kilian M, Chapple ILC, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AML, Tonetti MS, Wade WG, Zaura E (2016) The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J* 221:657–666
77. Klug B, Santigli E, Westendorf C, Tangl S, Wimmer G, Grube M (2016) From Mouth to Model: Combining in vivo and in vitro Oral Biofilm Growth. *Front Microbiol* 7:
78. Kneist, S., Callaway, A. (2013) Die Rolle der Bakterien in der ökologischen Plaquehypothese | Fachgebiete | ZMK-aktuell.de. URL: [http://www.zmk-aktuell.de/fachgebiete/allgemeine-zahnheilkunde/story/von-generalisten-und-spezialisten-die-rolle-der-bakterien-in-der-erweiterten-oekologischen-plaquehypothese\\_\\_918.html](http://www.zmk-aktuell.de/fachgebiete/allgemeine-zahnheilkunde/story/von-generalisten-und-spezialisten-die-rolle-der-bakterien-in-der-erweiterten-oekologischen-plaquehypothese__918.html)
79. Langa GPJ, Muniz FWMG, Costa RDSA, da Silveira TM, Rösing CK (2021) The effect of cetylpyridinium chloride mouthrinse as adjunct to toothbrushing compared to placebo on interproximal plaque and gingival inflammation-a systematic review with meta-analyses. *Clin Oral Investig* 25:745–757
80. Ledder RG, Madhwani T, Sreenivasan PK, De Vizio W, McBain AJ (2009) An in vitro evaluation of hydrolytic enzymes as dental plaque control agents. *J Med Microbiol* 58:482–491
81. Lim C-Y, In J (2021) Considerations for crossover design in clinical study. *Korean J Anesthesiol* 74:293–299
82. Limbach N (2019) In situ Untersuchungen zur initialen Biofilmbildung auf Dentin unter dem

Einfluss von Hydroxylapatit-haltiger Zahnpasta. Saarländische Universitäts- und LandesbibliothekURL: <https://publikationen.sulb.uni-saarland.de/handle/20.500.11880/29609>

83. Limeback H, Enax J, Meyer F (2021) Biomimetic hydroxyapatite and caries prevention: a systematic review and meta-analysis. *Can J Dent Hyg CJDH J Can Hyg Dent JCHD* 55:148–159
84. Lippert F (2013) An Introduction to Toothpaste - Its Purpose, History and Ingredients. S. Karger AGURL: <https://www.karger.com/Article/FullText/350456>
85. Løe H, Rindom Schiøtt C (1970) The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res* 5:79–83
86. Lopes MC, Mascarini RC, da Silva BMCG, Flório FM, Basting RT (2007) Effect of a Papain-based Gel for Chemomechanical Caries Removal on Dentin Shear Bond Strength. *J Dent Child* 74:93–97
87. M E (1998) Materialkennwert der Zahnartsubstanz des Rinders im Vergleich zur humanen Zahnartsubstanz. *Dtsch Zahnarztztl Z* 53:713–717
88. Mankodi S, Bauroth K, Witt JJ, Bsoul S, He T, Gibb R, Dunavent J, Hamilton A (2005) A 6-month clinical trial to study the effects of a cetylpyridinium chloride mouthrinse on gingivitis and plaque. *Am J Dent* 18 Spec No:9A-14A
89. Mansfield LE, Ting S, Haverly RW, Yoo TJ (1985) The incidence and clinical implications of hypersensitivity to papain in an allergic population, confirmed by blinded oral challenge. *Ann Allergy* 55:541–543
90. Marsh PD (2004) Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Res* 38:204–211
91. Marsh PD (2010) Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *J Dent* 38 Suppl 1:S11-15
92. Martínez-Hernández M, Reda B, Hannig M (2020) Chlorhexidine rinsing inhibits biofilm formation and causes biofilm disruption on dental enamel in situ. *Clin Oral Investig* 24:3843–3853
93. Mathur S, Mathur T, Srivastava R, Khatri R (2011) Chlorhexidine: The Gold Standard in Chemical Plaque Control. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol* 1:
94. Miglani S, Aggarwal V, Ahuja B (2010) Dentin hypersensitivity: Recent trends in management. *J Conserv Dent JCD* 13:218–224
95. Mitsui T, Harasawa R (2017) The effects of essential oil, povidone-iodine, and chlorhexidine mouthwash on salivary nitrate/nitrite and nitrate-reducing bacteria. *J Oral Sci* 59:597–601
96. Moeintaghavi A, Arab H, Khajekaramodini M, Hosseini R, Danesteh H, Niknami H (2012) In vitro Antimicrobial Comparison of Chlorhexidine, Persica Mouthwash and Miswak Extract. *J Contemp Dent Pract* 13:147–152

97. Morou-Bermúdez E, Torres-Colón JE, Bermúdez NS, Patel RP, Joshipura KJ (2022) Pathways Linking Oral Bacteria, Nitric Oxide Metabolism, and Health. *J Dent Res* 101:623–631
98. Moura MF, Navarro TP, Silva TA, Cota LOM, Soares Dutra Oliveira AM, Costa FO (2017) Periodontitis and Endothelial Dysfunction: Periodontal Clinical Parameters and Levels of Salivary Markers Interleukin-1 $\beta$ , Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Matrix Metalloproteinase-2, Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 Complex, and Nitric Oxide. *J Periodontol* 88:778–787
99. Newbury\* DE, Ritchie NWM (2013) Is Scanning Electron Microscopy/Energy Dispersive X-ray Spectrometry (SEM/EDS) Quantitative? *Scanning* 35:141–168
100. Niessen LC, Weyant RJ (1989) Causes of tooth loss in a veteran population. *J Public Health Dent* 49:19–23
101. Nobre G, Mirela C (2021) Hydroxyapatite based mouthrinses against oral biofilm formation in situ. Saarländische Universitäts- und Landesbibliothek URL: <https://publikationen.sulb.uni-saarland.de/handle/20.500.11880/31891>
102. Nyvad B, Kilian M (1987) Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Eur J Oral Sci* 95:369–380
103. Oesterle LJ, Shellhart WC, Belanger GK (1998) The use of bovine enamel in bonding studies. *Am J Orthod Dentofac Orthop Off Publ Am Assoc Orthod Its Const Soc Am Board Orthod* 114:514–519
104. Orchardson R, Gillam DG (2000) The efficacy of potassium salts as agents for treating dentin hypersensitivity. *J Orofac Pain* 14:9–19
105. Ordesi P, Pisoni L, Nannei P, Macchi M, Borloni R, Siervo S (2014) Therapeutic efficacy of bromelain in impacted third molar surgery: a randomized controlled clinical study. *Quintessence Int Berl Ger* 1985 45:679–684
106. Paster B, Olsen I, Aas J, Dewhirst F (2006) Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE.. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol* 42: 80-87. *Periodontol* 2000 42:80–7
107. Pearce EIF, Dibdin GH (1995) The Diffusion and Enzymic Hydrolysis of Monofluorophosphate in Dental Plaque. *J Dent Res* 74:691–697
108. Pepla E, Besharat LK, Palaia G, Tenore G, Migliaiu G (2014) Nano-hydroxyapatite and its applications in preventive, restorative and regenerative dentistry: a review of literature. *Ann Stomatol (Roma)* 5:108–114
109. Piva E, Ogliari FA, Moraes RR de, Corá F, Henn S, Correr-Sobrinho L (2008) Papain-based gel for biochemical caries removal: influence on microtensile bond strength to dentin. *Braz Oral Res*

22:364–370

110. Pollard AJ, Khan I, Davies M, Claydon N, West NX (2023) Comparative efficacy of self-administered dentifrices for the management of dentine hypersensitivity – A systematic review and network meta-analysis. *J Dent* 130:104433
111. Qin X, Zi H, Zeng X (2022) Changes in the global burden of untreated dental caries from 1990 to 2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease study. *Heliyon* 8:e10714
112. Quintas V, Prada-López I, Prados-Frutos JC, Tomás I (2015) In situ antimicrobial activity on oral biofilm: essential oils vs. 0.2 % chlorhexidine. *Clin Oral Investig* 19:97–107
113. Radhakrishnan J, Sharma A, Moses J (2010) Comparative evaluation of the efficacy of different concentrations of chlorhexidine mouth rinses in reducing the mutans streptococci in saliva: An in vivo study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 28:162–6
114. Rahmi H, Widayanti A, Hanif A (2019) Utilization of Bromelain Enzyme from Pineapple Peel Waste on Mouthwash Formula Against *Streptococcus mutans*. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 217:012036
115. Rajan P, Baramappa R, Rao NM, Pavaluri AK, P I, Rahaman SMU (2014) Hyaluronic Acid as an Adjunct to Scaling and Root Planing in Chronic Periodontitis. A Randomized Clinical Trail. *J Clin Diagn Res JCDR* 8:ZC11–ZC14
116. Rathe F, Auschill TM, Sculean A, Gaudszuhn C, Arweiler NB (2007) The plaque and gingivitis reducing effect of a chlorhexidine and aluminium lactate containing dentifrice (Lacalut aktiv) over a period of 6 months. *J Clin Periodontol* 34:646–651
117. Robinson C, Kirkham J, Percival R, Shore RC, Bonass WA, Brookes SJ, Kusa L, Nakagaki H, Kato K, Nattress B (2009) A Method for the Quantitative Site-Specific Study of the Biochemistry within Dental Plaque Biofilms Formed in vivo. *Caries Res* 31:194–200
118. Rupf S, Balkenhol M, Sahrhage TO, Baum A, Chromik JN, Ruppert K, Wissenbach DK, Maurer HH, Hannig M (2012) Biofilm inhibition by an experimental dental resin composite containing octenidine dihydrochloride. *Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater* 28:974–984
119. Saleem HGM, Seers CA, Sabri AN, Reynolds EC (2016) Dental plaque bacteria with reduced susceptibility to chlorhexidine are multidrug resistant. *BMC Microbiol* 16:214
120. Saunders KA, Greenman J (2000) The formation of mixed culture biofilms of oral species along a gradient of shear stress. *J Appl Microbiol* 89:564–572
121. Schestakow A, Hannig M (2020) Effects of Experimental Agents Containing Tannic Acid or Chitosan on the Bacterial Biofilm Formation in Situ. *Biomolecules* 10:1315
122. Schestakow A, Pütz N, Guth MS, Eisenmenger TA, Dudek J, Hannig M (2022) Influence of a

hydroxyapatite suspension on 48-h dental biofilm formation in-situ. *Arch Oral Biol* 136:105388

123. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675

124. Sissons CH (1997) Artificial Dental Plaque Biofilm Model Systems. *Adv Dent Res* 11:110–126

125. Slot DE, Berchier CE, Addy M, Van der Velden U, Van der Weijden GA (2014) The efficacy of chlorhexidine dentifrice or gel on plaque, clinical parameters of gingival inflammation and tooth discoloration: a systematic review. *Int J Dent Hyg* 12:25–35

126. Stoeken JE, Paraskevas S, van der Weijden GA (2007) The Long-Term Effect of a Mouthrinse Containing Essential Oils on Dental Plaque and Gingivitis: A Systematic Review. *J Periodontol* 78:1218–1228

127. Stookey GK, Beiswanger B, Mau M, Isaacs RL, Witt JJ, Gibb R (2005) A 6-month clinical study assessing the safety and efficacy of two cetylpyridinium chloride mouthrinses. *Am J Dent* 18 Spec No:24A-28A

128. Tawakoli PN, Al-Ahmad A, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C (2013) Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clin Oral Investig* 17:841–850

129. Urgatz L (2018) Wirkung von Chlorhexidin und Aluminium-Ionen auf die initiale Biofilmbildung in situ.

130. Van Leeuwen M p. c., Slot D e., Van der Weijden G a. (2011) Essential Oils Compared to Chlorhexidine With Respect to Plaque and Parameters of Gingival Inflammation: A Systematic Review. *J Periodontol* 82:174–194

131. Varoni E, Tarce M, Lodi G, Carrassi A (2012) Chlorhexidine (CHX) in dentistry: State of the art. *Minerva Stomatol* 61:399–419

132. Versteeg PA, Rosema N a. M, Hoenderdos NL, Slot DE, Van der Weijden GA (2010) The plaque inhibitory effect of a CPC mouthrinse in a 3-day plaque accumulation model - a cross-over study. *Int J Dent Hyg* 8:269–275

133. Vyas T, Bhatt G, Gaur A, Sharma C, Sharma A, Nagi R (2021) Chemical plaque control - A brief review. *J Fam Med Prim Care* 10:1562–1568

134. Walsh T, Worthington HV, Glenny A-M, Marinho VC, Jeroncic A (2019) Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries. *Cochrane Database Syst Rev* 3:CD007868

135. Webber MA, Whitehead RN, Mount M, Loman NJ, Pallen MJ, Piddock LJV (2015) Parallel evolutionary pathways to antibiotic resistance selected by biocide exposure. *J Antimicrob Chemother* 70:2241–2248

136. Wegehaupt F, Menghini G (2020) [Fluoride Update]. *Swiss Dent J* 130:677–683
137. Wegehaupt FJ, Widmer R, Attin T (2010) Is bovine dentine an appropriate substitute in abrasion studies? *Clin Oral Investig* 14:201–205
138. Wierichs RJ, Wolf TG, Campus G, Carvalho TS (2022) Efficacy of nano-hydroxyapatite on caries prevention—a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig* 26:3373–3381
139. Witt J, Ramji N, Gibb R, Dunavent J, Flood J, Barnes J (2005) Antibacterial and Antiplaque Effects of a Novel, Alcohol-Free Oral Rinse with Cetylpyridinium Chloride. *J Contemp Dent Pract* 6:1–9
140. Wojcik K, Dobrucki JW (2008) Interaction of a DNA intercalator DRAQ5, and a minor groove binder SYTO17, with chromatin in live cells--influence on chromatin organization and histone-DNA interactions. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 73:555–562
141. Wolf A (2021) Reizthema Fluoride - wie erklär' ich's meinen Patienten? *Junge Zahnmed* 12:10–13
142. Wolff D, Kensche, A A, Rupf S, Hannig M, Hannig, C. (2014) Der orale Biofilm – neue Perspektiven zu einem alten Thema? *Dtsch Zahnärztliche Z*
143. Yassen GH, Platt JA, Hara AT (2011) Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J Oral Sci* 53:273–282
144. Zhang X, Bishop PL, Kupferle MJ (1998) Measurement of polysaccharides and proteins in bio-film extracellular polymers. *Water Sci Technol* 37:345–348

## 7 Publikation/ Danksagung

### 7.1 Publikation

Ein Teil der Ergebnisse wurde bereits 2024 auf dem 71. ORCA Congress vorgestellt (Abstract 84, Effect of rinsing with toothpaste suspensions on biofilm formation in situ).

### 7.2 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Stefan Rupf, bedanken. Ich danke ihm für das Überlassen des Themas und die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft, die regelmäßigen Besprechungen und die zeitintensive Unterstützung. Herrn Prof. Dr. Matthias Hannig danke ich für die Möglichkeit, die Studie im Forschungslabor der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde durchzuführen.

Frau Dr. rer. nat. Johanna Dudek danke ich recht herzlich für die Unterstützung bei den Laborarbeiten. Danke auch an Jessica Schmitt-Bennewart, die mich in die Methodik der Prüfkörperherstellung und der Analyseverfahren eingewiesen hat und immer für Fragen zur Verfügung stand. Für die geduldige Unterstützung bei der REM-Auswertung danke ich Herrn Norbert Pütz ganz besonders.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei der Firma Dr. Theiss Naturwaren für die Bereitstellung der verschiedenen Zahnpasten.

Mein besonderer Dank gilt meinen lieben Testpersonen, nicht nur für ihren Einsatz, sondern auch für den Verzicht aufs Zähneputzen und Kaffeetrinken.

Zu guter Letzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern und meinem Freund Simon Eppers für ihre allzeit unermüdliche Unterstützung und Motivation bedanken. Meiner Familie, die mir in allen Lebenslagen bedingungslos zur Seite steht, bin ich unendlich dankbar.

## Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

STD-P	Standard-Paste
B-P	Basis-Paste
CHX	Chlorhexidin
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
ENZ-P	Enzym-Paste
HAP-P	Hydroxylapatit-Paste
PI	Propidiumiodid
SLS	Sodium Lauryl Sulfat
S-P	Sensitiv-Paste
PEG	Polyethylenglykol
EO	Ätherische Öle
CPC	Cetylpridiniumchlorid

## 8 Lebenslauf

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

## 9 Anhang

### 9.1 Ergebnisse Datensatz

#### 9.1.1 Bedeckung

	Wasser	B-P	STD-P	S-P	HAP-P	ENZ-P	CHX
Person 1	74,49 %	82,78 %	70,85 %	41,31 %	19,54 %	28,88 %	33,13 %
Person 2	68,47 %	55,53 %	16,80 %	48,22 %	89,97 %	27,68 %	1,44 %
Person 3	91,92 %	38,34 %	11,53 %	32,78 %	2,29 %	30,25 %	0,20 %
Person 4	24,65 %	12,88 %	23,44 %	42,17 %	43,44 %	54,32 %	3,43 %
Person 5	81,27 %	19,29 %	13,86 %	5,45 %	1,34 %	6,57 %	8,95 %
Person 6	90,22 %	73,32 %	49,62 %	3,86 %	85,66 %	29,54 %	10,17 %

**Bedeckung angegeben für jede Testperson und jede Prüfs substanz nach Analyse mit Image J. Bei den Werten handelt es sich um die Mittelwerte einer Person pro Spüllösung.**

	Wasser	B-P	STD-P	S-P	HAP-P	ENZ-P	CHX
Person 1	5,25	5,50	5,08	3,42	2,42	3,29	4,17
Person 2	4,45	4,83	3,50	4,17	5,25	2,17	2,50
Person 3	5,92	4,00	3,21	2,86	1,50	2,92	2,00
Person 4	4,86	3,65	4,07	3,83	3,83	3,83	2,00
Person 5	5,50	3,48	2,25	1,42	1,17	1,69	3,00
Person 6	5,67	4,83	4,70	1,33	5,00	3,33	3,67

**Bedeckung: Analyse der Bedeckung mit dem oben genannten. Scoring. Bei den Werten handelt es sich um die Mittelwerte einer Person pro Spüllösung.**

## 9.1.2 Vitalität

	Wasser	B-P	STD-P	S-P	HAP-P	ENZ-P	CHX
Person 1	54,52 %	45,10 %	29,54 %	36,19 %	40,55 %	9,01 %	22,39 %
Person 2	54,55 %	31,24 %	25,94 %	31,49 %	25,66 %	8,01 %	68,82 %
Person 3	45,82 %	44,41 %	17,03 %	36,67 %	51,97 %	14,11 %	34,66 %
Person 4	86,60 %	73,30 %	30,69 %	40,56 %	13,46 %	8,20 %	38,53 %
Person 5	38,35 %	38,35 %	43,32 %	51,12 %	25,73 %	8,66 %	35,28 %
Person 6	28,96 %	49,57 %	36,55 %	39,21 %	11,73 %	5,85 %	32,20 %

**Vitalität angegeben für jede Testperson und jede Prüfsubstanz nach Analyse mit Image J. Bei den Werten handelt es sich um die Mittelwerte einer Person pro Spüllösung.**

	Wasser	B-P	STD-P	S-P	HAP-P	ENZ-P	CHX
Person 1	3,50	2,58	2,75	3,05	2,67	1,42	2,58
Person 2	3,30	3,92	2,43	2,50	2,25	2,17	2,92
Person 3	3,50	3,00	2,71	2,48	3,08	1,83	1,00
Person 4	3,93	3,48	2,71	2,50	2,75	1,33	1,67
Person 5	3,64	2,72	2,67	2,99	2,67	2,17	1,92
Person 6	3,67	3,25	3,26	2,50	1,33	2,42	1,92

**Vitalität: Analyse mit dem oben genannten Scoring. Bei den Werten handelt es sich um die Mittelwerte einer Person pro Spüllösung**