

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik
(Klinikdirektor Prof. Dr. med. dent. R. Bürgers)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

In-vitro-Untersuchung der antimikrobiellen und
zytotoxischen Eigenschaften eines kupferhaltigen
Zinkoxidphosphatzementes

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Torsten Andreas Wassmann

aus

Salzgitter

Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

1. Referent: Prof. Dr. med. dent. R. Bürgers

2. Ko-Referent: Prof. Dr. med. dent. A. Wiegand

3. Drittreferent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake

Datum der mündlichen Prüfung: 15.11.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „In-vitro-Untersuchung der antimikrobiellen und zytotoxischen Eigenschaften eines kupferhaltigen Zinkoxid-phosphatzementes“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	VII
Formelverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht	2
2.1 Bakterielle Adhäsion und assoziierte Krankheitsbilder.....	2
2.1.1 Speichel	2
2.1.2 Bildung und Funktion des Pellikel	3
2.1.3 Bakterielle Adhäsion und Biofilme	5
2.1.4 Karies	11
2.1.5 Parodontitis	13
2.1.6 Periimplantitis.....	14
2.2 Werkstoffkundliche Grundlagen	15
2.2.7 Dentale Zemente.....	15
2.2.8 Antimikrobielle Bestandteile	17
2.2.9 Zytotoxizität dentaler Werkstoffe.....	23
2.2.10 Physiko-chemische Einflüsse auf bakterielle Adhäsion	25
2.2.11 Freie Oberflächenenergie (SFE, <i>surface free energy</i>).....	25
2.2.12 Rauheit	27
2.3 Biochemische Grundlagen der angewandten Testverfahren	29
2.3.1 Tetrazolium / WST-Assays	30
2.3.2 Resazurin-Assays	31
2.3.3 ATP-Biolumineszenz-Assays	32
3. Fragestellung.....	33
4. Material und Methode	34
4.1 Versuchsüberblick.....	34
4.2 Probekörper	34
4.3 Messung der Rauheit	37
4.4 Freie Oberflächenenergie.....	37

4.5	Vorbereitung der Testkeime	38
4.5.1	Wochenkultur	38
4.5.2	Versuchskultur	39
4.6	Zellkulturen	40
4.6.1	Kultur der Mausfibroblasten (L929).....	40
4.6.2	Kultur der Gingivafibroblasten (GF1)	41
4.6.3	Vorbereitung der Fibroblasten (GF1 und L929)	43
4.7	Herstellung des Kunstspeichels	43
4.8	Lumineszenzmessung (<i>Candida albicans</i>)	43
4.8.1	Vorbereitung der Probekörper und Inkubation.....	43
4.8.2	Durchführung der Messung	44
4.9	Fluoreszenzmessung (<i>Streptococcus sanguinis</i>).....	45
4.9.1	Vorbereitung der Probekörper	45
4.9.2	Messung der Eigenfluoreszenz und Inkubation.....	45
4.9.3	Durchführung der Messung	46
4.10	Zellviabilität mittels WST an Mausfibroblasten (L929)	47
4.10.1	Vorbereitung der Probekörper und der Wellplatte	47
4.10.2	Vorbereitung des konditionierten Mediums und Zellaussaat	47
4.10.3	Durchführung der Messungen	48
4.11	Zellviabilität mittels WST an Gingivafibroblasten (GF1)	49
4.11.1	Vorbereitung der Probekörper	49
4.11.2	Durchführung der Messungen	49
4.12	Lichtmikroskopie	50
4.13	Elektronenspektroskopie (ESCA / XPS)	50
4.14	Rasterelektronenmikroskopie	51
4.15	Statistische Auswertung	51
5.	Ergebnisse.....	53
5.1	Präambel zu den Ergebnissen	53
5.2	Rauheit.....	54
5.3	Freie Oberflächenenergie.....	55
5.4	Lumineszenzmessung <i>Candida albicans</i>	57
5.5	Fluoreszenzmessung <i>Streptococcus sanguinis</i>	58
5.6	Zellviabilität Mausfibroblasten (L929)	60
5.7	Zellviabilität Gingivafibroblasten (GF1).....	68
5.8	Lichtmikroskopie Mausfibroblasten (L929)	73

5.9	Lichtmikroskopie Gingivafibroblasten (GF1)	76
5.10	Elektronenspektroskopie (ESCA / XPS)	79
5.11	Rasterelektronenmikroskopie	80
5.12	Zusammenfassung der Ergebnisse	83
6.	Diskussion	85
6.1	Diskussion der Methodik	85
6.1.1	Konzept	85
6.1.2	Probekörper	86
6.1.3	Physiko-chemische Analysen	86
6.1.4	Mikrobiologische Versuche	88
6.1.5	Zytologische Versuche	89
6.1.6	Bildgebung	90
6.2	Diskussion der Ergebnisse	91
6.2.1	Rauheit	91
6.2.2	Freie Oberflächenenergie	92
6.2.3	Adhäsion <i>Candida albicans</i>	92
6.2.4	Adhäsion <i>Streptococcus sanguinis</i>	93
6.2.5	Zellviabilität Mausfibroblasten (L929)	93
6.2.6	Zellviabilität humane Fibroblasten (GF1)	94
6.2.7	Lichtmikroskopie	95
6.2.8	Elektronenspektrographie (ESCA / XPS)	95
6.2.9	Rasterelektronenmikroskopie	96
6.3	Schlussfolgerung	96
7.	Zusammenfassung	98
8.	Anhang	100
9.	Literaturverzeichnis	104
	Danksagung	147
	Lebenslauf	148

Abbildungsverzeichnis

Anmerkung: Die Rechte an den verwendeten Abbildungen liegen entweder beim Verfasser dieser Arbeit, unterliegen einer Creative Commons - Lizenz oder erfolgen nach freundlicher Genehmigung des jeweiligen Rechteinhabers. Die jeweiligen Quellen der Abbildungen sind dem Literaturverzeichnis zu entnehmen.

Abbildung 1:	Schematische Zeichnung der Pellikelbildung	4
Abbildung 2:	Fünf Phasen der Biofilmmreifung	7
Abbildung 3:	Modell für die Wechselwirkungen der Adhäsion im Biofilm	10
Abbildung 4:	Reifer Biofilm mit komplexer Struktur	11
Abbildung 5:	Mit Zement gefüllter Randspalt einer Keramikkrone.....	15
Abbildung 6:	Übersicht über die verschiedenen Arten von Zementen.....	16
Abbildung 7:	<i>contact killing</i> , schematischer Ablauf.....	18
Abbildung 8:	Kontaktwinkel eines liegenden Tropfens	25
Abbildung 9:	Theoretische Berechnung der Adhäsion	27
Abbildung 10:	Gestaltabweichungen 1-4 nach DIN 4760:1982	28
Abbildung 11:	Arithmetisches Mittel der Rauheit.....	29
Abbildung 12:	WST-1 und WST-8	30
Abbildung 13:	Schematische Darstellung der Umwandlung von WST-8.....	31
Abbildung 14:	Struktur und Reduktion von Resazurin und Resrufin.....	31
Abbildung 15:	Reaktionsschema des ATP-Assays	32
Abbildung 16:	Testzemente: Kupferfrei (links) und kupferhaltig (rechts)	36
Abbildung 17:	Form aus Dubliersilikon mit ausgehärteten Probekörpern.....	36
Abbildung 18:	Ausgearbeitete Probekörper (Durchmesser 10 mm)	36
Abbildung 19:	Lichtmikroskopie L929-Mausfibroblasten	41
Abbildung 20:	Lichtmikroskopie GF1-Gingivafibroblasten	42
Abbildung 21:	In die 96er-Well-Platte überführte Messlösung	49
Abbildung 22:	Flussdiagramm der statistischen Auswertemethodik.....	52
Abbildung 23:	Aufbau der Whisker-Box-Plots	53
Abbildung 24:	Arithmetisches Mittel Rauheit, alle Gruppen	54
Abbildung 25:	Arithmetisches Mittel Rauheit, kupferfrei vs. kupferhaltig	55
Abbildung 26:	Freie Oberflächenenergie (SFE), Probekörpergruppen.....	56
Abbildung 27:	Freie Oberflächenenergie (SFE), kupferfrei vs. kupferhaltig	56
Abbildung 28:	Lumineszenzmessung, <i>Candida albicans</i> , Probekörpergruppen	57

Abbildung 29:	Lumineszenzmessung, <i>Candida albicans</i> , kupferfrei/kupferhaltig...	58
Abbildung 30:	Fluoreszenzmessung, <i>S. sanguinis</i> , Probekörpergruppen	59
Abbildung 31:	Fluoreszenzmessung, <i>S. sanguinis</i> , kupferfrei/kupferhaltig	59
Abbildung 32:	WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 12 h, Probekörpergruppen	60
Abbildung 33:	WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 12 h, kupferfrei/kupferhaltig	61
Abbildung 34:	WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 24 h, Probekörpergruppen	62
Abbildung 35:	WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 24 h, kupferfrei/kupferhaltig	63
Abbildung 36:	WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 6 h, Probekörpergruppen	64
Abbildung 37:	WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 6 h, kupferfrei/kupferhaltig	64
Abbildung 38:	WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 24 h, Probekörpergruppen	65
Abbildung 39:	WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 24 h, kupferfrei/kupferhaltig	66
Abbildung 40:	WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 48 h, Probekörpergruppen	67
Abbildung 41:	WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 48 h, kupferfrei/kupferhaltig	67
Abbildung 42:	WST-Test, GF1-Gingivafibroblasten, 6 h, Probekörpergruppen.....	68
Abbildung 43:	WST-Test, GF1-Gingivafibroblasten, 6 h, kupferfrei/kupferhaltig	69
Abbildung 44:	WST-Test, GF1-Gingivafibroblasten, 24 h, Probekörpergruppen....	70
Abbildung 45:	WST-Test, GF1-Gingivafibroblasten, 24 h, kupferfrei/kupferhaltig ..	70
Abbildung 46:	WST-Test, GF1-Gingivafibroblasten, 48 h, Probekörpergruppen....	72
Abbildung 47:	WST-Test, GF1-Gingivafibroblasten, 48 h, kupferhaltig/kupferfrei ..	72
Abbildung 48:	L929-Mausfibroblasten, Kontrollgruppe, 24 h.....	73
Abbildung 49:	L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe I,	73
Abbildung 50:	L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe II, 24 h	74
Abbildung 51:	L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe III B.....	74
Abbildung 52:	L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe IV B, 24 h	74
Abbildung 53:	L929-Mausfibroblasten, Kontrollgruppe, 48 h.....	75
Abbildung 54:	L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe III, 48 h	75
Abbildung 55:	L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe IV, 48 h.....	76
Abbildung 56:	L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe II B, 48 h.....	76
Abbildung 57:	GF1-Gingivafibroblasten, Kontrollgruppe, 24 h	77
Abbildung 58:	GF1-Gingivafibroblasten, Probekörpergruppe II, 24 h.....	77
Abbildung 59:	GF1-Gingivafibroblasten, Probekörpergruppe III, 24 h.....	77
Abbildung 60:	GF1-Gingivafibroblasten, Kontrollgruppe, 48 h	78
Abbildung 61:	GF1-Gingivafibroblasten, Probekörpergruppe I, 48 h.....	78
Abbildung 62:	GF1-Gingivafibroblasten, Probekörpergruppe IV, 48 h	78

Abbildung 63:	REM, 2000x Vergrößerung, <i>Candida albicans</i>	80
Abbildung 64:	REM, 2380x Vergrößerung, <i>Candida albicans</i>	81
Abbildung 65:	REM, 2000x Vergrößerung, <i>Streptococcus sanguinis</i>	81
Abbildung 66:	REM, 5200x Vergrößerung, <i>Streptococcus sanguinis</i>	82
Abbildung 67:	REM, 600x Vergrößerung, L929-Mausfibroblasten	82
Abbildung 68:	REM, 4650x Vergrößerung, L929-Mausfibroblasten	83

Tabellenverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Zeichnung der Pellikelbildung	4
Abbildung 2:	Fünf Phasen der Biofilmmreifung	7
Abbildung 3:	Modell für die Wechselwirkungen der Adhäsion im Biofilm	10
Abbildung 4:	Reifer Biofilm mit komplexer Struktur	11
Abbildung 5:	Mit Zement gefüllter Randspalt einer Keramikkrone.....	15
Abbildung 6:	Übersicht über die verschiedenen Arten von Zementen.....	16
Abbildung 7:	<i>contact killing</i> , schematischer Ablauf.....	18
Abbildung 8:	Kontaktwinkel eines liegenden Tropfens	25
Abbildung 9:	Theoretische Berechnung der Adhäsion	27
Abbildung 10:	Gestaltabweichungen 1-4 nach DIN 4760:1982	28
Abbildung 11:	Arithmetisches Mittel der Rauheit.....	29
Abbildung 12:	WST-1 und WST-8.....	30
Abbildung 13:	Schematische Darstellung der Umwandlung von WST-8.....	31
Abbildung 14:	Struktur und Reduktion von Resazurin und Resruhin.....	31
Abbildung 15:	Reaktionsschema des ATP-Assays	32
Abbildung 16:	Testzemente: Kupferfrei (links) und kupferhaltig (rechts)	36
Abbildung 17:	Form aus Dubliersilikon mit ausgehärteten Probekörpern.....	36
Abbildung 18:	Ausgearbeitete Probekörper (Durchmesser 10 mm)	36
Abbildung 19:	Lichtmikroskopie L929-Mausfibroblasten	41
Abbildung 20:	Lichtmikroskopie GF1-Gingivafibroblasten.....	42
Abbildung 21:	In die 96er-Well-Platte überführte Messlösung	49
Abbildung 22:	Flussdiagramm der statistischen Auswertemethodik.....	52
Abbildung 23:	Aufbau der Whisker-Box-Plots	53
Abbildung 24:	Arithmetisches Mittel Rauheit, alle Gruppen	54
Abbildung 25:	Arithmetisches Mittel Rauheit, kupferfrei vs. kupferhaltig	55
Abbildung 26:	Freie Oberflächenenergie (SFE), Probekörpergruppen.....	56
Abbildung 27:	Freie Oberflächenenergie (SFE), kupferfrei vs. kupferhaltig	56
Abbildung 28:	Lumineszenzmessung, <i>Candida albicans</i> , Probekörpergruppen	57
Abbildung 29:	Lumineszenzmessung, <i>Candida albicans</i> , kupferfrei/kupferhaltig...	58
Abbildung 30:	Fluoreszenzmessung, <i>S. sanguinis</i> , Probekörpergruppen	59
Abbildung 31:	Fluoreszenzmessung, <i>S. sanguinis</i> , kupferfrei/kupferhaltig	59
Abbildung 32:	WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 12 h, Probekörpergruppen	60

Abbildung 33:	WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 12 h, kupferfrei/kupferhaltig	61
Abbildung 34:	WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 24 h, Probekörpergruppen	62
Abbildung 35:	WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 24 h, kupferfrei/kupferhaltig	63
Abbildung 36:	WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 6 h, Probekörpergruppen	64
Abbildung 37:	WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 6 h, kupferfrei/kupferhaltig	64
Abbildung 38:	WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 24 h, Probekörpergruppen	65
Abbildung 39:	WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 24 h, kupferfrei/kupferhaltig	66
Abbildung 40:	WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 48 h, Probekörpergruppen	67
Abbildung 41:	WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 48 h, kupferfrei/kupferhaltig	67
Abbildung 42:	WST-Test, GF1-Gingivafibroblasten, 6 h, Probekörpergruppen.....	68
Abbildung 43:	WST-Test, GF1-Gingivafibroblasten, 6 h, kupferfrei/kupferhaltig	69
Abbildung 44:	WST-Test, GF1-Gingivafibroblasten, 24 h, Probekörpergruppen....	70
Abbildung 45:	WST-Test, GF1-Gingivafibroblasten, 24 h, kupferfrei/kupferhaltig ..	70
Abbildung 46:	WST-Test, GF1-Gingivafibroblasten, 48 h, Probekörpergruppen....	72
Abbildung 47:	WST-Test, GF1-Gingivafibroblasten, 48 h, kupferhaltig/kupferfrei ..	72
Abbildung 48:	L929-Mausfibroblasten, Kontrollgruppe, 24 h.....	73
Abbildung 49:	L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe I,	73
Abbildung 50:	L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe II, 24 h	74
Abbildung 51:	L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe III B.....	74
Abbildung 52:	L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe IV B, 24 h	74
Abbildung 53:	L929-Mausfibroblasten, Kontrollgruppe, 48 h.....	75
Abbildung 54:	L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe III, 48 h	75
Abbildung 55:	L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe IV, 48 h.....	76
Abbildung 56:	L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe II B, 48 h.....	76
Abbildung 57:	GF1-Gingivafibroblasten, Kontrollgruppe, 24 h	77
Abbildung 58:	GF1-Gingivafibroblasten, Probekörpergruppe II, 24 h.....	77
Abbildung 59:	GF1-Gingivafibroblasten, Probekörpergruppe III, 24 h.....	77
Abbildung 60:	GF1-Gingivafibroblasten, Kontrollgruppe, 48 h	78
Abbildung 61:	GF1-Gingivafibroblasten, Probekörpergruppe I, 48 h.....	78
Abbildung 62:	GF1-Gingivafibroblasten, Probekörpergruppe IV, 48 h	78
Abbildung 63:	REM, 2000x Vergrößerung, <i>Candida albicans</i>	80
Abbildung 64:	REM, 2380x Vergrößerung, <i>Candida albicans</i>	81
Abbildung 65:	REM, 2000x Vergrößerung, <i>Streptococcus sanguinis</i>	81
Abbildung 66:	REM, 5200x Vergrößerung, <i>Streptococcus sanguinis</i>	82

Abbildung 67: REM, 600x Vergrößerung, L929-Mausfibroblasten	82
Abbildung 68: REM, 4650x Vergrößerung, L929-Mausfibroblasten	83

Formelverzeichnis

Formel 1:	Summenformel der Abbindereaktion von Zinkoxidphosphatzementen	17
Formel 2:	Berechnung der SFE.....	26
Formel 3:	Gibbsche Energie der Adhäsion.....	26

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorptionsvermögen
ADP	Adenosindiphosphat
AFM	<i>atomic force microscopy</i> , Atomkraftmikroskopie
AG	Arbeitsgruppe
Al-K α	<i>Aluminium-Kα</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
<i>aqua dest.</i>	<i>aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BisGMA	Bisphenol-A -(di)-methacrylat
CCK-8	<i>Cell Counting Kit-8</i> [®]
CLSM	<i>confocal laserscanning microscopy</i> , konfokale Laserscanningmikroskopie
DIN	Deutsche Industrienorm
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DSMZ	Leibniz-Institut, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDX	<i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i> , energiedispersive Röntgenspektroskopie
EN	Europäische Norm
EPS	Extrazelluläre polymere Substanz
ESCA	<i>electron spectroscopy for chemical analysis</i> , Röntgenelektronenspektroskopie
eV	Elektronenvolt
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fetales Kälberserum
FCS	fetales Kälberserum
GF1	humane Gingivafibroblasten, Zelllinie GF1
Gr.	Gruppe
HEMA	Hydroxy-ethyl-methacrylat
TEGDMA	Triethylen-glycol-dimethacrylat
<i>in vitro</i>	lateinisch: im Glas, Reagenzglas
<i>in vivo</i>	lateinisch: im / am Lebenden

ISO	<i>International Organisation for Standardization</i> , Internationale Organisation für Normung
J/m ²	Joule pro Quadratmeter, SI-Einheit der Oberflächenenergie
KS-Test	Kolmogorov-Smirnov-Test
L929	Mausfibroblasten, Zelllinie L929
Lot	Produktionslos
min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
MMA	Methylmethacrylat / Methacrylsäuremethylester
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromid
NADH	Nikotinamidadenindinucleotidhydrid
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinucleotid
Nm/m ²	Newtonmeter pro Quadratmeter, Maß für die Oberflächenenergie
nmol	Nanomol
O.D.	Optische Dichte
OWRK	(Methode nach) Owens, Wendt, Rabel & Kaelble
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin-Kombination
PFA	Paraformaldehyd
pH(-Wert)	Maß für den sauren oder basischen Charakter
Pk	Probekörper
PMMA	Polymethylmethacrylat
Q _{0,25}	0,25-Quantil, unteres Quartil (Q1)
Q _{0,75}	0,75-Quantil, oberes Quartil (Q3)
Q1	unteres Quartil, 0,25-Quantil (Q _{0,25})
Q3	unteres Quartil, 0,75 Quantil (Q _{0,75})
Ra / R _a	arithmetisches Mittel der Rauheit [µm]
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rfu	<i>relative fluorescence unit</i> , relative Fluoreszenz- einheit

rlu	<i>relative luminescence unit</i> , relative Lumineszenzeinheit
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SFE	<i>surface free energy</i> , Freie Oberflächenenergie
SI	<i>système international d'unités</i> , Internationales Einheitensystem
Tukey-HSD	<i>Tukey's Honestly Significant Difference</i> , Eigenname für eine statistische Methode
UDMA	Urethandimethacrylat
UV	ultraviolett
WST	<i>water-soluble tetrazolium salt</i> , wasserlösliches Tetrazoliumsalz
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat
WST-8	2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium
XPS	<i>X-ray photoelektron spectroscopy</i> , Röntgenphotoelektronenspektroskopie
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid
Zn	Zink
Δ	griechischer Großbuchstabe Delta, hier mathematisches Symbol für Differenz
μmol	Mikromol
σ	griechischer Kleinbuchstabe Sigma, hier physikalisches Symbol für die Oberflächenspannung

1. Einleitung

Die Wiederherstellung ausgedehnter Zahnhartsubstanzdefekte durch indirekten Zahnersatz, beispielsweise nach Trauma oder kariöser Zerstörung, ist zentraler Bestandteil der zahnärztlichen Tätigkeit. Hierbei werden die verlorengegangenen Anteile von Schmelz und Dentin durch alloplastische Materialien ersetzt. Die zur intraoralen Befestigung dieses Zahnersatzes notwendigen zahnärztlichen Zemente füllen den Raum zwischen verbliebenem Zahnstumpf und Zahnersatz auf, härten dort aus und führen zu Halt über Verkeilung und Haftung. Generell ist der Zementspalt zwischen Restauration und Pfeilerzahn möglichst klein zu halten, da an den Restaurationsrändern die bakterielle Besiedelung besonders einfach erfolgen kann. Diese Besiedelung kann zur Entstehung von Sekundärkaries am Restaurationsrand führen, welche eine der biologischen Hauptursachen des Versagens von prothetischen Restaurationen darstellt. Zahnärztliche Zemente werden auch zur Befestigung von prothetischen Konstruktionen auf Implantaten eingesetzt. Auch hier sind Zementspalten und verbleibende Zementreste eine Hauptursache für periimplantäre Entzündungen.

Um die mikrobielle Besiedelung auf zahnärztlichen Zementen in der Mundhöhle zu reduzieren, können diese Materialien mit verschiedenen antimikrobiellen Additiven versehen werden. Erstaunlicherweise werden die biologischen Wirkungen solcher Modifikationen auf das orale Mikrobiom (d. h. die mikrobielle Wirkung) und auch auf körpereigene Gewebe (d. h. die zytotoxische Wirkung) vor der Vermarktung häufig nur unzureichend evaluiert.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Schließung dieser Erkenntnislücke leisten. Es wurde ein konventioneller Zinkoxidphosphatzement untersucht, dem durch die Beimengung von Kupfer antimikrobielle Eigenschaften zugeschrieben werden (Hoffmann's Kupfer Cement, Hoffmann Dental Manufaktur GmbH, Berlin). Hierbei sollten sowohl das Potential zur Anlagerung von bakteriellen bzw. fungalen Biofilmen als auch mögliche zytotoxische Effekte *in vitro* dargestellt werden.

2. Literaturübersicht

2.1 Bakterielle Adhäsion und assoziierte Krankheitsbilder

2.1.1 Speichel

Die Sekretion von Speichel ist von großer Bedeutung für die Gesundheit oraler Gewebe sowie für die physiologische Funktion der Verdauung (Backstrom et al. 2010). Die Speichelsekretion wird hierbei zu 90 % von den drei großen paarigen Speicheldrüsen *Glandulae parotis*, *Glandulae submandibularis* und *Glandulae sublingualis* geleistet (Mese und Matsuo 2007; Palk et al. 2010; Pedersen et al. 2002). Weitere 10% werden von den zahlreichen und verteilt liegenden kleinen Speicheldrüsen gebildet (Tucker 2010).

Zu 99 % besteht der Speichel aus Wasser (Edgar 1992; Farnaud et al. 2010). Die weiteren Bestandteile sind organische und anorganische Komponenten, deren Konzentration großen individuellen Unterschieden unterliegt (Bardow et al. 2014; Larsen et al. 1999; Neyraud et al. 2012). Zu den wichtigsten anorganischen Bestandteilen zählen Natrium, Kalium, Kalzium, Phosphat, Chlorid, Magnesium, Hydrogenkarbonat und Fluorid (Ben-Aryeh et al. 1986). Die organischen Anteile des Speichels lassen sich in hochmolekulare Bestandteile wie Glykoproteine, Enzyme, Immunglobuline sowie weitere antimikrobielle Proteine und niedermolekulare Bestandteile wie Harnsäure, Harnstoff, Lactat, Citrat, Glukose und Lipide einteilen (Edgar 1992; Humphrey und Williamson 2001).

Speichel erfüllt eine Reihe von Funktionen, die sowohl durch die Flüssigkeit des Speichels selbst, als auch durch seine Komponenten ermöglicht werden und multifunktionell, redundant sowie amphifunktionell sind (Kielbassa 2006; Levine 1993). Verschiedene Bestandteile, insbesondere die enthaltenen Proteine, können diverse Aufgaben gleichzeitig wahrnehmen und in ihrer Wirkung für den Wirt sowohl positive als auch negative Effekte (z. B. im Kontext bakterieller Adhäsion) haben (Ahn et al. 2002; Douglas 1994; Hannig und Joiner 2006). Die Hauptaufgaben des Speichels lassen sich wie folgt beschreiben: Transport von Nahrung und Spülfunktion, Beginn der Verdauung, Unterstützung der Geschmackswahrnehmung, Schutz und Befeuchtung oraler Gewebe wie Schleimhäute und Zahnhartsubstanzen, Remineralisation der Zahnhartsubstanzen, Pufferung von Säuren sowie anti-

mikrobielle Aktivität (Edgar 1990; Hellwig et al. 2009b; Humphrey 2001; Kielbassa 2006; Mandel 1987; Rudney 1995; Tucker 2010; Van Nieuw Amerongen et al. 2004).

2.1.2 Bildung und Funktion des Pellikel

Alle oralen Gewebe sind von einem azellulären, proteinreichen, homogenen Film überzogen (Bradway et al. 1989). Diese bakterienfreie Schicht wird erworbenes Pellikel genannt (Dawes 1963). Die Bildung des Pellikels auf Oberflächen in der Mundhöhle erfolgt sehr schnell und ist innerhalb von Minuten abgeschlossen (de Jong et al. 1984; Hannig 1999; Hannig et al. 2004; Skjorland et al. 1995; Vacca Smith und Bowen 2000). Die Bildung ist weiterhin unabhängig von der Anwesenheit von Bakterien (Meckel 1965), jedoch direkt an das Vorhandensein von Speichelproteinen gebunden (Juriaanse et al. 1981; Sonju und Rolla 1973).

Die Adsorption von Proteinen, insbesondere auf den Oberflächen der Zahnhartsubstanzen, erfolgt über verschiedene Wirkungsmechanismen; elektrostatische Kräfte spielen hierbei eine bedeutende Rolle (Bennick et al. 1981; Hay 1973; Zhang et al. 2015). Eine genauere Betrachtung zeigt die unterschiedlichen Bereiche der gemeinsam wirkenden Teilkräfte. So zeigen sich die Van-der-Waals- und Coulombkräfte als Kräfte mit großem Wirkungsbereich, hydrophobe Wechselwirkungen als solche mit mittlerem Wirkungsbereich und elektrostatische Säure-Base-Wirkungen, Wasserstoffbrücken sowie ionische und kovalente Bindungen als Kräfte mit kleinem Wirkungsbereich (Bellion et al. 2008; Rabe et al. 2011; van Oss 2003). An der Bildung und Reifung des Pellikels wirken alle diese Kräfte gemeinsam und führen zu der oberflächenspezifischen Adsorption des Pellikels (Hannig und Hannig 2009; Hannig und Joiner 2006).

Die geladene Oberfläche des Dentins begünstigt die Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht, einer sogenannten Stern-Doppelschicht (Hannig und Joiner 2006). An diese lagert sich im wässrigen Milieu durch die wirkenden elektrostatischen Kräfte eine Schicht aus Wassermolekülen an und hydratisiert die Stern-Doppelschicht (Hannig und Joiner 2006). Proteine, die ebenfalls im wässrigen Milieu hydratisiert vorliegen, können nun binden (Hannig und Joiner 2006).

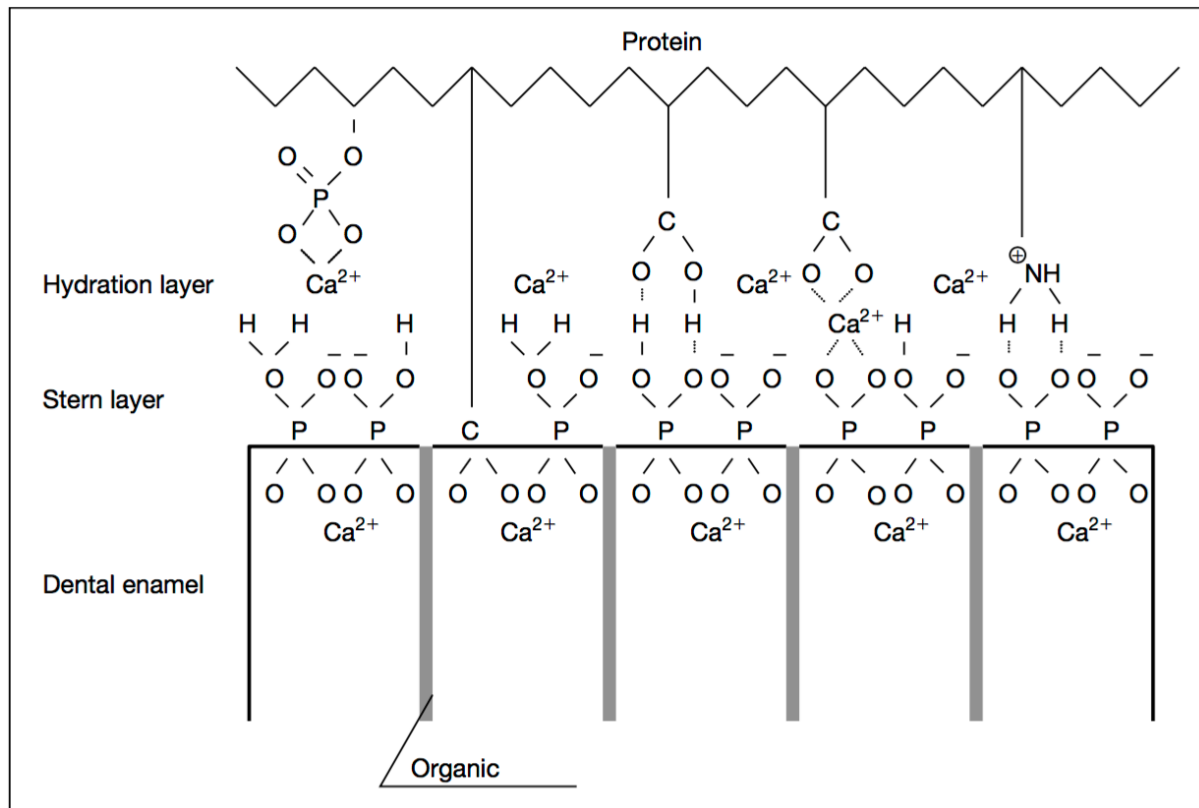


Abbildung 1: Schematische Zeichnung der Pellikelbildung (Hannig und Joiner 2006).

Die Schichtstärke des Pellikels wächst so im Laufe der Zeit und erreicht nach ca. zwei Stunden eine Stärke von 20-100 nm und nach 24 h bis 48 h Stärken von 100 nm bis zu 3 μm (Bardow et al. 2008; Hannig 1999). Das Pellikel besteht aus verschiedenen Proteinen mit einer entsprechend großen Anzahl an Funktionen:

α -Amylase (Spaltung und Abbau von Stärke), Agglutinin (Verklebung von Bakterien), Albumin (Plasmaprotein, Transporter), Calgranulin B (kalziumbindend), Carbonanhydrase (Regulation von Säure), Cystatin (antibakteriell und antiviral), Cytokeratin (Strukturprotein), Fibrinogen (Blutgerinnung), Fibronectin (Adhäsionsprotein), Glycosyltransferasen (Enzym für glykosidische Bindungen), Histation (antimikrobiell gegen Bakterien und Pilze), Komplementfaktor C3 (humorales Immunsystem), Laktoferrin (bakteriostatisch), Lysozym (Zerstörung bakterieller Zellwände), MG-1 und MG-2 (Lubrikant), prolinreiche Proteine (Vorläuferproteine) und Statherin (verhindert die Präzipitation von Kalzium) (Aydin 2007; Edgerton und Levine 1992; Gunput et al. 2016; Hannig et al. 2004; Henskens et al. 1993; Jagr et al. 2014; Jensen et al. 1992; Kivela et al. 1999; Ulker et al. 2008; Yan et al. 2009; Yao et al. 2001).

Bei Betrachtung der physiologischen Funktionen des Pellikels steht hauptsächlich die Schutzfunktion für den Schmelz gegen Attrition, Erosion und Demineralisation im

Vordergrund (Amaechi et al. 1999; Lendenmann et al. 2000a; Zahradnik et al. 1976). Zu beachten ist, dass es bakteriellen Rezeptoren möglich ist, spezifisch und dabei stabiler am erworbenen Pellicel zu adhären, als es ihnen an einer freien Oberfläche möglich wäre (Carlen et al. 1996; Cheaib et al. 2015; Wessel et al. 2014). Zusammenfassend ist die Funktion des Pellicels mit seiner Schutzwirkung für die Zahnhartsubstanzen und der Begünstigung der Biofilmbildung daher als ambivalent zu bezeichnen (Gibbons und van Houte 1973; Hannig und Joiner 2006; Lendenmann et al. 2000a; Tabuchi et al. 2006).

2.1.3 Bakterielle Adhäsion und Biofilme

Bakterielle Biofilme sind eine der ursprünglichsten und ältesten Erscheinungsformen von Leben überhaupt, sie stellen neben der planktonischen, flottierenden Phase eine der zwei Organisationsformen, in denen bakterielles Leben vorkommt, dar und sind hierbei die dominante Form, in der Bakterien existieren (Hall-Stoodley et al. 2004; Rasmussen 2000; Westall 2005). Orale Biofilme zeichnen sich als bakterielle Gemeinschaften aus, die dreidimensional strukturiert, auf festen Oberflächen adhären und in eine selbst produzierte extrazelluläre polymere Matrix eingebettet sind (Lawrence et al. 1991; Stoodley et al. 1994; Wood et al. 2000).

Der hohe Grad an Strukturierung innerhalb eines Biofilms zeigt Charakteristika eines eigenen Ökosystems, inklusive der Möglichkeit, sensibel auf externe Reize zu reagieren (Liljemark et al. 1997; Stoodley et al. 2002). Dieses komplexe Verhalten wird ab einem gewissen Wachstums- und Strukturierungsgrad durch die Fähigkeit zur Kommunikation unter den Mikroorganismen ermöglicht (*quorum sensing*) (Huang et al. 2011; Li et al. 2002; Zhang et al. 2009). Diese Kommunikation ist nicht auf Individuen oder Mikrokolonien einer Spezies begrenzt, sondern erfolgt auch artübergreifend (Holden et al. 1999; Rickard et al. 2006). Diese besonderen Verhältnisse in einem Biofilm führen für die dort vorkommenden Bakterien zu einem, bezogen u. a. auf Wachstumsrate und Genexpression, veränderten Phänotyp (Anderl et al. 2000; Beenken et al. 2004; Donlan und Costerton 2002). Besonders bemerkenswert ist dabei, dass genetische Informationen geteilt werden können (Madsen et al. 2012). Bei dem als *horizontal gene transfer* bezeichneten Vorgang können Plasmide, also bakterielle DNA-Moleküle, innerhalb eines Biofilms über verschiedene Spezies hinweg übertragen werden (Madsen et al. 2012; Molin und Tolker-Nielsen 2003). Die so geteilten Informationen können u. a. Resistenzen gegen

Antibiotika begünstigen (Salcedo et al. 2015). Als Resultat des aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstandes besteht die Tendenz, Biofilme bzw. die Gemeinschaften aus (Mikro-)Organismen im Ganzen, also auch inklusive eines Wirtes wie dem Menschen, als *Metaorganismen* zu betrachten; Metagenome und Metatranskriptome (d. h. die gesamte Erbinformation und die Gesamtheit der exprimierten Proteine) fungieren als ein Ganzes (Biagi et al. 2012; Bosch und McFall-Ngai 2011; Frias-Lopez und Duran-Pinedo 2012; Garagnani et al. 2014; Mermel 2015).

Die Organisation in einem komplexen Biofilm ermöglicht es den Bakterien, einen Schutz gegen diverse Noxen auszubilden, die z. B. UV-Strahlung, Säureeinwirkung, Austrocknung, Phagozytose und antimikrobielle Mittel sowie Antibiotika umfassen können (Espeland und Wetzell 2001; Gilbert et al. 2002; Le Magre-Debar et al. 2000; Leid et al. 2002; McNeill und Hamilton 2003; Stewart und Costerton 2001; Zhou et al. 2001). Extrembedingungen, in denen Biofilme überleben können, zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Spannweite der Biofilm-Existenz (Flemming 1991, 2000).

Milieufaktor	Spannweite
Temperaturbereich	- 5 °C (in kalten Salzlösungen) bis 120 °C (in heißen Quellen am Meeresboden)
pH-Bereich	Von pH 0 (<i>Thiobacillus thiooxidans</i>) bis pH 13 (<i>Plectonema nostocorum</i> , in Natronseen)
Redoxpotential	Gesamter Wasser-Stabilitätsbereich: von – 450 mV (methanogene Bakterien) bis + 850 mV (Eisenbakterien), Biofilme auf Elektroden
Druck	Bis 1000 bar (barophile Bakterien auf dem Meeresgrund)
Salzgehalt	Wachstum in hochreinem Wasser (Pharma- und Elektronikindustrie) bis zu nahezu gesättigter Salzlösung (halophile Bakterien im Toten Meer)
Nährstoffangebot	Von 10 µg xL ⁻¹ (Trink- und Reinwasser) bis zum Leben auf oder in C-Quellen
Strahlenbelastung	Biofilme auf UV-Lampen, radioaktiven Bestrahlungseinheiten in Kernkraftwerken
Biozide	Biofilme in Desinfektionsmittelleitungen

Die Kontrolle durch die Funktionseinheit (bzw. den Metaorganismus) *Biofilm* auf die einzelnen Mikroorganismen ermöglicht eine Abstimmung des gemeinsamen Verhaltens mit dem Ziel, das Überleben der Mikrokolonien bzw. des Biofilms zu sichern (Kuramitsu et al. 2007). Diese Eigenschaften führen u. a. dazu, dass Bakterien in Biofilmen chronische Entzündungen wie Parodontitiden und Periimplantiden hervorrufen können oder dazu, dass das kariogene Potential einer

Plaque steigt (Abiko et al. 2010; Hoyle und Costerton 1991; Koo et al. 2013; Mo et al. 2010; Subramani et al. 2009).

Die Proliferation eines Biofilms in der Mundhöhle beinhaltet die irreversible Adhäsion auf der jeweilig besiedelten Oberfläche (Bradshaw et al. 2001; Eginton et al. 1998; Teughels et al. 2006). Die beim Kauen, Schlucken, bei Zungenbewegungen und Mundhygiene auftretenden Scherkräfte wirken ebenso auf den Biofilm wie die hydrodynamischen Einflüsse von Speichel und Sulkusfluid (Katsikogianni und Missirlis 2004; Paramonova et al. 2009). Wenn Rauheiten der Oberfläche oder Fissuren Bereiche mit geringeren einwirkenden Kräften oder größerer Oberflächenrauheit schaffen, so sind dies Prädilektionsstellen für die Initiation von Biofilmen (Carlen et al. 2001; Katsikogianni und Missirlis 2004; Morgan und Wilson 2001; Muller et al. 2007; Nyvad und Fejerskov 1987; Quirynen und Bollen 1995; Tanner et al. 2003; Teughels et al. 2006).

Bei der Bildung des oralen Biofilms lassen sich hierbei fünf verschiedene Phasen unterscheiden (Bos et al. 1999; Marsh und Bradshaw 1995; Scheie 1994; Teughels et al. 2006; van Loosdrecht et al. 1990) (siehe Abbildung 2):

1. Transport der Mikroorganismen zum Substrat
2. Initiale Adhäsion und primäre Adhäsion
3. Irreversible Bindung und sekundäre Adhäsion
4. Kolonisation und Plaquereifung
5. Ablösung von Tochterkolonien und *quorum sensing*

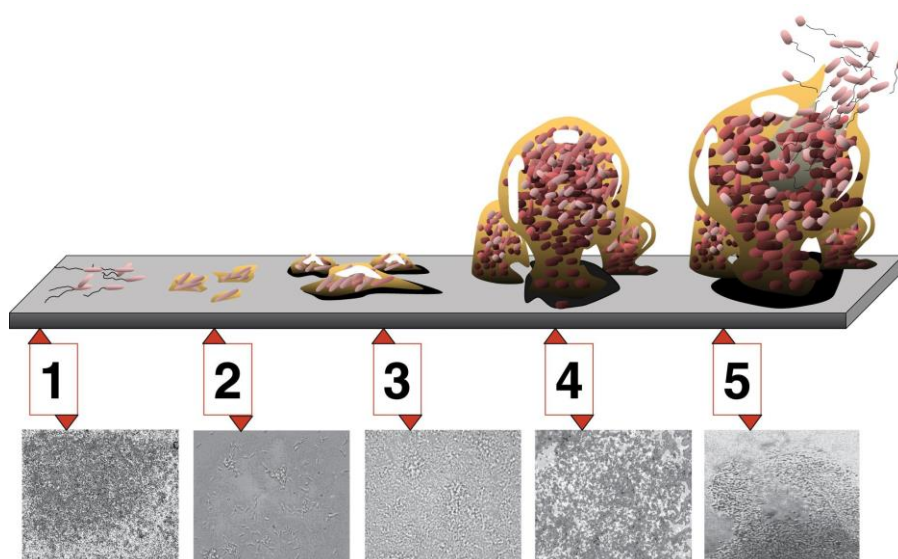


Abbildung 2: Fünf Phasen der Biofilmbildung (Monroe 2007).

Der Transport von Mikroorganismen zur Materialoberfläche erfolgt überwiegend passiv und ungerichtet durch Flüssigkeitsströmung, Sedimentation und Brown'sche Eigenbewegung, in Ausnahmefällen aber auch aktiv durch Eigenbewegung mit Flagellen (Bos et al. 1999; Busscher und Weerkamp 1987; Houry et al. 2012; Quirynen und Bollen 1995; Scheie 1994; Teughels et al. 2006).

Die initiale Adhäsion oraler Biofilme erfolgt in der Regel über einer bakterienfreien Proteinschicht, dem Pellicel (Costerton 1995; Sogn et al. 1973). Dieses bietet den Bakterien eine Oberfläche, die eine Adhäsion ermöglicht und ist somit für die Etablierung eines Biofilms in der initialen Phase von großer Bedeutung (Busscher und van der Mei 1997, 2006; Cassels et al. 1995; Marsh und Bradshaw 1995; Ray et al. 1999; Rosan und Lamont 2000). Die in der initialen Adhäsion ausgebildeten Bindungen von Mikroorganismen mit Oberflächen basieren auf physiko-chemischen Interaktionen, so z. B. Van-der-Waals-Kräften und elektrostatische Kräften; sie sind schwach und zudem reversibel (Busscher et al. 1992; Busscher und van der Mei 1997; Marsh 1999; Marsh und Bradshaw 1995). Die initiale Adhäsion hat durch ihre frühe Phase in der Biofilmentstehung Einfluss auf die Zusammensetzung des späteren Biofilms (Ammann et al. 2013; Busscher et al. 1995; Hauser-Gerspach et al. 2007; Kolenbrander 2000; Periasamy und Kolenbrander 2010).

In der Phase der primären Adhäsion oraler Biofilme treten charakteristische Pionierkeime auf, unter diesen befinden sich *Actinomyces spp.*, *Campylobacter*, *Eikenella corrodens*, *Haemophilus spp.*, *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis* und *Veillonella* (Diaz et al. 2006; Douglas 1983, 1994; Hannig und Joiner 2006; Periasamy und Kolenbrander 2010). Diese Erstbesiedler zeichnen sich durch das Ausbilden der oben genannten Adhäsine und Fimbrien aus, die eine stereochemische und später irreversible Bindung erlauben (Listgarten 1994; Marsh und Bradshaw 1995).

In der dritten Phase erfolgt eine irreversible Bindung der Bakterien. Sie ist u. a. durch die Produktion einer extrazellulären polymeren Matrix (EPS) gekennzeichnet; hier stehen Spezies der Gattung *Streptococcus* im Vordergrund, die als Pionierkeime bzw. Primärbesiedler u. a. komplexe Polysaccharide - wie das wasserunlösliche Glucan - sezernieren und die Anheftung von Spätbesiedlern begünstigen (Koo et al. 2009; Rosan und Lamont 2000; Vickerman et al. 1991; Vickerman und Jones 1995). Die gebildete EPS besteht zu großen Teilen aus Wasser, aus Polysacchariden, Proteinen und Lipiden (Ahn et al. 2007; Broukal und Zajicek 1974). Sie nimmt als

Matrix den Raum zwischen den Bakterien und der Oberfläche ein, ermöglicht eine Steigerung der Stabilität und Funktion des Biofilms und den Bakterien eine Bindung direkt an die EPS (Adhäsine) und indirekt an den Pellicel (Limoli et al. 2015; Romani et al. 2008; Sanderink 2004). Neben der EPS spielen spezifische Rezeptor-Adhäsion-Bindungen eine entscheidende Rolle bei der Bildung irreversibler Bindungen an Proteine des Pellicels und des Speichels (Gibbons und Hay 1988; Mergenhagen et al. 1987; Whittaker et al. 1996) (Ge et al. 2004). *Streptococcus sanguinis* und andere Streptokokken binden hierbei als charakteristische Erstbesiedler an saure, prolinreiche Proteine und mit Bindungen an α -Amylase und Sialinsäure an weitere Rezeptoren des Pellicels (Scannapieco et al. 1995; Whittaker et al. 1996). Im Zeitverlauf werden die Bindungen zwischen Proteinen und Bakterien stabiler und intensiver und zeigen als spezifische Bindungen in der Folge höhere Adhäsionskräfte als unspezifische Bindungen (van der Mei et al. 2008).

Geeignete Bedingungen wie die irreversible Bindung an die Oberfläche und die EPS ermöglichen in der Phase der Kolonisation und Reifung ein Wachstum der Bakterien und die Bildung von Mikrokolonien (Rickard et al. 2003). Dieses Wachstum ist geprägt von Koadhäsion und Koaggregation, also die Verbindungen zwischen Bakterien des Biofilms untereinander und auch über Speziesgrenzen hinweg (Kolenbrander 2000; Marsh 1999; Marsh und Bradshaw 1995). Dies wird möglich, da die Bakterien Rezeptoren und Adhäsine sowohl für Bindungen mit der eigenen Spezies, als auch für die interspezifische Bindung ausbilden (Marsh und Martin 2003; Nagaoka et al. 2008; Palmer et al. 2003). Die Pionierkeime bieten später kolonisierenden Keimen die Möglichkeit zur Bindung, wobei *Fusobacterium nucleatum* eine besondere Funktion als Brückenbildner zwischen Früh- und Spätkolonisierern übernimmt, da es mit Bakterien beider Phasen Bindungen eingehen kann (Bradshaw et al. 1998; Karched et al. 2015; Kolenbrander et al. 2002) (siehe Abbildung 3). Bakterien der späteren Kolonisation binden vorwiegend an diese Brückenbildner und weniger an anderen Spätkolonisierern oder untereinander (Yao et al. 2003). Dies gilt nur für Multispeziesbiofilme, wobei auch Biofilme aus nur einer einzigen oder wenigen Spezies möglich sind (Allesen-Holm et al. 2006; Amerongen und Veerman 2002; Wimpenny et al. 2000). Generell gilt für Biofilme, dass sie in späten Phasen auf Schichtstärken von über 5 mm anwachsen können (Costerton et al. 1987; Costerton et al. 1995).

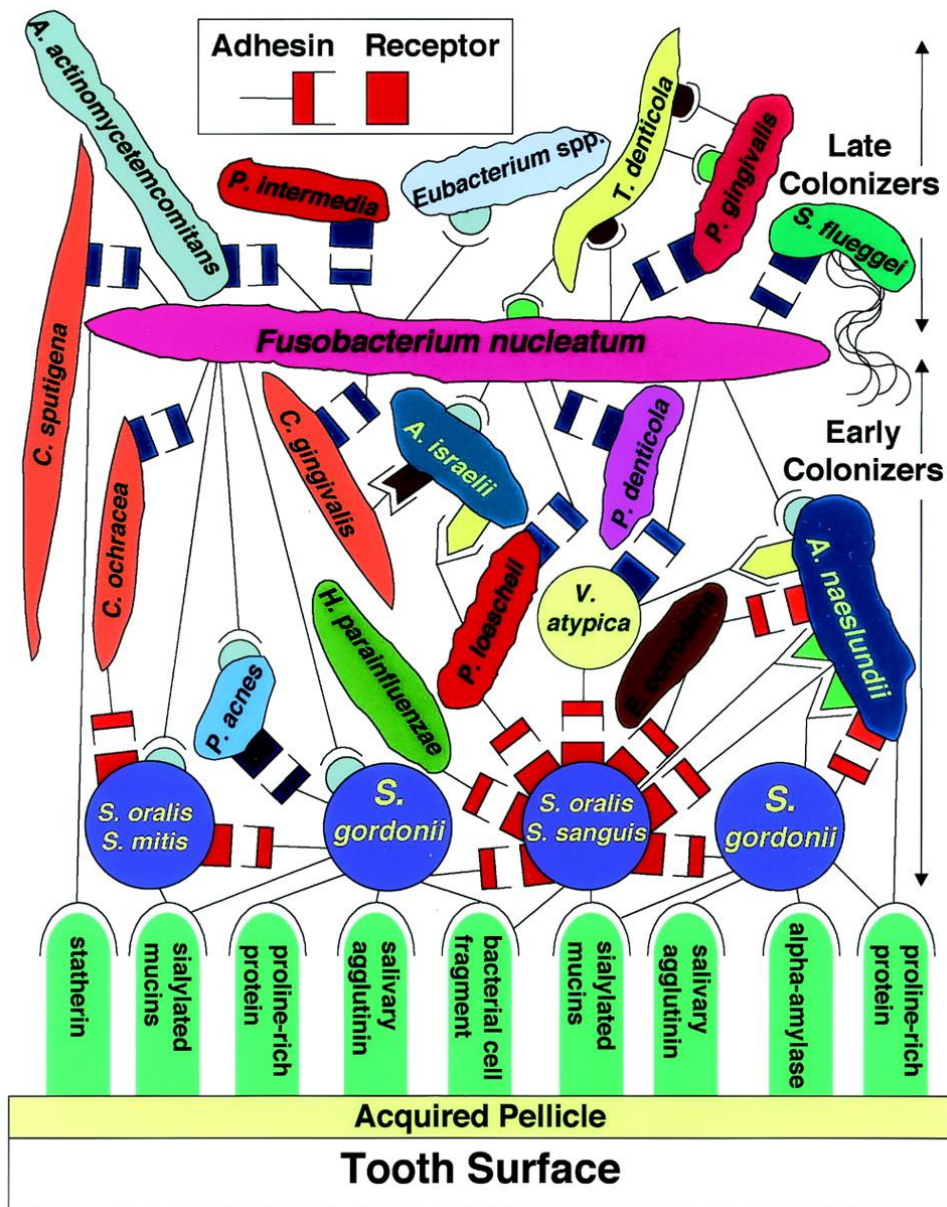


Abbildung 3: Modell für die Wechselwirkungen der Adhäsion im Biofilm (Kolenbrander et al. 2002)

Die letzte Phase der Biofilmmaturation beschreibt eine Phase des Gleichgewichts zwischen Wachstum und Ablösung von Tochterkolonien bei fortgeschrittener Komplexität der Wechselwirkungen (Costerton et al. 1999; Marsh 1999; Marsh und Bradshaw 1995). Der gereifte Biofilm zeigt einen hohen Grad an dreidimensionaler Struktur u. a. mit zellreichen und zellarmen Bereichen, ausgeprägter Matrix aus EPS, pilzförmigen Ausstülpungen und Kanälen (siehe Abbildung 4) (Costerton 1999; Haisch und Niessner 2007; Harrison et al. 2006; Maeyama et al. 2004). Verschiedene Mechanismen führen nun zur Bildung von Tochterverbänden, wobei Bakteriengemeinschaften durch Abschilferung und einzelne Bakterien auch durch Erosion freigesetzt werden können (Li et al. 2001; Stoodley et al. 2001). Durch *quorum sensing* geteilte Informationen, Sauerstoffmangel, Nährstoffmangel und andere

Faktoren können neben der durch physikalische Einflüsse ausgelösten Abschilferung zu einem gezielten Ablösen von Zellen aus dem Biofilm führen, wobei die EPS gezielt aufgelöst werden kann (Boyd und Chakrabarty 1994; Hammer und Bassler 2003; Karatan und Watnick 2009; Rowe et al. 2010; Sauer et al. 2004). Die Freisetzung von Bakterien mit angepasstem, motilem Phänotyp aus Biofilmen legt nahe, dass es sich hierbei um einen dichteabhängigen Verbreitungsmechanismus handelt (Purevdorj-Gage et al. 2005). Nach dem aktuellen Stand der Forschung scheinen die Regulations- und Dispersionsvorgänge in reifen Biofilmen komplexer als die initiale Biofilmbildung und sie sind nicht zuletzt aufgrund einer möglichen medizinischen Nutzung der Gegenstand aktuellerer Forschung (Chao et al. 2015; Petrova und Sauer 2016; Rogers et al. 2009; Solano et al. 2014).

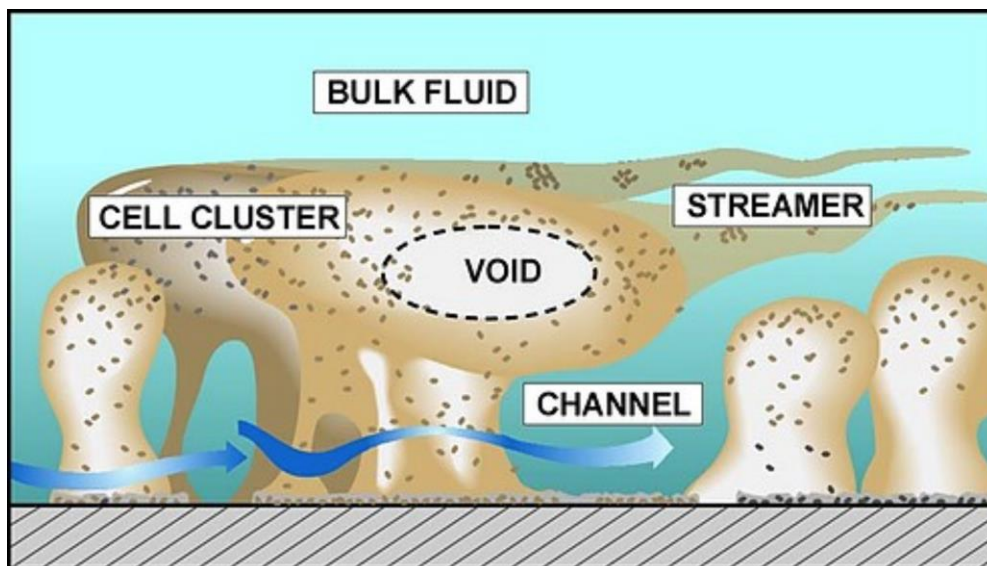


Abbildung 4: Reifer Biofilm mit komplexer Struktur (Dirckx 1997).

2.1.4 Karies

Die dentale Karies lässt sich wie folgt definieren (Pschyrembel 2016):

„Häufigste Zahnerkrankung infolge Störung des lokalen Gleichgewichts zwischen entkalkenden und remineralisierenden Komponenten im Speichel mit Zerstörung der Zahnhartsubstanzen.“

Sie ist eine Biofilm-assoziierte Infektionserkrankung, deren Pathogenese mit der modifizierten ökologischen Plaquehypothese beschrieben wird (Takahashi und Nyvad 2008). Diese setzt den Wirt (Verhalten und Wirtsantwort) sowie die

Zusammensetzung der Bakterienspezies im Biofilm mit ihren Genotypen und Phänotypen zueinander in Beziehung (Marsh 1994; Takahashi und Nyvad 2008; van Houte 1994). Dieser Theorie folgend bewirken Veränderungen im pH-Wert der oralen Biofilme eine Selektion der enthaltenen Mikroorganismen. Eine Verschiebung des pH-Wertes in niedrige Bereiche begünstigt demnach eine Selektion von säurebildenden Streptokokken der *Mutans*-Gruppe und Laktobazillen mit potentiell kariogenen Eigenschaften, wohingegen ein neutraler pH-Wert Streptokokken der *Mitis*-Gruppe begünstigt (Bowden und Hamilton 1987; Dale et al. 1989; McDermid et al. 1986).

Streptococcus mutans kommt hier eine besondere Rolle in den veränderten ökologischen Wechselbedingungen des Biofilms zu, denn er ist sowohl säureresistent als auch säureproduzierend (Burgess 1988). Hierbei ist *S. mutans* in der Lage, anaerobe Glykolyse zu betreiben, bei niedrigen pH-Werten aktiv gegen ein Konzentrationsgefälle Protonen auszuschleusen und eine widerstandsfähige EPS zu produzieren (Hellwig et al. 2009; Krasse 1986). Diese veränderte, kariogene Plaque ist Voraussetzung für die Entstehung von Karies, da die von den Bakterien produzierte Säure bei häufiger Einwirkung auf Zahnhartsubstanzen diese durch eine Aufhebung des Gleichgewichtes von Demineralisation und Remineralisation zerstört (Burgess 1988; de Soet et al. 2000; Hellwig et al. 2009). Neuere Ergebnisse zeichnen darüber hinaus ein komplexeres Bild der kariogenen Plaque und korrelieren Streptokokken mit Schmelzkaries und Laktobazillen mit Dentinkaries bei gleichzeitig großen interindividuellen Unterschieden in der mikrobiellen Gesamtzusammensetzung (Simon-Soro et al. 2014; Yang et al. 2012). Sogar die genauere Betrachtung des klassischen Leitkeimes der Karies *Streptococcus mutans* zeigt unterschiedliche Phänotypen bei karies-aktiven und karies-inaktiven Wirten, die sich z. B. hinsichtlich der Toleranz gegenüber antimikrobiellen Peptiden unterscheiden (Holbrook und Magnúsdóttir 2012; Phattarataratip et al. 2011; Pieralisi et al. 2010).

Die dentale Karies hat eine hohe Prävalenz in der Bevölkerung; so haben nach der aktuellen Deutschen Mundgesundheitsstudie V jüngere Senioren (65- bis 74-Jährige) 17,7 Zähne mit Kariesschäden und bereits 18,7 % aller 12-Jährigen haben kariesgeschädigte Zähne (Jordan und Micheelis 2016). Zur Therapie von kariösen Läsionen wurden alleine im Rahmen der gesetzlichen Krankenversicherungen 2016 knapp 10 Millionen Füllungstherapien in Deutschland durchgeführt (Rädel et al. 2016).

2.1.5 Parodontitis

Die Parodontitis lässt sich wie folgt definieren (Pschyrembel 2016):

„Meist bakteriell bedingte, von vielen Faktoren beeinflusste Entzündung des Zahnhalteapparates (Parodontium), die mit klinisch und röntgenologisch nachweisbarer Zerstörung des Zahnhalteapparats (...) verbunden ist.“

Einer Parodontitis geht in der Regel eine Gingivitis voraus, welche eine Entzündung des gingivalen Weichgewebes noch ohne Beteiligung des Knochens darstellt (Kinane 2001). Sie ist Biofilm-assoziiert und wird teilweise durch die aus dem Biofilm freigesetzten Toxine verursacht (Shapiro et al. 1972). Der orale Biofilm weist in der Regel eine, bezogen auf die darin enthaltenen Mikroorganismen nach Abschluss seiner Reifung, relativ konstante Zusammensetzung auf (Marsh 1991). Bleibt jedoch eine Gingivitis unbehandelt, breitet sich der Biofilm nach subgingival aus und erfährt eine Veränderung in seiner mikrobiellen Zusammensetzung: weg von einer überwiegend gram-positiven und aeroben, hin zu einer stark gram-negativen und aneroben Mikroflora (Slots 1977a, 1977b). Zu diesen Keimen zählen u. a. *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola*, die Toxine, Kollagenasen und andere Proteasen freisetzen und als Markerkeime der Parodontitis bezeichnet werden (Ramseier et al. 2009; Socransky und Haffajee 1994). Einzelne Keime scheinen hierbei dem Biofilm besonders pathogene Eigenschaften zu verleihen (Hajishengallis et al. 2011; Honda 2011). Der synergistische Effekt einiger weniger, spezifischer Arten von Mikroorganismen scheint daher die Entstehung einer Parodontitis entscheidend zu begünstigen (Mineoka et al. 2008).

Die Ausbildung eines die Markerkeime enthaltenden Biofilmes alleine ist jedoch keine ausreichende Voraussetzung für das Entstehen einer Parodontitis (Hasan und Palmer 2014). Die Reaktion des Wirtes (*host response*) kann, wenn sie zu gering oder zu stark ausfällt, die durch die Bakterien ausgehende Gewebeerstörung durch die fehlende oder überschießende Immunantwort massiv beschleunigen (Preshaw et al. 2004). Zusammenfassend scheint daher erst das Zusammenwirken verschiedener Mikroorganismen mit gemeinsam entwickelter Pathogenität bei gleichzeitiger Vulnerabilität für eben diese mikrobiologische Zusammensetzung beim

Wirt eine Biofilm-assoziierte Parodontitis zu ermöglichen (Hajishengallis und Lamont 2012; Socransky und Haffajee 1992).

Parodontitis ist eine häufige Erkrankung, so haben 51,6 % aller Deutschen zwischen 35 und 44 Jahren eine moderate oder schwere Parodontitis, gleiches gilt für 64,6 % aller Deutschen zwischen 65 und 74 Jahren (Jordan und Micheelis 2016). Die Therapie einer Parodontitis besteht in erster Linie aus der möglichst vollständigen mechanischen Beseitigung der subgingivalen Biofilme gegebenenfalls unter antimikrobieller Therapie (z. B. durch lokale Anwendung von Mundspülungen und systemische oder topische Gabe von Antibiotika) mit unterschiedlicher Effektivität (Chandki et al. 2011; Smiley et al. 2015).

2.1.6 Periimplantitis

Analog zur Gingivitis bzw. Parodontitis an natürlichen Zähnen kann an dentalen Implantaten eine Mukositis – also eine Entzündung der Schleimhaut – bzw. eine Periimplantitis auftreten (Khammissa et al. 2012a). Letztere lässt sich daher wie folgt definieren (Pschyrembel 2016):

„Entzündliche Erkrankung bei dentalem Implantat mit Beteiligung des Alveolarknochens (röntgenologisch nachweisbare Knochenresorption) und Gefahr der Implantatlockerung.“

Die Mukositis ist hierbei bakteriell induziert, reversibel und betrifft lediglich die Weichgewebe um das Implantat, wohingegen die Periimplantitis irreversibel ist, Hart- und Weichgewebe betrifft und mit einem Verlust der Osseointegration und der Bildung von Zahnfleischtaschen einhergeht (Khammissa et al. 2012b; Pontoriero et al. 1994; Wilson 2013). Das Fortschreiten einer Periimplantitis geschieht oftmals schneller als bei einer Parodontitis, Ursachen hierfür sind im unterschiedlichen Aufbau der angrenzenden Gewebe und einer veränderten *host response* begründet (Carcuac und Berglundh 2014; Heitz-Mayfield und Lang 2010). Die den Biofilm einer Periimplantitis bildenden Bakterien entsprechen hierbei nur in Teilen den bei einer Parodontitis vorkommenden Keimspektren; jedoch kann von einer ähnlichen, Biofilm-assoziierten Pathogenese und einer multimikrobiellen Infektion anaerober, gram-negativer Bakterien ausgegangen werden (Charalampakis et al. 2012; Rams et al. 2014).

Vor dem Hintergrund der bakteriellen Besiedlung von dentalen Zementen wird auch ein Zusammenhang zwischen Periimplantitis und Resten von Befestigungszementen diskutiert (Raval et al. 2015; Wilson 2009; Winkler et al. 2014).

2.2 Werkstoffkundliche Grundlagen

2.2.7 Dentale Zemente

Um indirekten Zahnersatz wie z. B. Kronen definitiv oder provisorisch an Zähnen oder Implantaten zu verankern, kommen Befestigungszemente zum Einsatz (Eickholz 1998). Hierbei wird der Randspalt zwischen Restauration und Pfeiler mit dem jeweiligen Zement gefüllt, wobei der Zement am Übergang Zahnersatz-Pfeiler mit dem Mundmilieu in Verbindung steht und bakteriell besiedelt wird (Buchmann 1992; Winkler et al. 2014). Die Ausdehnung des als *marginal gap* bezeichneten Randspaltes wird in rasterelektronischen Aufnahmen besonders deutlich (siehe Abbildung 5), das gleiche gilt für potentiell auftretende mikroskopische Risse (*microleakage*) im Zement selbst (Naumova et al. 2015).

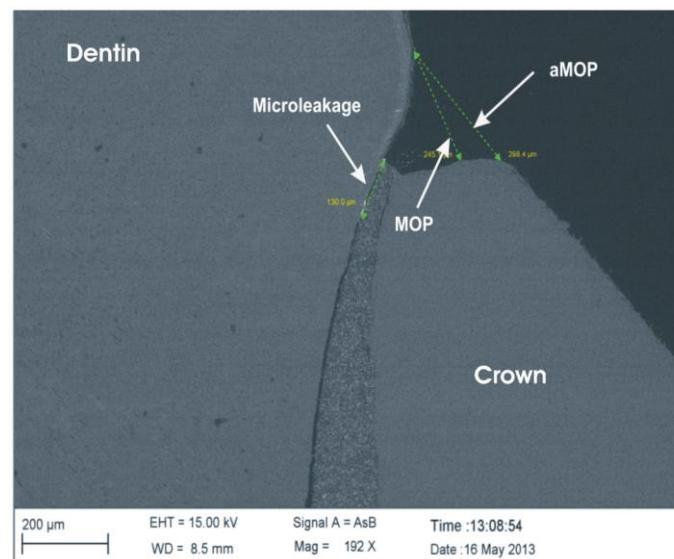


Abbildung 5: Mit Zement gefüllter Randspalt einer Keramikkrone, aMOP = absolute marginal gap = maximaler Randspalt, MOP = marginal gap = Randspalt, mikroleakage = mikroskopischer Riss im Zement (Naumova et al. 2015).

Für den langfristigen Erfolg dentaler Restaurationen ist der Zementspalt von entscheidender Bedeutung, da sich nach bakterieller Besiedlung sekundäre Karies ausbilden und unterminierend ausbreiten kann (Alomari et al. 2009; Glantz et al. 2002; Hammerle 1994; Sundh und Odman 1997). Das kariesprotektive und bzw. biologische Verhalten von Zementen ist daher Gegenstand der Forschung (Korkmaz

et al. 2013; Rosenstiel et al. 1998; Sidhu und Nicholson 2016; Winkler et al. 2014). Hierbei kommen u. a. verschiedene Additive zum Einsatz, die im Kapitel antimikrobielle Bestandteile näher betrachtet werden.

Dentale Zemente können darüber hinaus auch als Unterfüllungsmaterial und für provisorische Füllungen genutzt werden (Voß und Meiners 1989). Die klassischen dentalen Zemente sind Zinkoxidphosphatzement, Zinkoxideugenolzement, Zinkpolycarboxylzement, Glasionomerzement und Silikatzement (Hellwig et al. 2009). Die schematische Zusammensetzung verdeutlicht die Abbildung 6 nach Combe.

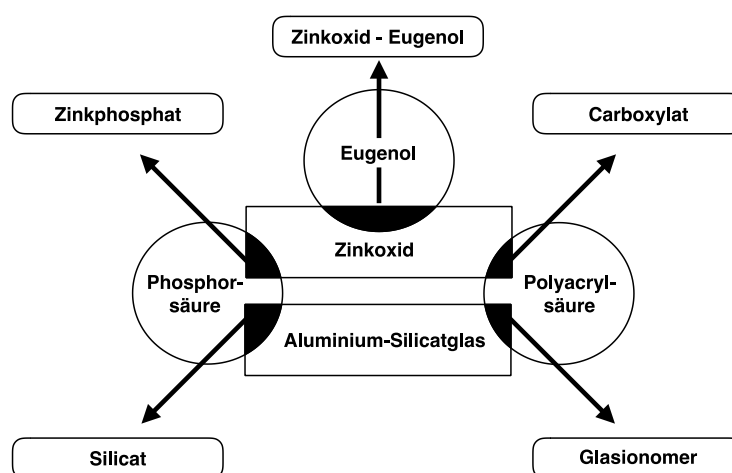


Abbildung 6: Übersicht über die verschiedenen Arten von Zementen und deren Bestandteilen (Combe 1984).

Das Anmischen der Zemente erfolgt meist aus einem Pulver und einer Flüssigkeit, wobei das Pulver aus Metalloxiden und die Flüssigkeit aus einer Säure, zumeist in wässriger Lösung, bestehen. Die anschließende Säure-Base-Reaktion erzeugt Salze, die schließlich durch Erstarren eine amorphe Matrix erzeugen (Marxkors 2005). Zinkoxideugenolzemente stellen hierbei eine Ausnahme dar, denn hier liegt die Bildung von Zinkkomplexen der Abbindereaktion zugrunde. Die Haftwirkung bei dentalen Zementen kommt, anders als bei Befestigungskompositen, nicht über ein Verkleben des Zahnersatzes mit dem Pfeiler, sondern über eine Verkeilung der Zementkristalle im Zementspalt dazwischen zustande (Oilo und Jorgensen 1978).

Die Zemente dieser Studie sind Zinkoxidphosphatzemente. Bei diesen besteht die Flüssigkeit aus einer ca. 55 %-gepufferten Phosphorsäure, das Pulver aus bis zu 90 % Zinkoxid, wobei es mit bis zu 10 % Magnesiumoxid und anderen Zusätzen zur

Verbesserung der Materialeigenschaften modifiziert wird (Eickholz 1998; Pameijer 2012). Die vollständige, mehrstufige Abbindereaktion dauert mehrere Tage und lässt sich als Summenformel wie folgt darstellen (Kappert und Eichert 2008; Marxkors 2005):



Formel 1: Summenformel der Abbindereaktion von Zinkoxidphosphatzementen.

Die Materialeigenschaften hängen hierbei von der Verarbeitung ab und somit von Parametern wie Dauer des Anmischens, Temperatur und Pulver-Flüssigkeits-Verhältnis (Eickholz 1998; Marxkors 2005; Pawlig 2001; Windeler 1979). Bemerkenswert ist der beim Aushärten initial sehr niedrige pH-Wert von 3,5, welcher zu Irritationen der Pulpa führen kann (Kappert und Eichert 2008; Marxkors 2005).

2.2.8 Antimikrobielle Bestandteile

Die Bildung eines Biofilms auf dentalen Zementen findet unabhängig von der Art des Zementes statt (Winkler et al. 2014). Um dieser Bildung entgegenzuwirken, wurden verschiedene Versuche unternommen, dentalen Zementen und Werkstoffen antimikrobielle Eigenschaften durch entsprechende Additive zu verleihen (do Amaral et al. 2015; Farrugia und Camilleri 2015; Wang et al. 2014).

Die erste dokumentierte Anwendung von Kupfer zu antimikrobiellen Zwecken wie der Wunddesinfektion und Wasseraufbereitung geht bereits auf das zweite Jahrtausend vor Christus zurück (Dollwet und Sorenson 1985; Grass et al. 2011). Aktuelle Untersuchungen bestätigen die antimikrobiellen Eigenschaften von Kupfer in verschiedenen Anwendungs- und Forschungsbereichen (Ahmad et al. 2012; Faundez et al. 2004; Gosau et al. 2013; Gosau et al. 2016; Wilks et al. 2005; Wilks et al. 2006). Dieses gilt auch für die Anwendung im zahnmedizinischen Kontext wie z. B. die Beschichtung von Oberflächen dentaler Implantate, Lacke, Zemente oder von sich in flüssigem Milieu unter Kupferfreisetzung auflösenden Materialien (Foley und Blackwell 2003b; Neel et al. 2005; Prantl et al. 2010; Thneibat et al. 2008). Auch die Verwendung von kupferhaltigen Oberflächen bzw. Oberflächen aus reinem Kupfer zur Keimreduktion erfährt vor dem Hintergrund von Resistenzentwicklungen und nosokominalen Infektionen stärker werdende Aufmerksamkeit (Casey et al. 2010; Noyce et al. 2006).

Besonders bemerkenswert ist jedoch, dass die genauen antimikrobiellen Wirkungsmechanismen von Kupfer noch immer Gegenstand der Forschung sind und

verschiedene Komponenten eine Rolle zu spielen scheinen; d. h. die Schädigung oder Zerstörung der Zellmembran, oxidativer Stress, Schädigung des Erbgutes und Inaktivierung von Proteinen werden beleuchtet (Hong et al. 2012; Kachur et al. 1999; Quaranta et al. 2011; Warnes et al. 2012). Es zeigen sich jedoch grundsätzliche Mechanismen für eine hohe antimikrobielle Wirksamkeit der jeweiligen kupferhaltigen Materialien wie ein hoher Kupfergehalt, eine relativ hohe Temperatur und ein feuchtes Milieu (Elguindi et al. 2009; Michels et al. 2009; Wilks et al. 2005). Zusätzlich scheint das Vorhandensein von gelösten Kupferionen eine entscheidende Rolle für die antimikrobielle Wirksamkeit zu spielen (Molteni et al. 2010). In Abbildung 7 wird der Ablauf des *contact killings* von Mikroorganismen auf einer Kupferoberfläche schematisch dargestellt (Grass et al. 2011):

- A) Kupferionen lösen sich aus der Oberfläche und verursachen Zellschäden.
- B) Zellmembranschäden treten durch Kupfereinwirkung und andere Stressfaktoren auf, das Membranpotential geht verloren und Zytoplasma tritt aus.
- C) Kupferionen erzeugen reaktive Sauerstoffspezies („Sauerstoffradikale“), die weitere Schäden verursachen.
- D) Das Erbgut wird irreparabel geschädigt.

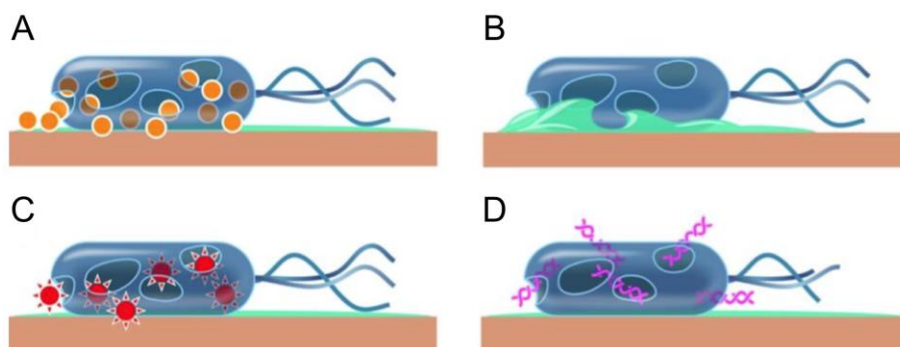


Abbildung 7: *contact killing*, schematischer Ablauf (Grass et al. 2011).

Neben Kupfer wurde eine breite Auswahl verschiedener Additive auf ihre antimikrobielle Wirksamkeit getestet (Besinis et al. 2014; Gosau et al. 2016; Jedrychowski et al. 1983; Leung et al. 2005; Morita et al. 2014). Tabelle 2 gibt einen Überblick über die häufigsten Additive in der Zahnmedizin sowie deren charakteristische Eigenschaften und Einsatzzwecke.

Tabelle 2: Additive und deren antimikrobielle Eigenschaften in der Zahnmedizin, modifiziert und erweitert nach Jakob (2012).

Additiv	Wirkung	Einsatzbereich	Referenzen
Aluminium	Hemmung von ATP-ase, synergistische Wirkung mit Fluoriden	Freisetzung aus Glasionomeren, geringe Bedeutung in der Zahnmedizin	Hayacibara et al. 2003; Nakajima et al. 1997; Sturr und Marquis 1990
Amine	Deutliche Senkung der Plaque-anlagerung, Einfluss auf die bakterielle Zellwand	Füllungszusätze und Bondingsysteme, stärkste Wirkungen bei Verwendung von Declamin und Dodeclamin	Bapna et al. 1988
Ammoniumchlorid	Deutliche antimikrobielle Eigenschaften gegen verschiedene Keime, Schädigung der bakteriellen Zellwand	Füllungszusatz	Kim und Jaewoo Shim 2001; Poole 2001; Thorsteinsson et al. 2003; Xiao et al. 2008
Antibiotika	Bakteriostatisch und bakteriozide Wirkungen, Einfluss auf Zellwandsynthese, Membraneigenschaften, DNA/RNA-Synthese, Proteinbiosynthese und Einflussnahme auf Metabolite	Systemische und topische Anwendung, Zusatz diverser Werkstoffe	Colton und Ehrlich 1953; Hori et al. 1997; Hoshino et al. 1989; Hoshino et al. 1988; Hull 1980; Kapoor et al. 2012; Kudou et al. 2000; Mjor 1977; Pinheiro et al. 2005; Wicht et al. 2004
Benzalkoniumchlorid	Wirksam gegen <i>S. mutans</i> und <i>S. sobrinus</i> , reichert sich in den Zellwänden von Bakterien an und verursacht dort Schäden	Zusatz für Komposite im kieferorthopädischen Bereich	Othman et al. 2002; Saito et al. 2007; Sehgal et al. 2007
Bioaktives Glas	Wirksam gegen multiple Keime, u. a. durch Schaffen eines basischen Milieus	Zusatz diverser Werkstoffe, insbesondere Füllungsmaterialien	Allan et al. 2001; Galarraga-Vinueza et al. 2016; Munukka et al. 2008; Yli-Urpo et al. 2003
Bismut	Wirksam gegen <i>C. albicans</i> , <i>S. mutans</i> und andere Keime wie z. B. Staphylokokken, Wirkmechanismus nicht vollständig geklärt	Zusatz diverser Werkstoffe	Domenico et al. 2001; Gosau et al. 2016; Halwani et al. 2009; Hernandez-Delgado et al. 2013

Cetylpiridiniumchlorid	Einfluss auf Zellwandeigenschaften und Stoffwechsel der Bakterien, Reduzierung der Plaquebildung	Mundspüllösungen, aber auch Zusatz zu Kompositen	Albert-Kiszely et al. 2007; Ehara et al. 2000; Moran et al. 1994; Quirynen et al. 2005; Renton-Harper et al. 1996; Stookey et al. 2005; Witt et al. 2005
Chlorhexidin	Dosisabhängig bakterio- statisch oder bakterio- zid durch Beeinträchtigung der bakteriellen Zellwand und zytosolischer Proteine	Zusatz zu diversen Werkstoffen, Lacken, Mundspülungen	Addy et al. 1974; Balanyk und Sandham 1985; Botelho 2003, 2005; Emilson 1994; Frencken et al. 2007; Goho und Aaron 1992; Gosau et al. 2010a; Hoszek et al. 1998; Imazato et al. 1994; Jedrychowski et al. 1983; Joharji und Adenubi 2001; Leung et al. 1980; Ogaard et al. 2001; Petersson et al. 1992; Pienihakkinen et al. 1995; Ribeiro und Ericson 1991; Sanders et al. 2002; Sandham et al. 1988; Schaeken et al. 1989; Takahashi et al. 2006; Turkun et al. 2008; Wicht et al. 2003; Wicht et al. 2004
Fluoride	Einfluss auf den bakteriellen Stoffwechsel, u. a. F-ATPase, gut erforschte und signifikante antibakterielle Eigenschaften, kariesprotektiv	Zusatz zu diversen Werkstoffen, Freisetzung aus Glasionomeren, Lacken, Mundspülungen	Bapna et al. 1988; Benelli et al. 1993; DeSchepper et al. 1989; Eli et al. 1995; Foley und Blackwell 2003a; Forsten 1991a, 1991b; Friedl et al. 1997; Hamilton 1990; Klement und Siebert 1985; Kreulen et al. 1997; Mangi et al. 1959; Marquis 1995; McComb et al. 2002; McComb und Ericson 1987; Meryon und Johnson 1989; Mitra 1991; Nourollahi und Meryon 1989; Prati et al. 1993; Scherer et al. 1989; Scherer et al. 1990a; Schmalz 1977; Schmalz et al. 2004; Seppa et al. 1993; Seppa et al. 1995; Shay et al. 1956; Strickland et al. 1990; Weerheijm et al. 1999; Wiegand et al. 2007; Yoshinari et al. 2001
Glutaraldehyd	Reaktion mit Aminogruppen von Proteinen, Quervernetzung von Proteinen, bakterio- zid	Zusatz zu Bondingsystemen	Dijkman et al. 1992; Eliades et al. 1985; Felton et al. 1989; Fraga et al. 1996; Meiers und Miller 1996; Munksgaard und Asmussen 1984; Scherer et al. 1990b; Walter et al. 2007

Kalziumhydroxid	Stark basisch, hierdurch Membran-, Protein- und Erbgutschädigung an bakteriellen Zellen	Unterfüllungsmaterialien, Wurzelkanaleinlagen	Behnen et al. 2001; Bossmann et al. 1984; Eli et al. 1995; Fisher 1972; Fisher und McCabe 1978; Freeman und Crapo 1982; Kouassi et al. 2003; Lado et al. 1986; Leung et al. 1980; Mayer et al. 1988; Meeker et al. 1990; Meeker et al. 1986; Mjor 1977; Staehle et al. 1989; Tobias et al. 1988
Kupfer	<i>Contact killing</i> , Schädigung der Zellmembran und später Erbgutschäden	Zusatz zu diversen Werkstoffen, insbesondere Amalgame und Zemente, auch Kunststoffe	Bundy et al. 1980; Foley und Blackwell 2003a, 2003b; Gama-Teixeira et al. 2007; Glassman und Miller 1984; Gosau et al. 2010b; Klaunick 1970; Mc et al. 1951; Morrier et al. 1989; Morrier et al. 1998; Neel et al. 2005; Netuschil et al. 1996; Nunez et al. 1976a; Nunez et al. 1976b; Orstavik 1985; Prantl et al. 2010; Schmalz und Rotgans 1977; Shay et al. 1956; Svanberg et al. 1990; Svanberg et al. 1990b; Thneibat et al. 2008; Tobias et al. 1988; Updegraff et al. 1971; Wallman-Bjorklund et al. 1987
Silber	Nur moderate antimikrobielle Wirkung, wird in Zellen aufgenommen und bindet unter Beeinträchtigung von deren Funktion an intrazelluläre Enzyme, abhängig von Freisetzung der Silberionen	Zusatz diverser Werkstoffe, vornehmlich Zemente und Komposite	Bapna et al. 1988; Boning 1988; Burgers et al. 2009b; Gama-Teixeira et al. 2007; Hotta et al. 1998; Jia et al. 2008; Kawahara et al. 2000; Kawashita et al. 2000; Klaunick 1970; Ohashi et al. 2004; Orstavik 1985; Schmalz 1987; Stipetic et al. 1998; Svanberg et al. 1990a; Syafiuddin et al. 1997; Yamamoto et al. 1996; Yoshida et al. 1999
Tricolosan	Weites Wirkungsspektrum, Eingriff in die bakterielle Lipidsynthese	Füllungszusatz, Lack	Ergucu et al. 2005; Heath und Rock 2000; Imazato et al. 1995; RD Jones et al. 2000; McMurry et al. 1998; Wicht et al. 2005; Wicht et al. 2003

Zinkoxid-eugenol	Gute Wirksamkeit gegen multiple Keime, antimikrobielle Wirksamkeit nimmt jedoch relativ zügig ab, Zink kann auf einzelne Bakterienspezies wachstumsfördernd wirken, Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies und direkte Zellwandschäden	Unterfüllungen, Zemente, Lacke, provisorische Füllungen	Bergenholtz et al. 1982; Boeckh et al. 2002; Bossmann et al. 1984; Coogan und Creaven 1993; Lado et al. 1986; Lai et al. 2001; Leidal und Eriksen 1979; Mayer et al. 1988; Meeker et al. 1990; Meryon und Johnson 1989; Mickel und Wright 1999; Mjor 1977; Savioli et al. 2006; Schmalz 1987; Schwartzman et al. 1980; Tobias et al. 1985
Zinkhaltige Stoffe	Antimikrobielle Wirkung bei verschiedenen Anwendungen, Wirkung nimmt mit der Zeit ab, Wirkung abhängig von freigesetzten Ionen, Zink kann auf einzelne Bakterienspezies wachstumsfördernd wirken, Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies und direkte Zellwandschäden	Zemente, Füllungszusatz, Amalgame	Colton und Ehrlich 1953; Duque et al. 2005; Fang et al. 2006; Foley und Blackwell 2003a; Gama-Teixeira et al. 2007; Hotta et al. 1998; Jia et al. 2008; Jones et al. 2008; Meryon und Johnson 1989; Morrier et al. 1998; Nourollahi und Meryon 1989; Osinaga et al. 2003; Scherer et al. 1989; Syafiuddin et al. 1997; Tobias et al. 1988
Zinn	Gute Hemmwirkung als Mundspülung- oder Zahnpastazusatz, Synergie mit Fluoriden, dann Auswirkungen auf Enzymfunktionen der Bakterien	Vornehmlich Mundspülungen und Zahnpasten, auch Füllungsmaterialien und Amalgame	Attramadal und Svatun 1984; Ferretti et al. 1982; Morrier et al. 1989; Morrier et al. 1998; Oppermann et al. 1980; Orstavik 1985; Skjorland et al. 1978; Svatun und Attramadal 1978; Tinanoff et al. 1986
MDPB (Methacrylyl oxydodecylpyridinbromid)	Antimikrobiell wirksam, Einfluss auf Plaqueanheftung und Glukansynthese, Wirkung nimmt im Zeitverlauf ab, Schädigung von Zellmembranen durch Pyridinium-Anteil	Zusatz diverser Werkstoffe, u. a. Kunststoffe und Primer	Ebi et al. 2001; Feuerstein et al. 2007; Imazato et al. 1999; Imazato et al. 1997; Imazato und McCabe 1994; Imazato et al. 2007; Kitasako et al. 2004; Lobo et al. 2005; Mjor und Tronstad 1972; Ozer et al. 2003; Schmalz et al. 2004; Tzifas et al. 2007; Vaidyanathan et al. 2009; Yoshikawa et al. 2007

2.2.9 Zytotoxizität dentaler Werkstoffe

Antimikrobielle Wirksamkeit und Zytotoxizität stehen oft in direktem Verhältnis zueinander (Klaiber et al. 1982).

Die potentiell schädlichen Wirkungen gehen hierbei in der Regel von gelösten Bestandteilen des entsprechenden Materials aus, wobei die Wirkung im Laufe der Zeit meist nachlässt (Bouillaguet et al. 2002; Milheiro et al. 2016; Polydorou et al. 2009; Schmalz et al. 1997; Tanaka et al. 1991; Wataha et al. 1999). Die Folgen reichen von Allergien und Reizungen der lokalen Gewebe bis hin zu systemischen Manifestationen (Bakula et al. 2011; Hosoki et al. 2009; Raap et al. 2012; Syed et al. 2015). Der weit überwiegende Anteil beschriebener Unverträglichkeitsreaktionen geht hierbei auf Metalle bzw. Metalllegierungen zurück (Milheiro et al. 2016b; Syed et al. 2015). Insbesondere das für die vorliegende Studie relevante Kupfer kann in der Form von Kupferionen Zellschäden verursachen, wobei die Quelle der Freisetzung, z. B. aus Stoffgemengen, Legierungen und Reinmetall, eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint (al-Hiyasat et al. 2002; Hornez et al. 2002; Meng et al. 2009).

Die Quecksilberlegierung Amalgam nimmt durch eine öffentlich geführte Diskussion und seine weite Verbreitung eine gewisse prominente Sonderrolle unter den Legierungen ein (Rathore et al. 2012). Neben einer belegten lokalen Zytotoxizität und dem Risiko für allergische Reaktionen wird eine systemische Toxizität diskutiert, die jedoch bisher nicht belegt werden konnte und die Menge an freigesetztem Quecksilber einschlägige Richtwerte wie z. B. die der Weltgesundheitsorganisation WHO bei weitem nicht erreicht (Berglund 1990; Brownawell et al. 2005; Fardal et al. 2005; Rathore et al. 2012; Roberts und Charlton 2009; Zogheib et al. 2008).

Auch die in der Zahnmedizin zur Anwendung kommenden Zemente zeigen teilweise deutliche zytotoxische Wirkungen (Bakopoulou et al. 2009; Franz et al. 2006; Winkler et al. 2014). Insbesondere Zinkoxidphosphatzemente weisen eine hohe Zytotoxizität auf (Franz et al. 2006; Mahasti et al. 2011; Schweikl und Schmalz 1996; Winkler et al. 2014). Eine Ursache hierfür kann in der sauren Abbindereaktion des Zementes und dem damit verbundenen Abfall des pH-Wertes der umgebenden Bereiche sowie der Freisetzung relativ hoher Mengen von Zink liegen (Leirskar und Helgeland 1977). Ähnliche zytotoxische Effekte waren auch bei kunststoffbasierten Zementen zu beobachten (Arslan Malkoc et al. 2015; da Fonseca Roberti Garcia et al. 2016; Mahasti et al. 2011; Pontes et al. 2014).

Weiterhin wurden zytotoxische Effekte von unterschiedlichen Füllungskunststoffen auf pulpale und gingivale Zellen beobachtet (Sisman et al. 2016; Tadin et al. 2014; Xia et al. 1990; Yalcin et al. 2015). Auch die für die Versorgung mit Kompositen notwendigen Adhäsive und Bondings haben potentiell schädliche Einflüsse auf die Zellen der Pulpa (Chen et al. 2003; Goldberg 2008; Sengun et al. 2011; Yasuda et al. 2008). Eine mögliche Ursache für die Zytotoxizität von Kunststoffen kann die Freisetzung von Materialbestandteilen wie Bisphenol-A-(di)-methacrylat (BisGMA), 2-hydroxyethyl-methacrylat (HEMA) und Triethylen-glycol-dimethacrylat (TEGDMA) sein (Altintas und Usumez 2008; Botsali et al. 2014; Goldberg 2008; Kerezoudi et al. 2016; Kloukos et al. 2013; Rathbun et al. 1991; Tabatabaei et al. 2011; Van Landuyt et al. 2011). In Tabelle 3 sind die häufigsten dentalen Werkstoffe mit Einsatzbereichen und charakteristischen Wirkungen zusammengefasst.

Tabelle 3: Zytotoxische Eigenschaften dentaler Werkstoffe.

Werkstoff	Effekt	Einsatzbereich	Referenzen
Metalle und Legierungen	Zytotoxische Effekte und Irritationen in den benachbarten Geweben, allergische Reaktionen	Kronen, Brücken, Prothesen, Inlays	Hosoki et al. 2009; Milheiro et al. 2016; Raap et al. 2012; Schmalz et al. 1997; Syed et al. 2015; Wataha 2000; Wataha et al. 1999
Amalgam	Zytotoxische Effekte und Irritationen in den benachbarten Geweben, allergische Reaktionen, Amalgam-Tätowierungen, Reaktionen der Pulpa, Erhöhung der Quecksilberaufnahme	Füllungen	Berglund 1990; Cheaib et al. 2015; Fardal et al. 2005; Rathore et al. 2012; Roberts und Charlton 2009; Wessel et al. 2014; Zogheib et al. 2008
Kunststoffe, Komposite und zugehörige Adhäsive sowie Bondings	Zytotoxische Effekte und Irritationen in den benachbarten Geweben, allergische Reaktionen, Reaktionen der Pulpa	Verblendungen, Füllungen, Reparaturen von dentalen Restaurationen, Prothesen	Altintas und Usumez 2008; Botsali et al. 2014; Chen et al. 2003; Goldberg 2008; Kerezoudi et al. 2016; Pontes et al. 2014; Rathbun et al. 1991; Sengun et al. 2011; Sisman et al. 2016; Tadin et al. 2014; Van Landuyt et al. 2011; Yasuda et al. 2008; Zogheib et al. 2008
Zemente (konventionell und kunststoffbasiert)	Zytotoxische Effekte und Irritationen in den benachbarten Geweben, allergische Reaktionen	Zementierungen von Kronen und Brücken auf Zähnen und Implantaten, Befestigungen von Wurzelstiften in devitalen Zähnen	Altintas und Usumez 2008; Arslan Malkoc et al. 2015; Botsali et al. 2014; da Fonseca et al. 2016; Franz et al. 2006; Goldberg 2008; Kerezoudi et al. 2016; Leirskar und Helgeland 1977; Mahasti et al. 2011; Pontes et al. 2014; Tabatabaei et al. 2011; Tadin et al. 2014; Winkler et al. 2014

2.2.10 Physiko-chemische Einflüsse auf bakterielle Adhäsion

Die irreversible Adhäsion von Mikroorganismen auf Oberflächen ist eine Voraussetzung für die Biofilmbildung (Marsh und Bradshaw 1995). Faktoren wie das Zeta-Potential als Maß für das elektrische Potential von Partikeln in einer Suspension, hydrodynamische Scherkräfte, die in bewegten Flüssigkeiten auftreten, sowie Temperatur und pH-Wert haben Einfluss hierauf (Busscher et al. 1989; Cowan et al. 1992; Ollos et al. 2003). Zwei Parameter, die Rauheit der Oberfläche und die freie Oberflächenenergie (*surface free energy*, SFE), beeinflussen hierbei die Biofilmbildung maßgeblich (Ahn et al. 2009; Quirynen 1994).

2.2.11 Freie Oberflächenenergie (SFE, *surface free energy*)

Die Oberflächenenergie wird basierend auf SI-Einheiten in J/m^2 oder in Nm/m^2 angegeben. Sie bezeichnet die Grenzflächenspannung an den Grenzflächen von zwei Stoffen beliebiger Phase und kann bei Flüssigkeiten mit der Oberflächenspannung gleichgesetzt werden. Die zur Messung der SFE auf den Oberflächen von Werkstoffen oft verwendete Methode ist die Kontaktwinkelmessung, auch *sessile drop* – Methode („ruhender Tropfen“) mit unterschiedlichen Messflüssigkeiten (Busscher et al. 1984). Bei Anwendung der Methode nach Owens, Wendt, Rabel und Kaelble (OWRK) werden nur zwei verschiedene Flüssigkeiten benötigt, eine polare und eine apolare (Kaelble 1970; Owens und Wendt 1969; Rabel 1971). Basierend auf der Youngschen Gleichung wird bei der Kontaktwinkelmessung der Winkel zwischen der Materialoberfläche und einem auf die Oberfläche abgesetzten Tropfen der Versuchsflüssigkeit ermittelt (siehe Abbildung 8).

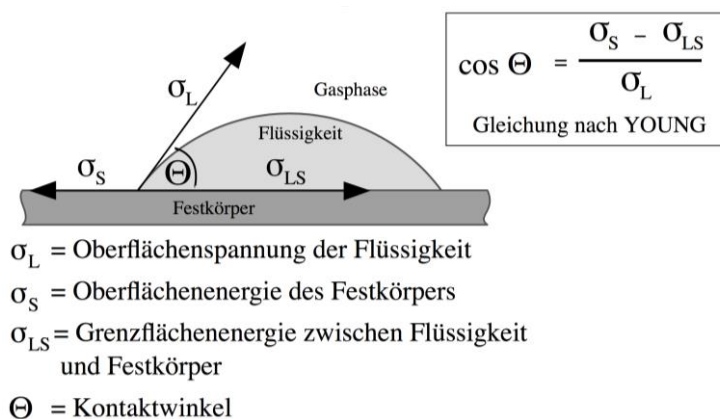


Abbildung 8: Kontaktwinkel eines liegenden Tropfens (Krüss 2010).

Da die Eigenschaften der beiden eingesetzten Versuchsflüssigkeiten bekannt sind, kann die SFE des Materials mit Hilfe der entsprechenden Formel nach OWRK (siehe Formel 2) berechnet werden. Hierbei steht σ_{sl} für die gesuchte Grenzflächenspannung zwischen Festkörper und Flüssigkeit, σ_s für die freie Oberflächenenergie des Festkörpers, σ_l für die Grenzflächenspannung der Flüssigkeit, σ^D für den dispersiven Anteil (mit entsprechendem Subskript „s“ für Festkörper und „l“ für Flüssigkeit) und σ^P für den polaren Anteil (ebenfalls mit den Subskripten „s“ für Festkörper und „l“ für Flüssigkeit).

$$\sigma_{sl} = \sigma_s + \sigma_l - 2 \left(\sqrt{\sigma_s^D \times \sigma_l^D} + \sqrt{\sigma_s^P \times \sigma_l^P} \right)$$

Formel 2: Berechnung der SFE nach OWENS, WENDT, RABEL und KAEUBLE.

Es existiert eine Wechselwirkung zwischen der SFE und der Hydrophobizität einer Oberfläche dahingehend, dass die Hydrophobizität steigt, wenn die SFE sinkt und umgekehrt (van Loosdrecht et al. 1987). Da an hydrophilen Oberflächen bevorzugt Wasser angelagert wird und die Adhäsion von Proteinen in der Folge geringer ausfällt, wird an hydrophoben Oberflächen eine verstärkte Proteinadhäsion beobachtet (Lindh 2002). Die Bindung von Proteinen auf Oberflächen in der Mundhöhle kann eine zuvor niedrige SFE erhöhen und umgekehrt eine hohe SFE verringern (Vandijk et al. 1987).

Bei Betrachtung der von Absolom 1983 aufgestellten Formel für freie Energie der bakteriellen Adhäsion (ΔG_{adh} , siehe Formel 3) wird deutlich, dass diese von den freien Verbindungsenergien von Substrat/Bakterium (σ_{sb}), Substrat/Flüssigkeit (σ_{sl}) und Bakterium/Flüssigkeit (σ_{bl}) abhängig ist.

$$\Delta G_{adh} = \sigma_{sb} - \sigma_{sl} - \sigma_{bl}$$

Formel 3: Gibbsche Energie der Adhäsion (ΔG_{adh}) nach ABSOLOM.

Bei der theoretischen Berechnung der freien Energie der Adhäsion ΔG_{adh} wird deutlich (siehe Abbildung 9), dass diese im Falle von $\Delta G_{adh} < 0$ begünstigt wird (Quiryneen und Bollen 1995). Weiterhin kann abgeleitet werden, dass für ein Bakterium, welches sich in einem Medium mit einer, verglichen mit der eigenen, niedrigeren Oberflächenspannung befindet ($\sigma_{lv} < \sigma_{bv}$, rote Linie), eine Adhäsion auf einem Substrat erst bei einer deutlich hydrophilen Charakteristik des Substrates begünstigt wird. Umgekehrt gilt für ein Bakterium in einem Medium mit einer relativ betrachtet höheren Oberflächenspannung ($\sigma_{lv} > \sigma_{bv}$, gepunktete Linie), dass eine

Adhäsion auf Substraten mit hydrophoben Eigenschaften begünstigt wird, nicht aber auf solchen, die als hydrophil eingestuft werden können.

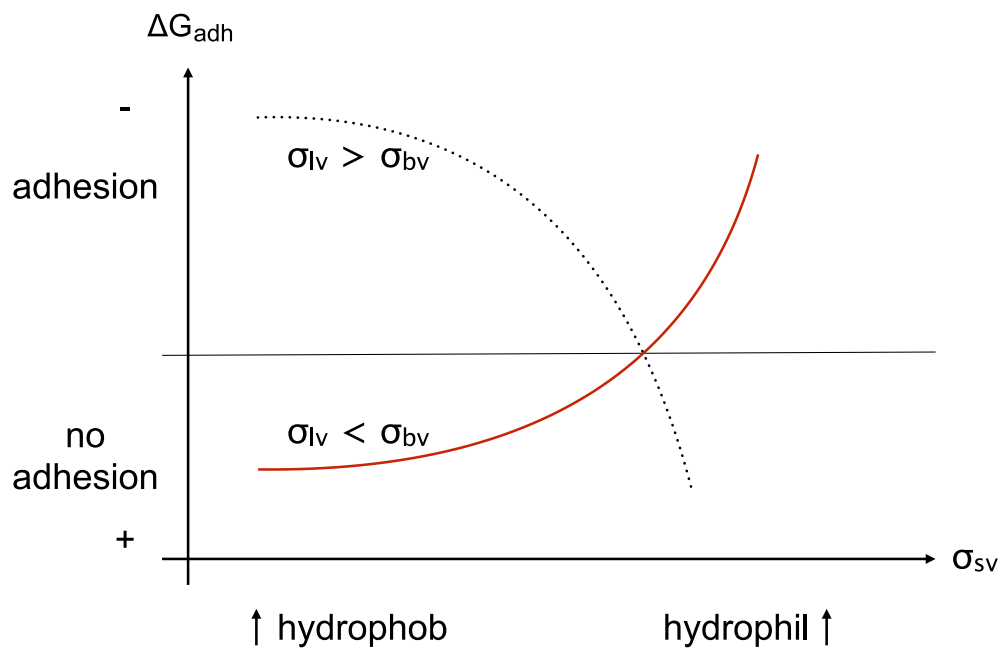


Abbildung 9: Theoretische Berechnung der Adhäsion ΔG_{adh} adaptiert nach QUIRYNEN und BOLLEN (σ_{lv} = Oberflächenspannung der Flüssigkeit – entspricht der freien Oberflächenenergie, σ_{bv} = freie Oberflächenenergie des Bakteriums, σ_{sv} = freie Oberflächenenergie des Substrates).

Diese Faktoren machen den Zusammenhang und die Wechselwirkungen von bakterieller Adhäsion und Hydrophobizität, Hydrophilie sowie SFE der Oberflächen von Bakterien, Proteinen und Werkstoffen deutlich (Ferreiros et al. 1989; Hannig und Hannig 2009; Hauser-Gerspach et al. 2007; Teughels et al. 2006).

2.2.12 Rauheit

Einen weiteren bedeutenden Einfluss auf die Adhäsion von Bakterien auf Substraten hat die Rauheit von intraoralen Oberflächen (Yeo et al. 2012). Insbesondere Unregelmäßigkeiten auf Oberflächen stellen Bereiche initialer mikrobieller Adhäsion dar, von denen aus die weitere Besiedelung stattfindet (Lie 1977, 1978, 1979; Nyvad und Fejerskov 1987).

Allgemein betrachtet werden mit Rauheit Unebenheiten einer Werkstoffoberfläche bezeichnet (Trautwein 2014). Nach der DIN 4760:1982 (Deutsches Institut für Normung e.V.) werden Gestaltabweichungen von Werkstoffoberflächen, also Abweichungen von einer idealen Oberflächenbeschaffenheit, in sechs Ordnungen

unterschieden; hierbei findet sich Rauheit in den Ordnungen 3 und 4 u. a. in Form von Rillen und Riefen wieder (siehe Abbildung 10).

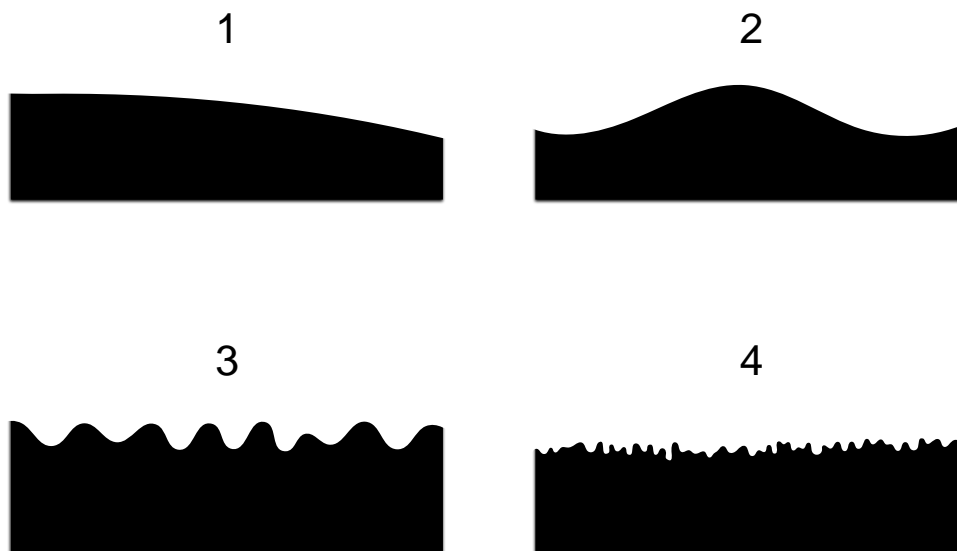


Abbildung 10: Gestaltabweichungen 1-4 nach DIN 4760:1982, Grade 5 und 6 nicht in gleicher Form anschaulich darstellbar (Bezug zur Gefüge- und Gitterstruktur eines Werkstoffes).

Zur Beschreibung der Rauheit dentaler Werkstoffe wird meist das arithmetische Mittel der Rauheit R_a in der Einheit μm angegeben (Gadelmawla et al. 2002; Kappert und Eichert 2008; Quirynen und Bollen 1995). Nach der DIN EN ISO 4287:2010 stellt R_a das arithmetische Mittel der Beträge der Ordinatenwerte des gemessenen Profils der Rauheit innerhalb der gemessenen Einzelmessstrecke dar (siehe Abbildung 11); oder, anders formuliert, es entspricht R_a dem arithmetischen Mittel der Abweichung einer konstruierten Mittellinie mit beidseitig gleicher Materialverteilung durch eine Werkstoffoberfläche (Deutsches Institut für Normung e.V.).

Als Oberflächenmesstechnik zur Ermittlung der Rauheit kommt u. a. die 2D-Profilometrie bzw. Tastschnittmessung zum Einsatz und gilt als suffizient (Kocher et al. 2002). Hierbei wird das Oberflächenprofil von einer Diamantspitze abgetastet, durch einen elektromechanischen Wandler in ein Signal überführt und an einen Computer zur Auswertung übermittelt (Sander 1991).

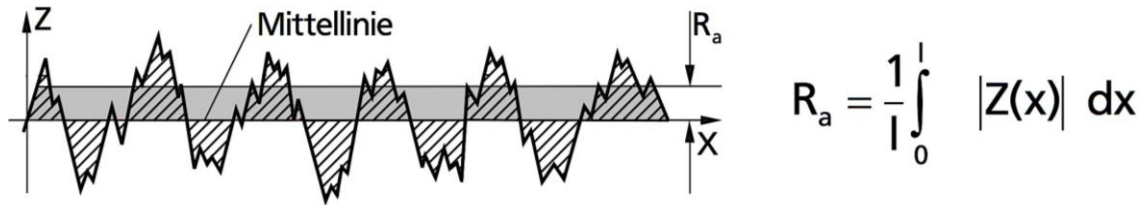


Abbildung 11: Arithmetisches Mittel der Rauheit, grafische Darstellung und Formel (R_a), sowie $Z(x)$ Profilwerte des Rauheitsprofils (Mahr 2014).

Das initiale bakterielle Wachstum findet nicht nur auf Unregelmäßigkeiten von Oberflächen statt, sondern zeichnet sich hier auch durch einen schnelleren Übergang von reversibler zu irreversibler Adhäsion sowie eine generell höhere Akkumulation von Mikroorganismen aus (Hannig 1999; Quirynen und Bollen 1995; Quirynen et al. 1990; Taylor et al. 1998). Gezielte Untersuchungen bestätigten die stärkere Adhäsion von Bakterien auf rauen Oberflächen dentaler Werkstoffe, verglichen mit besser polierten Kontrollen (Einwag et al. 1990; Kawai und Urano 2001). Hierbei zeigte sich eine mittlere Rauheit R_a von $0,2 \mu\text{m}$ als Grenze, unterhalb derer eine weitere Reduktion der Rauheit auf Titan anscheinend keinen maßgeblichen Einfluss mehr auf die Adhäsion hat (Bollen et al. 1997).

Zusammenfassend scheint eine Rauheit über einem R_a von $0,2 \mu\text{m}$ in vielfältigen Studien einen größeren Einfluss auf die bakterielle Adhäsion zu haben, als die freie Oberflächenenergie, wobei Unterschiede zwischen Werkstoffgruppen ersichtlich werden; eine abschließende Bewertung der Zusammenhänge steht daher derzeit noch aus (Burgers et al. 2010a; Burgers et al. 2010b; Grossner-Schreiber et al. 2001; Quirynen et al. 1990; Teughels et al. 2006).

2.3 Biochemische Grundlagen der angewandten Testverfahren

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten, biochemischen Testverfahren, sogenannte Assays, nutzen Eigenschaften lebender Zellen, um diese indirekt durch von ihnen verursachte Veränderungen in Reagenzien nachzuweisen bzw. deren Aktivität messen zu können (Wink et al. 2011). Der Einsatz indirekter Nachweismethoden ist neben dem direkten Nachweis durch Bildgebung, gegebenenfalls nach entsprechender Färbung, gängige mikrobiologische Praxis (Shintani et al. 2011).

2.3.1 Tetrazolium / WST-Assays

Zur Messung der Zellviabilität und Zytotoxizität von Stoffen gelten auf Tetrazoliumchlorid (alternativ Tetrazolim, TTC oder 2,3,4-Triphenyltetrazoliumchlorid) basierende Assays als etablierte und zuverlässige Methoden (Riss et al. 2004). Das zugrundeliegende Prinzip ist die Umwandlung farbloser Edukte durch das Redoxpotential an der Membran lebender Zellen in farbige Produkte (Berridge et al. 2005). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Assays basierten auf wasserlöslichen Tetrazolium „WST – *water soluble tetrazolium*“ und enthielten mit WST-1 und WST-8 zwei Tetrazoliumchlorid-Derivate (siehe Abbildung 12).

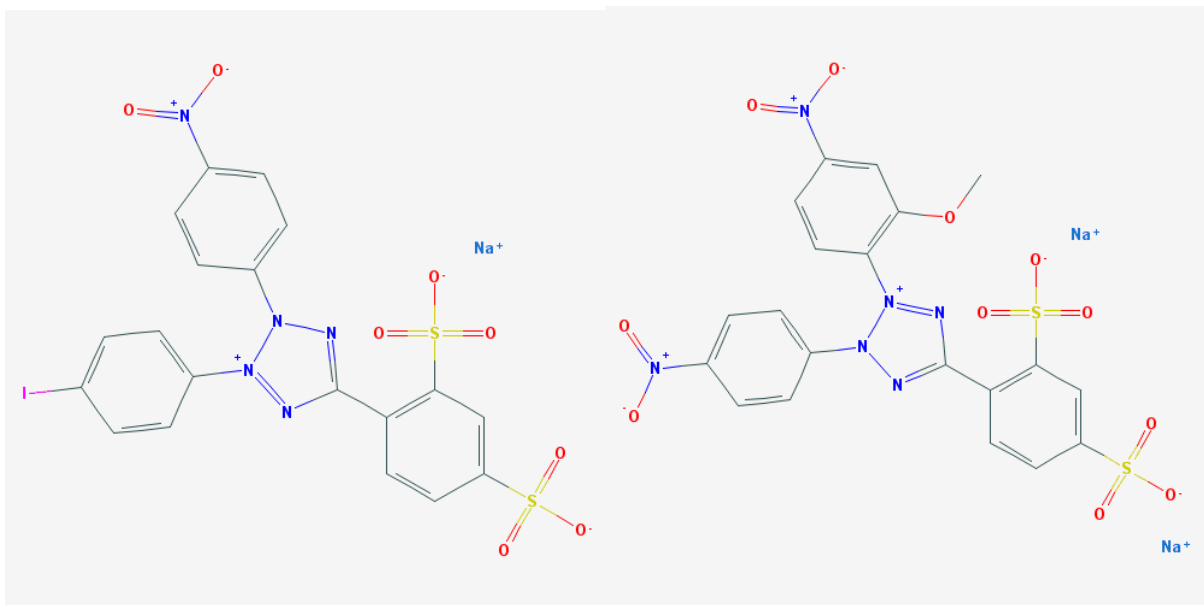


Abbildung 12: WST-1 und WST-8 (National Center for Biotechnology Information 2015a, 2015b).

Hierbei findet durch auf der Zellaußenseite lokalisiertes reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) eine Reduktion des eingesetzten WST zum Formazan des WST statt (siehe Abbildung 13).

Da das Formazan eine deutliche Färbung hat, ist dessen Konzentration durch die optische Dichte (O.D.) bei 450-570 nm (in Abhängigkeit vom eingesetzten WST) photometrisch zu bestimmen (Ishiyama et al. 1997; Riss et al. 2004). Bei einer großen Anzahl stoffwechselaktiver Zellen fällt der Farbumschlag der WST-enthaltenden Messlösung stärker aus als bei einer geringeren Anzahl an aktiven Zellen (Tominaga et al. 1999).

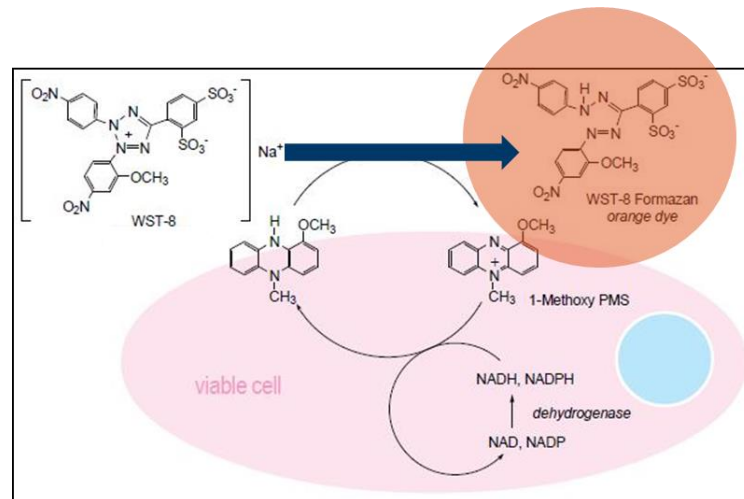


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Umwandlung von WST-8 in WST-8-Formazan (Dojindo Molecular Technologies 2016)

2.3.2 Resazurin-Assays

Als weitere etablierte und weit verbreitete Assays zur Bestimmung von Zellviabilität oder Zytotoxizität von z. B. Werkstoffen können Resazurin-Assays betrachtet werden (Riss et al. 2004; Twigg 1945). Das Grundprinzip dieses Assays basiert ebenfalls auf der Wechselwirkung mit NADH lebender Zellen (Riss et al. 2004). Durch die Wechselwirkung wird das blaue Resazurin reduziert und irreversibel in das pink-violette fluoreszierende Resorufin umgewandelt (siehe Abbildung 14) (Al-Nasiry et al. 2007). Die Menge an reduziertem Resazurin steht somit im Verhältnis zur Anzahl der lebenden, stoffwechselaktiven Zellen (O'Brien und Pognan 2001). Die Messung des Resorufins erfolgt z. B. automatisch im Plattenreader bei Anregungswellenlängen um 560 nm und Messwellenlängen von 590 nm (Riss et al. 2004; Van den Driessche et al. 2014).

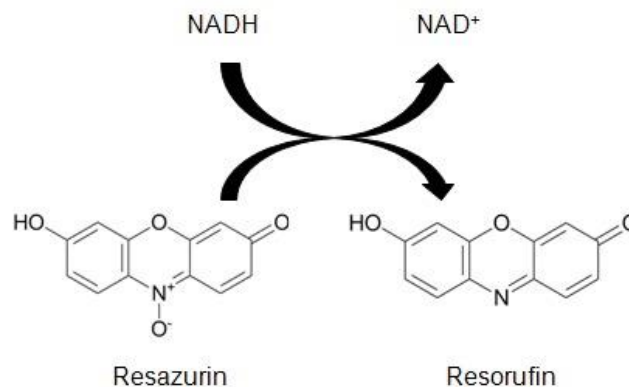


Abbildung 14: Struktur und Reduktion von Resazurin und Resorufin (Riss et al. 2004).

2.3.3 ATP-Biolumineszenz-Assays

Eine weitere Methode zum indirekten Nachweis von Zellen basiert auf dem von vitalen Zellen gebildeten intrazellulären Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) und dem Phänomen der Biolumineszenz (Shintani et al. 2011). Biolumineszenz beschreibt (meist) die Reaktion von Enzymen aus der Gruppe der Luciferasen mit ATP, bei der ADP (Adenosindiphosphat) und sichtbares Licht erzeugt wird (siehe Abbildung 15) (Marques und Esteves da Silva 2009). Die Menge und der Zustand der zu untersuchenden Zellen korreliert mit der Menge an intrazellulärem ATP; ein ATP-Biolumineszenz-Assay ist somit dazu geeignet, zytotoxische Effekte, Zellproliferation oder Zellmengen zu messen (Crouch et al. 1993; Sanchez et al. 2013; Shintani et al. 2011; Yang et al. 2015).

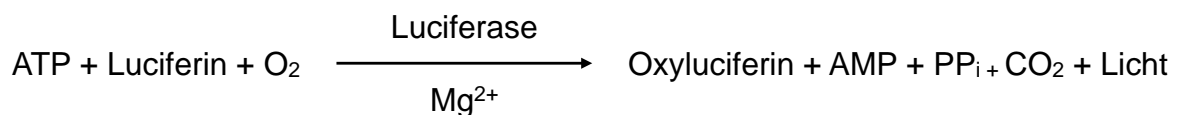


Abbildung 15: Reaktionsschema des ATP-Assays zur Biolumineszenz.

Das emittierte Licht wird schließlich mit einem geeigneten Messinstrument, z. B. einem Plattenreader, aufgefangen und hinsichtlich der Intensität ausgewertet (Roda et al. 2004). Da für das ATP-Assay die Zellen für die Freisetzung des ATPs lysiert werden müssen, sind zwar keine zweizeitigen Messungen möglich - jedoch ist die Sensitivität des Assays bei gleichzeitig schneller und vergleichsweise robuster Anwendbarkeit in der Regel günstiger zu bewerten als bei den meisten anderen kommerziell verfügbaren Assays (Riss et al. 2004; Roda und Guardigli 2012; Stanley 1989).

3. Fragestellung

Ziel der vorliegenden In-vitro-Untersuchung war es, die biologischen Wirkungen eines konventionellen Zinkoxidphosphatzements und eines kupferhaltigen Zinkoxidphosphatzements miteinander zu vergleichen. Hierzu wurden entsprechende Probekörper beider Testmaterialien hergestellt, poliert und zur Hälfte durch Wasserlagerung künstlich gealtert. Im Anschluss wurden die physiko-chemischen Eigenschaften (Rauheit, Oberflächenenergie) der Probekörper bestimmt. Die Probekörper wurden mit zwei Testkeimen, *Streptococcus sanguinis* und *Candida albicans*, inkubiert und die Menge der adhärenen Keime über Biolumineszenz bzw. Fluoreszenz bestimmt. Exemplarisch wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberflächen angefertigt. Zusätzlich wurde eine mögliche zytotoxische Wirkung auf Mausfibroblasten und humane Gingivafibroblasten mittels WST-1-Test, WST-8-Test und Lichtmikroskop evaluiert. Die abschließende Messung der Kupferfreisetzung durch Elektronenspektroskopie sollte mögliche biologische Effekte erklären.

Im Rahmen der vorliegenden Studie sollten folgende Hypothesen überprüft werden:

1. Der kupferhaltige Zinkoxidphosphatzement hat ein niedrigeres Potential zur Anlagerung von *Streptococcus sanguinis* und *Candida albicans* als der kupferfreie Zinkoxidphosphatzement.
2. Der kupferhaltige Zinkoxidphosphatzement hat ein höheres zytotoxisches Potential auf Mausfibroblasten und humane Gingivafibroblasten als der kupferfreie Zinkoxidphosphatzement.
3. Der kupferhaltige Zinkoxidphosphatzement zeigt eine relevante Kupferfreisetzung über einen längeren Zeitraum.

4. Material und Methode

4.1 Versuchsüberblick

Zur Einführung und als Überblick ist in Tabelle 4 der experimentelle Ablauf der vorliegenden Studie dargestellt. Weiterhin zeigt Tabelle 27 im Anhang eine Auflistung aller verwendeten Geräte und Chemikalien.

Tabelle 4: Übersicht und Ablauf.

1.	Herstellung der Probekörper, Politur, Lagerung bzw. künstliche Alterung
2.	Rauheitsmessung
3.	Kontaktwinkelmessung und Berechnung der freien Oberflächenenergie
4.	Untersuchung der Oberflächenbesiedlung durch <i>Candida albicans</i> (DSMZ Nr. 1386) mittels Lumineszenzmessung (ATP-Pro)
5.	Untersuchung der Oberflächenbesiedlung durch <i>Streptococcus sanguinis</i> (DSMZ Nr. 20068) mittels Fluoreszenzmessung (Resazurin)
6.	Untersuchung der Zellviabilität auf den Substraten mittels WST-1 und WST-8 an Mausfibroblasten (L929)
7.	Untersuchung der Zellviabilität auf den Substraten mittels WST-8 und humanen Gingivafibroblasten (GF1)
8.	Untersuchung der Zellviabilität mittels Lichtmikroskopie an Mausfibroblasten (L929)
9.	Untersuchung der Zellviabilität mittels Lichtmikroskopie an Gingivafibroblasten (GF1)
10.	Rasterelektronenmikroskopie
11.	Messung der Kupferfreisetzung der kupferhaltigen Probekörper mittels Elektronenspektrographie
12.	Statistische Auswertung

4.2 Probekörper

Die Durchführung aller Versuche benötigt bedingt durch die Methodik der Arbeit rund 600 Probekörper. Hiervon entfiel jeweils eine Hälfte auf den kupferhaltigen Zinkoxidphosphatzement (Hoffmann's Kupfer Cement, Lot 5139, Hoffmann's Dental Manufaktur, Berlin, Deutschland) und die andere Hälfte auf den kupferfreien Zinkoxidphosphatzement (Hoffmann's Cement, Lot 1316 D04, Hoffmann's Dental Manufaktur, Berlin, Deutschland) (siehe Abbildung 16). Insgesamt wurden vier Gruppen von Probekörpern untersucht (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Gruppeneinteilung der Probekörper.

Gruppe I	kupferfrei, trocken gelagert
Gruppe II	kupferhaltig, trocken gelagert
Gruppe III	kupferfrei, im Wasserbad gelagert
Gruppe IV	kupferhaltig, im Wasserbad gelagert

Das Anmischen des Zements erfolgte streng nach Herstellerangaben der Hoffmann Dental Manufaktur GmbH (Berlin, Deutschland). Für die Beschaffenheit „Befestigungskonsistenz“ wurden im Verhältnis 1,5 g Pulver zu 1,0 g Flüssigkeit (Phosphorsäure) die Komponenten per Hand auf einer Glasplatte (Henry Schein, Langen, Deutschland) mit einem nichtfärbenden Zementspatel (DF153R, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) bei Raumtemperatur (21 °C) angemischt. Die Mengen wurden per Feinwaage (440-47N, Kern und Sohn GmbH, Balingen, Deutschland) eingewogen. Der angemischte Zement wurde in eine Form aus Dubliersilikon (Adisil rapid, Siladent Dr. Böhme & Schöps, Goslar, Deutschland) gegeben (siehe Abbildung 17). Um Lufteinschlüsse und ungleichmäßiges Ausfließen der Probekörperformen mit dem viskosen Zement zu verhindern, wurde die Probekörperform nach dem Einbringen des Zementes für 20 s auf einen Rüttler bei hoher Frequenz und geringer Amplitude gelegt (Vibrator L, Henry Schein, Langen, Deutschland). Nach dem Aushärten des Zements wurden die Probekörper für 24 h gelagert und anschließend mittels Schleifpapier der Körnungen 240 bis 1200 (Leco Corporation, St. Joseph, Michigan, USA) unter Wasserzufluss mittels Poliermaschine bei 600 Umdrehungen min^{-1} (DAP-U, Streurs, Ballerup, Dänemark) poliert. Die so entstandenen Probekörper hatten einen Durchmesser von 10 mm und eine Höhe von 1 mm (siehe Abbildung 18). Nach dem Schleifen wurden die Probekörper getrennt nach Probekörpergruppen mit *Aqua dest.* (Aqua, B. Braun, Melsungen, Germany) gewaschen und entweder an der Luft zum Trocknen ausgelegt oder in *Aqua dest.* gelagert. Durch die Wasserlagerung bzw. Konditionierung der Probekörper sollten mögliche flüchtige Bestandteile ausgewaschen und eine Alterung im feuchten Milieu simuliert werden.



Abbildung 16: Testzemente: Kupferfrei (links) und kupferhaltig (rechts).



Abbildung 17: Form aus Dubliersilikon mit ausgehärteten Probekörpern.

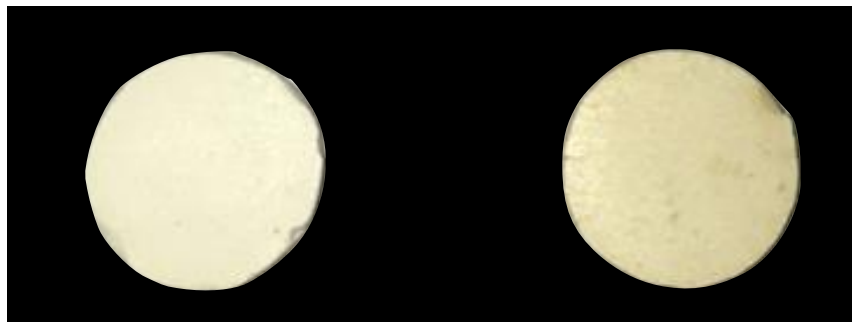


Abbildung 18: Ausgearbeitete Probekörper (Durchmesser 10 mm).

Die Konditionierung der Probekörper erfolgte mittels Lagerung in *Aqua dest.* für einen Monat bzw. 6 Monate für die Untersuchung der Kupferfreisetzung durch Elektronenspektroskopie (ESCA). Während dieser Zeit wurde das *Aqua dest.* wöchentlich ausgetauscht. Für alle Probekörper einer Gruppe wurde jeweils eine 1-Liter-Flasche *Aqua dest.* verwendet, wobei die Flasche täglich bewegt wurde, um ein Aneinanderlagern der Probekörper zu verhindern. Die unkonditionierten Probekörper verblieben nach dem Lufttrocknen (5 Tage bei Raumtemperatur) in Zentrifugen-

röhrchen (Falcon Tube, Corning Incorporated, Twexbury, MA, USA). Die Lagerung aller Probekörper erfolgte zum Ausschluss von möglichen Störfaktoren und zur Standardisierung der Bedingungen unter Lichtausschluss und bei konstanter Zimmertemperatur (23 °C).

Sämtliche Probekörper wurden vor den jeweiligen Versuchsreihen für 1,5 h unter einem UV-Strahler (Herasafe HSP 12, Heraeus, Hanau, Deutschland) desinfiziert. Alle weiteren Schritte fanden unter der Sicherheitswerkbank statt. Die Probekörper wurden für die Versuche in 48er Wellplatten (Costar 48 Well Plate, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) mittels Dubliersilikon (Z-Dupe, Henry Schein Dental Germany GmbH, Langen, Germany) am Boden der Platten befestigt. Die Probekörpergruppen III und IV wurden durchgehend in je 1 ml *Aqua dest.* gelagert. Die Platten wurden steril verschlossen und im Kühlschrank (4 °C) bis zum Versuchsbeginn (max. 1 h) gelagert.

4.3 Messung der Rauheit

Die mittlere Rauheit (R_A) stellt das arithmetische Mittel eines gemessenen Oberflächenprofils da. Um die Oberflächenrauheit der Probekörper zu ermitteln, wurden pro Materialgruppe acht Probekörper in jeweils drei Messungen an willkürlichen Stellen der Probekörper untersucht. Dies geschah nach Fixierung der Probekörper auf der Haltevorrichtung des verwendeten Rauheitsmessgerätes (Perthometer S6P, Feinprüf Perthen, Göttingen, Deutschland). Nach dem automatischen Tastschlittenprinzip wurde eine diamantierte Spitze am Messarm des Gerätes über den Probekörper gezogen und deren Ausschläge erfasst. Es wurden pro Probekörper 0,75 mm abgetastet, wobei die Einzelmessstrecken je 0,25 mm betragen. Die Ausgabe der Messdaten erfolgte automatisch als R_A . Die Parameter für die vertikale und horizontale Messung betragen jeweils 50 μm .

4.4 Freie Oberflächenenergie

Die freie Oberflächenenergie (SFE) wurde mit der Technik der automatisierten Kontaktwinkelmessung gemessen (Kontaktwinkelmessgerät Goniometer G1, ERNA, Tokyo, Japan). Bei der Messung der SFE kamen drei verschiedene Testflüssigkeiten zur Benetzung zum Einsatz. Verwendung fanden hierbei entionisiertes Wasser, Ethylenglycol (Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland) und Methylenjodid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Für die Messungen wurden pro

Materialgruppe vier Probekörper in jeweils drei Messungen pro Testflüssigkeit untersucht. Die Probekörper wurden zunächst auf dem Objektisch des Goniometers positioniert und das Goniometer auf diese ausgerichtet. Während der Messung gab eine automatische Pipette (Microlap, Hamilton, Bondaduz, Schweiz) in Schritten von 2 µl eine der drei Testflüssigkeiten ab. Der sich bildende Tropfen wurde durch Absenken der Pipette auf den Probekörper geführt. Der gesamte Vorgang wurde mittels Filmkamera aufgezeichnet und nach exakt 15 s nach Benetzung der Oberfläche wurden Standbilder erzeugt. Die Auswertung dieser fand mittels Software (OCA 15 plus, Dataphysics Instruments, Filderstadt, Deutschland) statt. Aus den jeweiligen rechten und linken Kontaktwinkeln zwischen Probekörperoberfläche und Tropfen wurde mit Hilfe der Software die SFE in (mJ/m²) nach der Methode von Owens, Wendt, Rabel und Kaeble (Owens et al. 1969) errechnet.

4.5 Vorbereitung der Testkeime

4.5.1 Wochenkultur

Für die Versuche wurden Wochenkulturen von *Streptococcus sanguinis* (DSMZ-Nr. 20068) und *Candida albicans* (DSMZ Nr. 1386) aus den entsprechenden Cryokulturen (- 80 °C) angelegt. Der ursprüngliche Bezug der Testkeime erfolgte über die DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland). Die Herstellung der Wochenkulturen erfolgte durch Überimpfen von 10 µl aufgetauter Cryokultur in 10 ml *Tryptase Soy Yeast Extract Medium* (DSMZ-Medium Nr. 92) für *Streptococcus sanguinis* bzw. 10 ml *Universal Medium For Yeast* (DSMZ-Medium Nr. 186) und anschließend Anzüchten für eine Dauer von 24 h bei einer Temperatur von 37 °C im Inkubator (Orbital Shaker Typ 420, Thermo Forma, Mariette, Ohio, USA). 24 h vor den Versuchen wurde dieser Vorgang nochmals wiederholt. Während des gesamten Anzüchtens und Überimpfens wurde die Vitalität der Kulturen unter dem Lichtmikroskop kontrolliert (Nikon DS-Fi2, Nikon Eclipse TS100, Nikon ELWD 0.3, Nikon DS-LE 3, Nikon, Chiyoda, Japan).

4.5.2 Versuchskultur

Die Versuchskulturen wurden aus den Wochenkulturen einen Tag vor den Versuchen angezüchtet. Hierfür wurden jeweils zwei Erlenmeyerkolben (Schott Duran, Mainz, Deutschland) verwendet, in die einmal 50 ml und einmal 75 ml Medium (DSMZ-Medium Nr. 92 für die Versuche mit *Streptococcus sanguinis* bzw. DSMZ-Medium Nr. 186 für die Versuche mit *Candida albicans*) gegeben wurden. Danach wurden 50 µl der Bakteriensuspension (bestehende Wochenkultur) auf 50 ml des Mediums bzw. 75 µl der Suspension auf 75 ml des Mediums zusammengeführt. Analog zur Inkubation der Wochenkultur wurden die Versuchskulturen 16 h bei 37°C inkubiert (Inkubator Orbital Shaker Typ 420, Thermo Forma, Mariette, Ohio, USA). Während die mit 75 µl / 75 ml gefüllten Kolben für die Versuchsdurchführung vorgesehen waren, dienten die zu Beginn mit 50 ml / 50 µl beschickten Kolben als Sicherheitsreserve.

Am Tag des Versuchs wurden aus dem 75 ml Kolben jeweils 35 ml in zwei Zentrifugenröhrchen (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) überführt. Die verbliebenen 5 ml dienten der elektronischen Messung des pH-Wertes (Multi-Calimatic, Knick, Elektronische Messgeräte GmbH & Co., Berlin, Deutschland) und der photometrischen Messung der optischen Dichte (Photometer, Genesys 10S, Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA) der Ausgangskultur. Die Messung der optischen Dichte fand bei einer Wellenlänge von 550 nm statt. Als Nullwert wurden das *Trypticase Soy Yeast Medium* (DSMZ Nr. 92) bzw. das *Universal Medium For Yeast* (DSMZ-Medium Nr. 186) verwendet.

Die aufgeteilten 70 ml wurden bei 2500 min^{-1} und 18 °C für 5 min zentrifugiert (Rotina 420 R, Hettich Zentrifugen GmbH, Tuttlingen, Deutschland). Nach dem Verwerfen der Überstände wurden die verbliebenen Pellets in 30 ml PBS (*phosphate-buffered Saline*, phosphatgepufferte Salzlösung, PBS, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) resuspendiert. Dieser Vorgang wurde zweimal durchgeführt, um alle Reste der Kulturmedien auszuwaschen. Im Anschluss wurden die Pellets in 20 ml PBS erneut gelöst und in einem Becherglas mit Rührfisch/Magnetrührer (MSC basic C, IKA Works Incorporated, Wilmington, NC, USA) unter Zugabe von weiterem PBS und laufender photometrischer Messung bis auf eine optische Dichte von 0,3 A bei 550 nm eingestellt. Dieser Wert gilt in allen Versuchen dieser Arbeit als Standard. Die so vorbereitete Versuchskultur wurde zum

Ausschluss von Fehlern nochmals auf ihren pH-Wert hin untersucht und konnte im Anschluss als Versuchskultur verwendet werden.

4.6 Zellkulturen

4.6.1 Kultur der Mausfibroblasten (L929)

Versuchsreihe a

Die verwendete Kultur von Mausfibroblasten (L929, Nr. 85011425, Cell Line from mouse, Sigma Aldrich, München, Deutschland) lag in der 19. Passage als Cryokultur (-80 °C) vor. Nach dem Auftauen wurde die Kultur in 30 ml Nährmedium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), ergänzt mit 10 % Kälberserum und versetzt mit 1 % Penicillin-Streptomycin, abgekürzt „DMEM 10 %, FBS 1 %, Pen.-Strep.“ (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland), in einer 175 cm² Kulturflasche (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium erneuert und die Fibroblasten wurden wieder für 24 h bei 37°C inkubiert. Nach Abschluss der letzten Inkubationsphase konnten die Fibroblasten weiter für die Versuche aufbereitet werden.

Das Ablösen der adhärenierten Zellen geschah mittels einer 0,25 %-Trypsin-PBS-Lösung (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) und Inkubation für 4 min bei 37 °C. Das erfolgte Ablösen der adhärenierten Zellen wurde per Lichtmikroskop (Nikon DS-Fi2, Nikon Eclipse TS100, Nikon ELWD 0.3, Nikon DS-LE 3, Nikon, Chiyoda, Japan) überprüft (siehe Abbildung 19). Nach Neutralisieren des verbliebenen Trypsins durch Zugabe von frischem Nährmedium wurden die Zellen bei 800 Umdrehungen min⁻¹ für 6 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in neuem Nährmedium resuspendiert. Nun wurden die Zellen per Zählautomat gezählt (Bio-Rad TC 20 Automated Cell Counter, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Um hierbei lebende von toten Zellen unterscheiden zu können, wurde die Zellsuspension zuvor mit Trypan Blau 0,4 % (Trypan Blue Dye 0,4 %, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) im Verhältnis 0,1 ml Trypan zu 0,5 ml Zellsuspension versetzt. Hierbei werden nur abgestorbene Zellen gefärbt, da die Farbstoffaufnahme in die Zelle passiv erfolgt, das Ausschleusen des Farbstoffes allerdings von allen lebenden Zellen aktiv erfolgt und der Farbstoff sich somit nur in toten Zellen anreichert.

Versuchsreihe b

Zum Ausschluss eventuell vorliegender Alterungseffekte durch zu häufiges Subkultivieren erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt ein weiterer, analoger Versuchsdurchlauf mit noch nicht vor Ort passagierten Mausfibroblasten selbiger Bezugsquelle. Auch diese Kultur lag initial als Cryokultur (-80 °C) vor. Unterschiede zur Versuchsreihe a lagen in den hierbei abweichend verwendeten folgenden Gerätschaften (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: **Gerätschaften Versuchsreihe b.**

1	Lichtmikroskop (Axiovert 40 CFL Zeiss, Göttingen, Deutschland),
2	Inkubator (Labotec C200 Inkubator, Labotec, Göttingen, Deutschland),
3	Zählautomat (Nexcelom Vellometer TM Auto T4 peqlab, VWR International GmbH, Erlangen, Deutschland)
4	Zentrifuge (Centrifuge 5810, Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

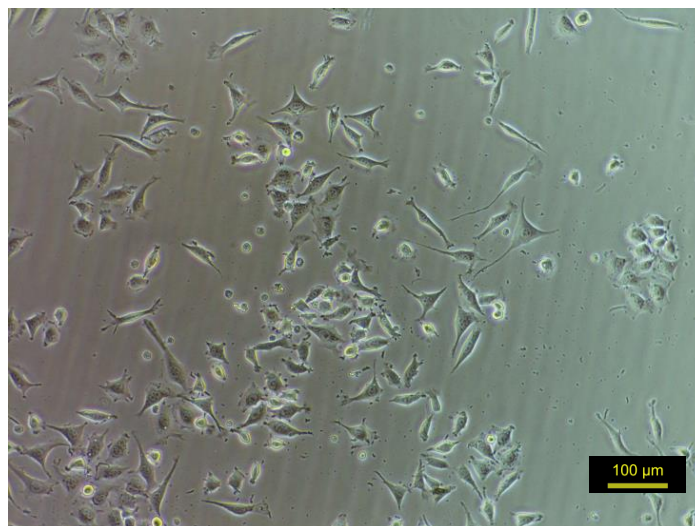


Abbildung 19: **Lichtmikroskopie L929-Mausfibroblasten.**

4.6.2 **Kultur der Gingivafibroblasten (GF1)**

Die verwendete Gingivafibroblastenkultur (GF1) wurde von der AG Orale Biologie und Geweberegeneration der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik der Universitätsmedizin Göttingen etabliert und für die Versuchszwecke dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Das der Zelllinie zugrunde liegende Gewebe wurde an der Universitätsmedizin Göttingen gewonnen und entstammt gesunden Gewebeverhältnissen. Vor der Etablierung der Zelllinie wurde die geplante Arbeit der Ethikkommission der UMG vorgestellt. Ein positives Ethikvotum wurde erteilt (Antragsnummer 16/6/2009).

Die Zellkultur der GF1 lag als stickstoffgekühlte Cryokultur (-196 °C) vor. Nach dem Auftauen im Wasserbad bei 37 °C wurde die Suspension in eine Kulturflasche überführt (75 cm², Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland). Nach Zugabe von 10 ml temperiertem Medium (DMEM + GlutaMax / Dulbecco's Modified Eagle's Medium + GlutaMax, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) und 50 µg pro ml Gentamycin (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) erfolgte eine Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % für 24 h (Inkubator Labotec C200, Labotec, Göttingen, Deutschland). Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. Bei einem Besatz der adhärennten Zellen von 60-70 % (siehe Abbildung 20) erfolgte eine Subkultur, um dichteabhängige Wachstumsveränderungen auszuschließen. Zunächst wurde das alte Medium abgesaugt, gefolgt von zweimaligem Waschen der Zellkultur mit jeweils 10 ml PBS. Im nächsten Schritt wurden die Zellen nach Zugabe von 2 ml Trypsin und einer Inkubation von 5 min bei oben beschriebenen Konditionen vom Boden der Flasche gelöst. Nach Kontrolle des Ablösens unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 40 CFL Zeiss, Göttingen, Deutschland) wurde noch das Trypsin mittels Zugabe von 5 ml Medium inaktiviert. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension in ein 10 ml Röhrchen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) überführt und für 10 min bei 12.000 rpm in einer Zentrifuge (Centrifuge 5810, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) sedimentiert. Der nun vorhandene Überstand wurde verworfen und das Zell-Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Für die Subkulturen wurden 50.000 Zellen pro 75-cm²-Flasche ausgesät und mit 10 ml Medium bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit bis zur Verwendung inkubiert.

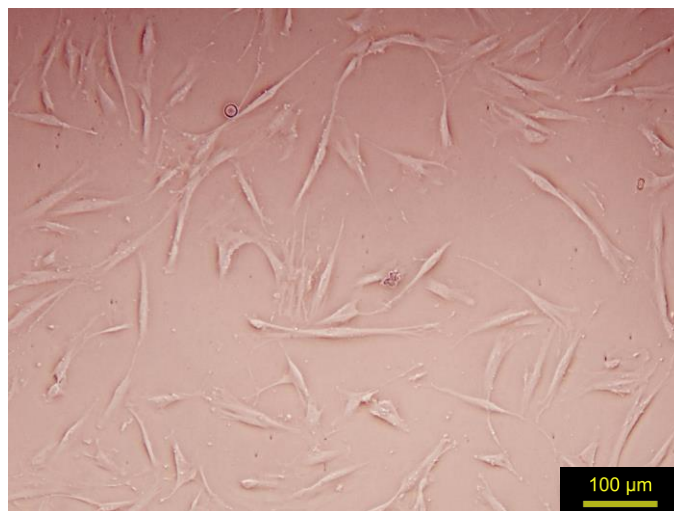


Abbildung 20: Lichtmikroskopie GF1-Gingivafibroblasten.

4.6.3 Vorbereitung der Fibroblasten (GF1 und L929)

Für die Versuche zur Messung der Zytotoxizität an den humanen und tierischen Fibroblasten wurden mittels Zellzählautomaten die Konzentrationen der Zellsuspensionen bestimmt und die benötigte Suspensionsmenge für 10.000 Zellen errechnet. Die Zielaussaat von 10.000 Zellen pro Well in 0,5 ml Medium wurde standardisiert auf alle Well-Platten angewendet.

4.7 Herstellung des Kunstspeichels

Zur Herstellung des künstlichen Speichels wurden folgende Substanzen in 1 l PBS (PBS Tabletten, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) mit Hilfe eines Magnetrührers (MSC basic C, IKA Works Incorporated, Wilmington, NC, USA) unter langsamer Zugabe bei Zimmertemperatur gelöst: 850 mg Mucin Typ III / isoliert aus Schweinemägen, 1 mg Lysozym, 1 g alpha-Amylase, 40 mg Albumin (alle Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Im Anschluss erfolgte die Sterilfiltration mittels Vakuumpumpe (PJ 1604-735, KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland) und Sterilfiltern (Filtereinheit 150 ml, 0,22 µm, Steritop, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland). Der gewonnene Kunstspeichel wurde bis zum Versuchsbeginn bei 8 °C im Kühlschrank gelagert (2 h) und vor Versuchsbeginn durch Entnahme aus dem Kühlschrank langsam auf Raumtemperatur erwärmt.

4.8 Lumineszenzmessung (*Candida albicans*)

4.8.1 Vorbereitung der Probekörper und Inkubation

Für die Lumineszenzmessungen wurden pro Durchlauf und Probekörpergruppe 12 Probekörper benötigt, wobei 2 Probekörper als Nullkontrollen zum Einsatz kamen und an den verbliebenen 10 Probekörpern der fungale Bewuchs gemessen wurde. Alle Arbeiten fanden unter der Sicherheitswerkbank nach deren vorheriger Desinfektion mittels Ethanol (70 %) statt.

Tabelle 7: Pipettierschema Lumineszenzversuch.

10 Proben	1 ml Pilzsuspension
2 Nullkontrollen	1 ml PBS

Die Nasslagerung der Gruppen III und IV erforderte zunächst, das *Aqua dest.* abzusaugen. Im Anschluss wurden die Probekörper einseitig mit Dubliersilikon (Z-

Dupe, Henry Schein Dental Germany GmbH, Langen, Germany) beschichtet und zentral in sterile Well-Platten (Costar 48 Well Plate, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) geklebt. Hierbei war auf eine vollständige Benetzung des Wellbodens mit dem Silikon zu achten.

Nach dem Abbinden des Silikons wurde sichergestellt, dass keine Probekörper eine oberflächliche Verunreinigung durch das Silikon erfahren hatten, andernfalls hätten diese durch neue Probekörper ersetzt werden müssen. Zum sicheren Ausschluss kam der UV-Strahler der Sicherheitswerkbank (Herasafe HSP 12, Heraeus, Hanau, Deutschland) zum Einsatz, da das Silikon unter UV-Licht sichtbar fluoresziert. Weiterhin wurde der Strahler durch die Bestrahlungsdauer von 1,5 h zur Desinfektion der Probekörper genutzt. Nun wurde in alle Wells mit Probekörpern 1 ml des hergestellten Kunstspeichels gegeben. Es schloss sich eine Inkubation von 2 h bei 37 °C im Schüttler bei 53 rpm an (Orbital Shaker Typ 420, Thermo Forma, Mariette, Ohio, USA).

Nach der Inkubation wurde der künstliche Speichel entfernt und die zuvor auf eine optische Dichte von 0,3 eingestellte Pilz-Suspension wurde zu je 1 ml auf die Messprobekörper gegeben. Auf die Nullkontrollen-Probekörper wurde jeweils 1 ml PBS statt der Pilz-Suspension gegeben. Es erfolgte eine erneute Inkubation im Schüttler für 2,5 h bei 37 °C.

Nach Ablauf der Inkubation wurden die Pilzsuspension bzw. das PBS der Kontrollen abgesaugt und die zwei folgenden Waschschrte mit jeweils 1 ml PBS entfernten Reste nicht adhärenter Pilzzellen sowie der Suspension.

4.8.2 Durchführung der Messung

Der erste Schritt zur Messung der fungalen Adhäsion auf den Probekörpern war die Zugabe von 500 µl Lysisreagents (LT27-076 Lysisreagent, Lonza, Basel, Schweiz) in alle Wells und die mechanische Unterstützung des Lysisreagents durch Befestigung der gesamten Wellplatte für 15 min bei 325 Bewegungen min^{-1} auf einer Rüttelplatte (KM2, Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland).

Nach wiederholtem Aufziehen und Ausstoßen mit der Pipette, um eventuell noch verbliebene Reste des Pilzes zu mobilisieren, wurde der Überstand der einzelnen Wells in Reaktionsgefäße (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) überführt und für 15 min bei 4 °C und 11900 rpm zentrifugiert. Die entnommenen Reagiergefäße lagerten auf Eis, während jeweils 100 µl des Überstandes in eine 96er-

Well-Platte überführt wurden (Fluostar Microplate, BMG LabTech, Offenburg, Deutschland). Zusammen mit jeweils 100 µl Versuchspuffer (ViaLight Buffer, LT27-079 Assay buffer, ViaLightPlusCell Proliferation and Cytotoxicity assay, Lonza, Basel, Schweiz) pro Well folgte eine Inkubation auf Eis für 5 min. Nach Ablauf der Inkubation konnte die Messung der Lumineszenz durchgeführt werden. Zum Einsatz kam das Fluometer Fluostar (Fluostar Optima, BMG LabTech, Offenburg, Deutschland) bei einem voreingestellten Gain von 4000.

4.9 Fluoreszenzmessung (*Streptococcus sanguinis*)

4.9.1 Vorbereitung der Probekörper

Analog zum Lumineszenzversuch wurden auch vor der Fluoreszenzmessung die Probekörper aller Gruppen mit Hilfe von Dubliersilikon (Z-Dupe, Henry Schein Dental Germany GmbH, Langen, Germany) in den Well-Platten befestigt. Auch hier wurden die Probekörper nach dem Befestigen auf Verunreinigungen durch das Silikon überprüft und bei Bedarf ausgetauscht. Zum Ausschluss verbliebender Silikonreste und um die Probekörper zu desinfizieren, wurden sie 1,5 h dem UV-Licht des Desinfektionsstrahlers der Sicherheitswerkbank (Herasafe HSP 12, Heraeus, Hanau, Deutschland) ausgesetzt. Insgesamt waren pro Versuchsdurchlauf und Probekörpergruppe 15 Probekörper notwendig. An 10 Probekörpern wurde die Adhärenz der Bakterien gemessen, weitere 3 Probekörper wurden als Farbkontrolle verwendet sowie jeweils einer als Bakterien- bzw. Nullkontrolle. In die Bakterienkontrolle wurde nur die Bakteriensuspension gegeben, in die Nullkontrolle nur PBS.

4.9.2 Messung der Eigenfluoreszenz und Inkubation

Um den Einfluss von Eigenfluoreszenzen zu erfassen und später eliminieren zu können, fand vor der Besiedelung und der Hauptmessung die Messung der Eigenfluoreszenzen statt. Das hierfür verwendete Fluometer (Fluostar Optima, BMG LabTech, Offenburg, Deutschland) erfasste nach Zugabe von jeweils 1 ml PBS pro Well die jeweiligen Daten zur Eigenfluoreszenz, die zur späteren Verrechnung abgelegt wurden. Hierbei lagen folgende Einstellungen vor: *gain 2600, exitation filter 560 nm, emmission filter 590-10, plate mode well scanning, orbital 6 mm*. Nach der Messung wurde das PBS entfernt. Es folgte analog zur Messung der Lumineszenz die Inkubation mit künstlichem Speichel: 1 ml des Kunstspeichels je Well, Inkubation

von 2 h bei 37 °C im Schüttler (Orbital Shaker Typ 420, Thermo Forma, Mariette, Ohio, USA). Zeitgleich zur Inkubation mit dem Kunstspeichel wurde der Resazurinfarbstoff (Resazurin-Salz, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) mit einer Konzentration von 0,75 g Resazurin pro Liter *Aqua dest.* hergestellt und die O.D. der Bakteriensuspension auf 0,3 eingestellt. Zu jedem Zeitpunkt wurde die Lichtempfindlichkeit des Resazurin durch entsprechende Vorsichtsmaßnahmen (u. a. Abdecken, zügige Arbeitsweise, reduzierte Beleuchtung) berücksichtigt. Im Anschluss wurde der Kunstspeichel abgesaugt und es folgte die mikrobielle Besiedelung bzw. die Beschickung der Well-Platten nach dem Schema in Tabelle 8.

Tabelle 8: Pipettierschema Resazurin / Fluoreszenz.

10 Proben	1 ml Bakteriensuspension + 15 µl Resazurin
3 Farbkontrolle	1 ml PBS + 15 µl Resazurin
1 Bakterienkontrolle	1 ml Bakteriensuspension
1 Nullkontrolle	1 ml PBS

Die anschließende Inkubation erfolgte bei 37 °C für die Dauer von 2,5 h unter Lichtausschluss und hoher Luftfeuchtigkeit in einer feuchten Kammer (kleine, lichtundurchlässige Kunststoffbox mit angefeuchtetem Papier) im Schüttler (Orbital Shaker Typ 420, Thermo Forma, Mariette, Ohio, USA).

4.9.3 Durchführung der Messung

Nach Abschluss der Inkubation und der Entnahme der Wellplatten aus der feuchten Kammer wurden die Überstände aus den einzelnen Wells in eine 96er-Well-Platte überführt (Fluostar Microplate, BMG LabTech, Offenburg, Deutschland). Die anschließende Messung erfolgte am Fluometer (Fluostar Optima, BMG LabTech, Offenburg, Deutschland). Diese wurde mit folgenden Einstellungen vorgenommen: *initial gain 2600, adjusted gain 3107* (nach Ergebnissen der gemessenen Eigenfluoreszenz angepasst), *excitation filter 560 nm, emission filter 590-10, plate mode well scanning, orbital 6 mm.*

4.10 Zellviabilität mittels WST an Mausfibroblasten (L929)

4.10.1 Vorbereitung der Probekörper und der Wellplatte

Wie zuvor bei den Versuchen zur Lumineszenz (Kapitel 4.7) und zur Fluoreszenz (Kapitel 4.8) wurden die Probekörper mit Dubliersilikon in die Well-Platten geklebt. Es wurde ebenfalls mittels UV-Strahler der Sicherheitswerkbank nach Verunreinigungen durch das Silikon gesucht und eine Desinfektion durch eine Bestrahlung von 1,5 h Dauer durchgeführt.

Insgesamt waren pro Versuchsdurchlauf und Probekörpergruppe 9 Probekörper notwendig. An ihnen wurde die Stoffwechselaktivität der Zellen mittels Proliferations-Assays gemessen, es folgten 5 Wells ohne Probekörper, in denen die auf dem Wellboden adhären Zellen in mit konditioniertem Medium (Probekörper wurden zuvor im Medium gelagert) inkubiert wurden. Weiterhin folgten 4 Wells als reine positive Zellkontrolle (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Pipettierschema WST-Versuche mit konditioniertem Medium.

9 Probekörper	10.000 Zellen + Medium
5 Wells mit konditioniertem Medium	10.00 Zellen + konditioniertes Medium
4 Wells Zellkontrolle	10.000 Zellen + Medium

4.10.2 Vorbereitung des konditionierten Mediums und Zellaussaat

Zu Beginn wurden zweimal 1,5 ml des bereits zuvor beschriebene Zellnährmediums (DMEM, 10 % FCS, 1 % Pen.-Strep.) für 24 h unter sterilen Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in Kontakt zu 2 Probekörpern der jeweiligen Probekörpergruppe gebracht. Die Wells der restlichen Probekörper aller Gruppen wurden simultan mit jeweils 1,5 ml PBS befüllt. Nach Ablauf von 24 h wurde das PBS verworfen, das zuvor mit den Probekörpern in Kontakt stehende Medium, fortan als „konditioniert“ bezeichnet, wurde in zwei sterilen Reaktionsgefäßen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) für die kurze Zeit der restlichen Vorbereitungsschritte zwischengelagert.

Im nächsten Schritt wurden 10.000 Zellen in 0,5 ml Medium in jedes Probekörper tragende Well sowie in die 4 Wells zur Zellkontrolle gegeben. In die 5 Wells zur

Testung des konditionierten Mediums wurden ebenfalls 10.000 Zellen gegeben, jedoch nun zusammen mit 0,5 ml des konditionierten Mediums.

Durch die Verwendung des konditionierten Mediums ergaben sich für alle damit arbeitenden Versuchsabschnitte vier neue Untergruppen von Probekörpern, die sich wie in Tabelle 10 darstellten.

Tabelle 10: Gruppeneinteilung der Probekörper, WST-Versuchsreihe mit konditioniertem Medium.

Gruppe I	kupferfrei trocken gelagert
Gruppe I.b	von Gruppe I konditioniertes Medium
Gruppe II	kupferhaltig trocken gelagert
Gruppe II.b	von Gruppe II konditioniertes Medium
Gruppe III	kupferfrei im Wasserbad gelagert
Gruppe III.b	von Gruppe III konditioniertes Medium
Gruppe IV	kupferhaltig im Wasserbad gelagert
Gruppe IV.b	von Gruppe IV konditioniertes Medium

Die sich dem Aussäen anschließende Inkubation erfolgte für 4 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator (Labotec C200 Inkubator, Labotec, Göttingen, Deutschland). Nach Ablauf von 4 Stunden wurde die erfolgreiche Adhärenz der Zellen als Abschluss der Vorbereitungen lichtmikroskopisch (Axiovert 40 CFL Zeiss, Göttingen, Deutschland und Nikon DS-Fi2, Nikon Eclipse TS100, Nikon ELWD 0.3, Nikon DS-LE 3, Nikon, Chiyoda, Japan) überprüft.

4.10.3 Durchführung der Messungen

Nach der Kontrolle der erfolgten Adhärenz der Zellen wurde das Medium in allen Wells abgesaugt, um durch 0,5 ml der Messlösung ersetzt zu werden. Diese bestand aus dem WST-8 des Mess-Kits (Cell Counting Kit-8, CCK8, Dojindo EU GmbH, München, Deutschland) und dem Nährmedium im Verhältnis 1:10. Es erfolgte eine weitere Inkubation für die Dauer von 2 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Nach Ablauf der 2 h wurden die Überstände der Messlösung in eine neue Wellplatte überführt (Abbildung 21). Alle Wells wurden danach durch zwei vorsichtige Waschschrte mit jeweils 1 ml PBS von verbliebener Messlösung gereinigt und mit neuen 0,5 ml des Nährmediums beschickt. Es erfolgte eine erneute Inkubation bei identischen Konditionen bis zur nächsten Messprozedur.

Im folgenden Schritt wurden die Wells mit der überführten Messlösung auf Luftblasen überprüft und diese gegebenenfalls durch Verwendung steriler Instrumentarien

entfernt. Die Messungen erfolgten mit zwei verschiedenen Multimode-Plattenreadern (Tecan Infinite F200, Tecan, Männedorf, Schweiz und SpectraMax M2, Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, USA) im Messmodus Absorption bei einer Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm. Zur Messung der Extinktion des Formazans des WST-8 wurden die Werte der Referenzwellenlänge von den Werten der Messwellenlänge subtrahiert.

Insgesamt wurde diese Messprozedur mehrfach zu verschiedenen Zeitpunkten nach Besiedelung der Wells durchgeführt. Die Abläufe hierfür sind analog zu den in diesem Abschnitt erläuterten.

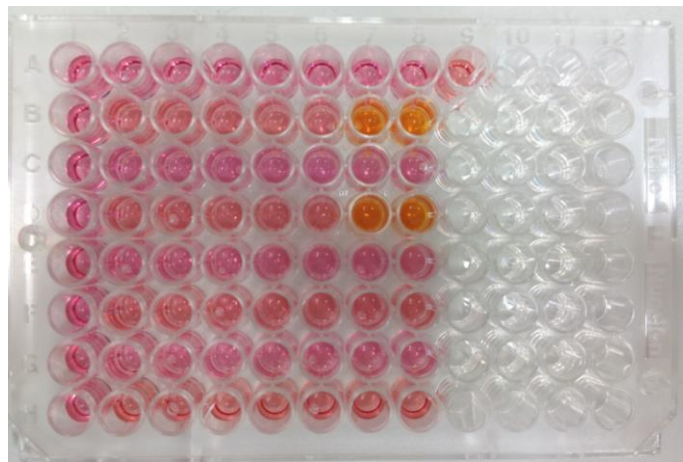


Abbildung 21: In die 96er-Well-Platte überführte Messlösung mit deutlich sichtbar unterschiedlichen Farbumschlägen.

4.11 Zellviabilität mittels WST an Gingivafibroblasten (GF1)

4.11.1 Vorbereitung der Probekörper

Die Probekörper für die Messung der Zellviabilität an Gingivafibroblasten wurden analog zu der Messung an Mausfibroblasten vorbereitet. Eine separate Untersuchung mit einem konditionierten Medium wurde vor dem Hintergrund der deutlichen Ergebnisse der vorangegangenen Versuche nicht durchgeführt.

4.11.2 Durchführung der Messungen

Nach erfolgter lichtmikroskopischer Kontrolle (Axiovert 40 CFL Zeiss, Göttingen, Deutschland) der Adhärenz der inkubierten Gingivafibroblasten folgte übereinstimmend zu den Versuchen mit Mausfibroblasten die Inkubation mit der Messlösung (nur WST-8). Bei der anschließenden Messung kam nur der Plattenreader SpectraMax M2 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, USA) zum

Einsatz, da das andere Gerät der Arbeitsgruppe nicht mehr zur Verfügung stand. Technisch relevante Unterschiede bestanden jedoch nicht.

4.12 Lichtmikroskopie

Parallel zu den colorimetrischen Untersuchungen mit dem CCK-8 Kit fand die Bildgebung zur qualitativen Untersuchung und Verifizierung der Ergebnisse statt. Zum Einsatz kamen zwei unterschiedliche digitale Durchlichtmikroskope (Axiovert 40 CFL Zeiss, Göttingen, Deutschland und Nikon DS-Fi2, Nikon Eclipse TS100, Nikon ELWD 0.3, Nikon DS-LE 3, Nikon, Chiyoda, Japan). Begleitend zu verschiedenen Zeiten des Medienwechsels und der Messintervalle wurden exemplarisch Aufnahmen unterschiedlicher Vergrößerungen angefertigt, um den Zustand der verschiedenen Zelllinien in den Probekörpergruppen zu dokumentieren. Der Einsatz eines digitalen Durchlichtmikroskops war limitiert auf die Randbereiche der einzelnen Wells nahe der Probekörper, da die Probekörper selbst nicht transluzent waren.

4.13 Elektronenspektroskopie (ESCA / XPS)

Die Elektronenspektroskopie zur chemischen Analyse (*ESCA* für *electron spectroscopy for chemical analysis* oder auch *XPS* für *X-ray photoelectron spectroscopy*) wurde mit einem Kratos Axis Ultra (Kratos Analytical Limited, Manchester, UK) durchgeführt. Bei dieser Untersuchung traf im Ultrahochvakuum fokussierte Röntgenstrahlung (Al-K α mit 1486,6 eV, Spotgröße ca. 0,3 × 0,7 mm) auf die Oberfläche der Probekörper. Die hierbei durch den photoelektrischen Effekt übertragene Energie führte zur Bildung von Photoelektronen, also Elektronen des Probekörpermaterials, auf die Energie übertragen wurde. Diese Photoelektronen lösten sich nach Energieübertragung aus der obersten Materialschicht (ca. 10 nm). Die im Gerät angelegten elektrischen und magnetischen Felder lenkten die entstandenen Photoelektronen je nach deren kinetischer Energie auf der Bahn zum Detektor des Kratos Axis Ultra unterschiedlich ab. Dieser registrierte sowohl ihre Energie als auch die Intensität der Photoelektronen. In der folgenden Berechnung ermittelte ein Algorithmus aus diesen Informationen das Element, aus welchem die Photoelektronen freigesetzt wurden. Nach der Integration aller so entstandenen Peaks war die Ermittlung der elementaren Zusammensetzung der Probekörperoberfläche in Atomprozent möglich.

4.14 Rasterelektronenmikroskopie

Die Aufnahmen im Rasterelektronenmikroskop (REM) dienten wie die lichtmikroskopischen Aufnahmen zur qualitativen Darstellung der mikrobiellen Besiedelung der Probekörper sowie der Adhäsion durch die Mausfibroblasten. Durch die sehr hohe Vergrößerung und die Bildgebung in reiner Aufsicht war auch die Darstellung der Mikroorganismen und Zellen auf den Probekörpern möglich.

Exemplarische Probekörper sämtlicher Gruppen wurden parallel zu den durchgeführten Versuchen inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationen erfolgte eine Fixierung der verschiedenen Zellen (Bakterien, Pilze, GF1 und L929) mit 4 % Paraformaldehyd (Paraformaldehyd, Pulver, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) für 15 min. Im Anschluss erfolgte durch Kohlenstoffklebstoff (Leit-C nach Göcke, Provac GmbH, Oestrich-Winkel, Deutschland) die Fixierung auf Probenträgern (Alu-Stubs, Provac GmbH, Oestrich-Winkel, Deutschland). Zur Sicherung der vollständigen Trocknung wurden die Probekörper abgedeckt eine Woche unter dem Laborabzug gelagert.

Im Anschluss wurde eine leitfähige Goldschicht im Sputtergerät (SCD 005 Sputter Coater, BAL-TEC, Walluf, Deutschland) bei 30 mA für 6 min aufgebracht. Die Bildgebung erfolgte im REM (Cambridge S240, Cambridge Instruments, Nussloch, Deutschland) bei einer anliegenden Röhrenspannung von 10 kV und Vergrößerungen zwischen Faktor 24 und Faktor 4000.

Die Nachbearbeitung mit Falschfarben zur besseren Sichtbarkeit der Zellen und Mikroorganismen erfolgte mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware GIMP (GNU Image Manipulation Programm, Version 2.8.18 für OS X, The GIMP Team). Die Erkennung der zu markierenden Areale bzw. Zellen erfolgte manuell, da eine automatische Trennung der Graubereiche in Zellen und Hintergrund durch die zahlreichen Übereinstimmungen innerhalb der Grauabstufungen eines Bildes nicht möglich war.

4.15 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse sowie die graphische Aufbereitung erfolgte mit der Software Microsoft Excel für Mac 2011 in der Version 14.7.0 (Microsoft Corporation, Redmont, Washington, USA) und IBM SPSS Statistics für Mac in der Version 24 für 64-Bit-Systeme (IBM, Armonk, North Castle, New York, USA). Zum Testen auf signifikante Unterschiede kam ein gängiger Algorithmus zum Einsatz (siehe Abbildung 22). Es erfolgte zunächst ein Levene-Test auf Varianzhomogenität und ein

Kolmogorov-Smirnov-Test (KS-Test) auf Normalverteilung. War beides gegeben, erfolgte eine einfaktorielle Varianzanalyse (einfaktorielle ANOVA, von *analysis of variance*). Der einfaktoriellen ANOVA wiederum schloss sich für den Fall signifikanter Unterschiede eine Post-Hoc-Analyse im Testverfahren Tukey an. Wurde keine Varianzhomogenität bzw. Normalverteilung festgestellt, kam ein Kruskal-Wallis-Test zum Einsatz. Zeigte dieser signifikante Unterschiede, erfolgte ein paarweiser Gruppenvergleich. Dieser wurde nach Dunn-Bonferroni korrigiert. Das allgemeine Signifikanzniveau wurde auf 5 % ($\alpha = 0,05$) festgelegt.

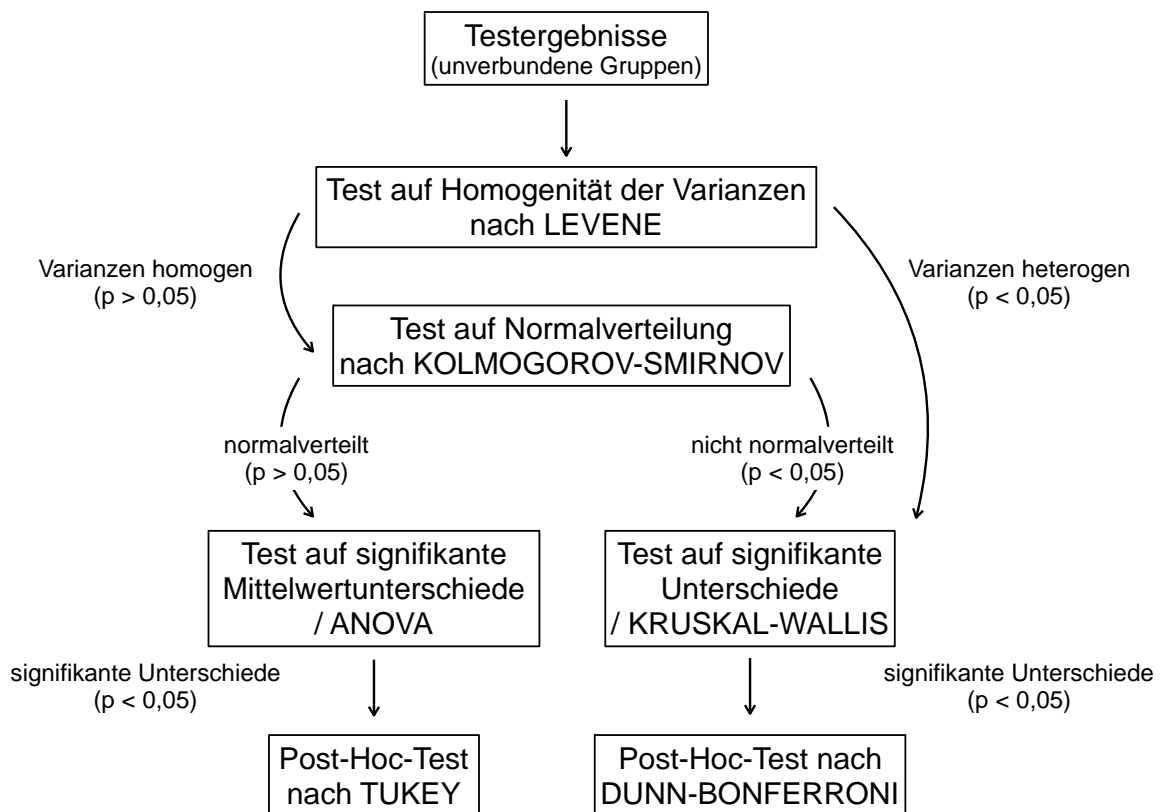


Abbildung 22: Flussdiagramm der statistischen Auswertemethodik

5. Ergebnisse

5.1 Präambel zu den Ergebnissen

In den abgebildeten Whisker-Box-Plots zeigen die Whisker die Minimal- sowie Maximalwerte (siehe Abbildung 23). Die Boxen markieren die Bereiche vom Quantil $Q_{0,25}$, im Folgenden als Quartil Q1 bezeichnet, bis zum Quantil $Q_{0,75}$, im Folgenden als Quartil Q3 bezeichnet. Die Boxen werden vom Median geteilt.

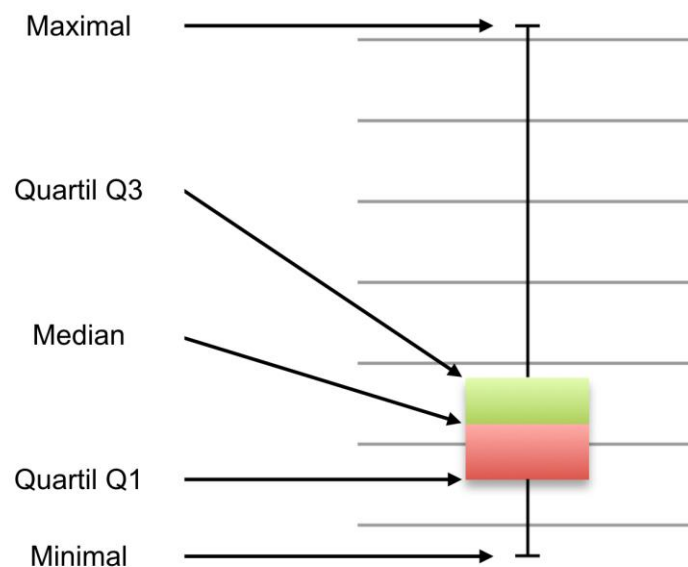


Abbildung 23: Aufbau der Whisker-Box-Plots.

Die Zuordnung der Probekörpergruppen entspricht der bisherigen Zuordnung (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Probekörpergruppen.

Gruppe I	kupferfrei, trocken gelagert
Gruppe II	kupferhaltig, trocken gelagert
Gruppe III	kupferfrei, im Wasserbad gelagert
Gruppe IV	kupferhaltig, im Wasserbad gelagert

Für die Versuchsreihe mit konditioniertem Medium gab es vier zusätzliche Gruppen (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Probekörpergruppen bei konditioniertem Medium.

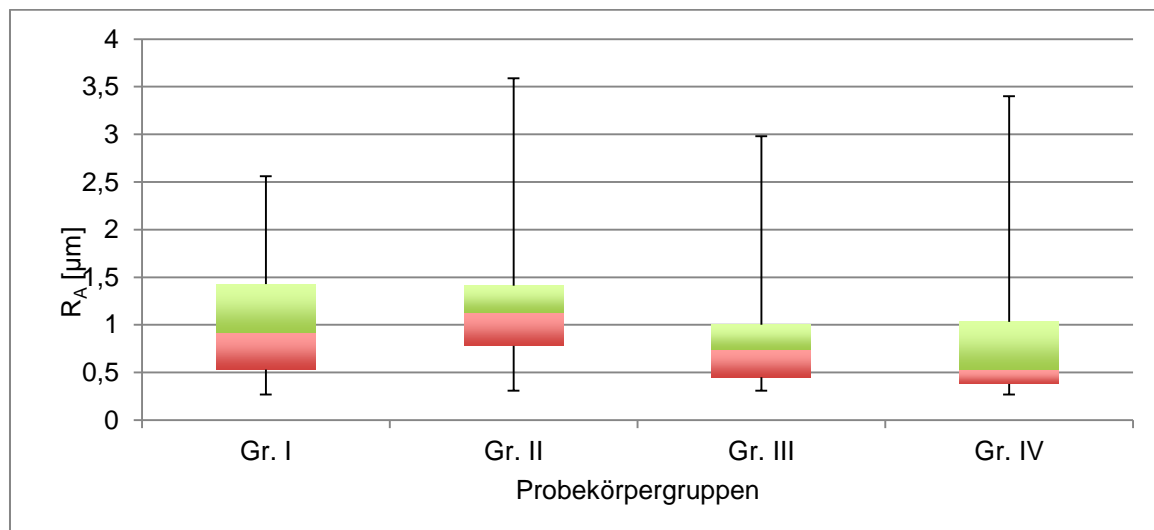
Gruppe I	kupferfrei trocken gelagert
Gruppe I.b	von Gruppe I konditioniertes Medium
Gruppe II	kupferhaltig trocken gelagert
Gruppe II.b	von Gruppe II konditioniertes Medium
Gruppe III	kupferfrei im Wasserbad gelagert
Gruppe III.b	von Gruppe III konditioniertes Medium
Gruppe IV	kupferhaltig im Wasserbad gelagert
Gruppe IV.b	von Gruppe IV konditioniertes Medium

5.2 Rauheit

Die Messung des arithmetischen Mittels der Rauheit ergab die in Tabelle 13, Abbildung 24 sowie Abbildung 25 aufgeführten Werte.

Tabelle 13: Arithmetisches Mittel der Rauheit [μm].

	Min.	Q1	Median	Q3	Max.
Gruppe I	0,27	0,53	1,13	1,42	2,56
Gruppe II	0,5	0,78	1,19	1,41	3,59
Gruppe III	0,31	0,41	0,86	1,05	2,98
Gruppe IV	0,27	0,38	0,85	0,92	3,4
Gruppe I + III	0,27	0,49	1,0	1,26	2,98
Gruppe II + IV	0,27	0,52	1,02	1,23	3,59

Abbildung 24: Arithmetisches Mittel Rauheit, alle Gruppen [μm] (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

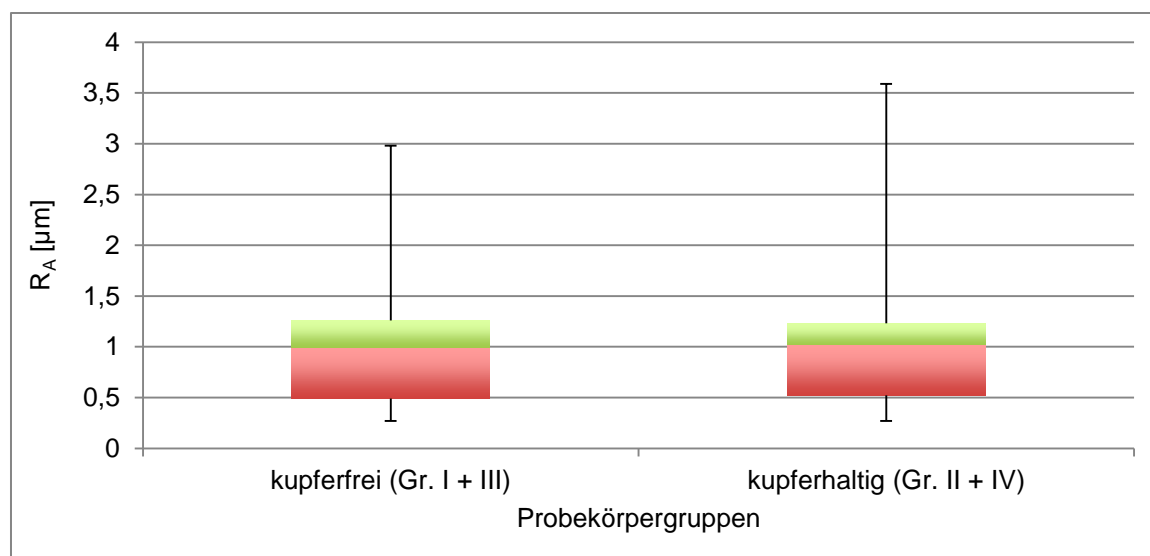


Abbildung 25: Arithmetisches Mittel Rauheit, kupferfrei vs. kupferhaltig [μm], (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

Die statistische Analyse erfolgte analog dem dargestellten Schema (siehe Abbildung 22). Der Test auf Varianzhomogenität ergab mit $p = 0,879$ keine Signifikanz, es liegt demnach eine Homogenität der Varianzen vor. Der Test auf Normalverteilung war mit $p < 0,001$ signifikant, es ist daher von keiner Normalverteilung auszugehen. Der durchgeführte Kruskal-Wallis-Test zeigte mit $p = 0,006$ signifikante Unterschiede. Die paarweisen Vergleiche zeigten zwar signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen II und IV ($p = 0,039$) und den Gruppen II und VI ($p = 0,018$), jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den kupferfreien und kupferhaltigen Zementen ($p = 1,0$).

5.3 Freie Oberflächenenergie

Die Messung der Freien Oberflächenenergie (SFE) ergab die in Tabelle 14, Abbildung 26 und Abbildung 27 aufgeführten Werte.

Tabelle 14: Mittelwerte Freie Oberflächenenergie (SFE), nach Probekörpergruppen [mN/m].

	SFE	disperser Anteil	polarer Anteil
Gruppe I	41,69 +/- 2,18	38,4 +/- 1,85	3,29 +/- 1,15
Gruppe II	48,98 +/- 2,01	38,87 +/- 1,53	7,12 +/- 1,31
Gruppe III	36,02 +/- 3,04	29,7 +/- 2,33	6,23 +/- 1,95
Gruppe IV	39,23 +/- 2,2	35,96 +/- 1,82	3,27 +/- 1,24
Gruppe I + III	38,85 +/- 2,61	33,55 +/- 2,09	4,76 +/- 1,55
Gruppe II + IV	42,59 +/- 2,11	37,42 +/- 1,68	5,19 +/- 1,25

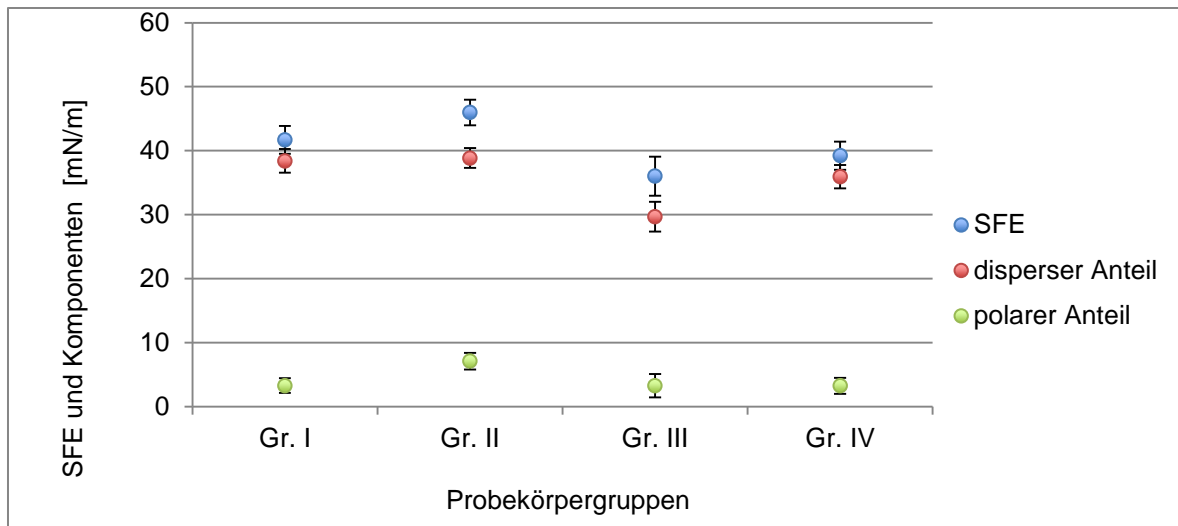


Abbildung 26: Freie Oberflächenenergie (SFE), Probekörpergruppen mit Standardabweichungen [mN/m].

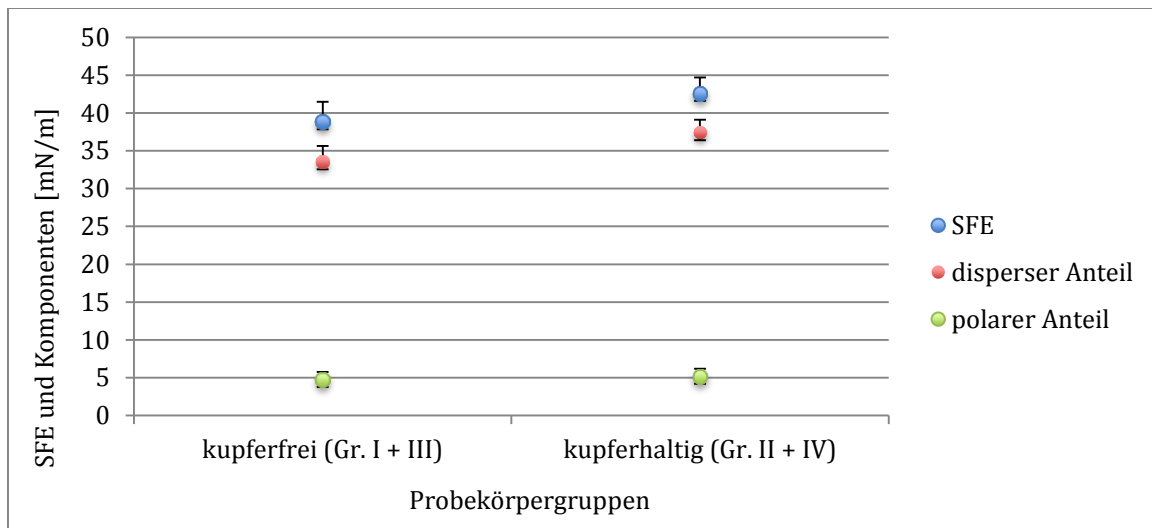


Abbildung 27: Freie Oberflächenenergie (SFE), kupferfrei vs. kupferhaltig mit Standardabweichungen [mN/m].

Die statistische Analyse erfolgte analog dem bereits eingeführten Schema. Der Test auf Varianzhomogenität war mit $p < 0,001$ signifikant, eine Homogenität der Varianzen liegt demnach nicht vor. Der durchgeführte Kruskal-Wallis-Test zeigte mit $p < 0,001$ signifikante Unterschiede an. Der paarweise Vergleich zeigte multiple signifikante Mittelwertunterschiede, so auch zwischen den Gruppen kupferfrei und kupferhaltig ($p < 0,001$). Die absoluten Unterschiede in der SFE sind relativ betrachtet klein. Die SFE der beiden zu vergleichenden Zemente weisen somit signifikante Unterschiede auf, die jedoch gering ausfallen.

5.4 Lumineszenzmessung *Candida albicans*

Die Lumineszenzmessung an *Candida albicans* ergab die in Tabelle 15, Abbildung 28 und Abbildung 29 aufgeführten Ergebnisse in relativer Fluoreszenz (*rlu*, *relative luminescence units*). Ein hoher Wert entspricht hier einer hohen, ein niedriger Wert einer niedrigen fungalen Besiedelung.

Tabelle 15: Lumineszenzmessung, *Candida albicans*, nach Probekörpergruppen [rlu].

	Min.	Q1	Median	Q3	Max.
Gruppe I	17	26,5	35,4	41	64
Gruppe II	29	40,5	58,1	69	88
Gruppe III	15	27,25	30,9	36	45
Gruppe IV	25	49,25	61,9	72	113
Gruppe I + III	15	26,75	33,15	37,75	64
Gruppe II + IV	25	46	60	73	113

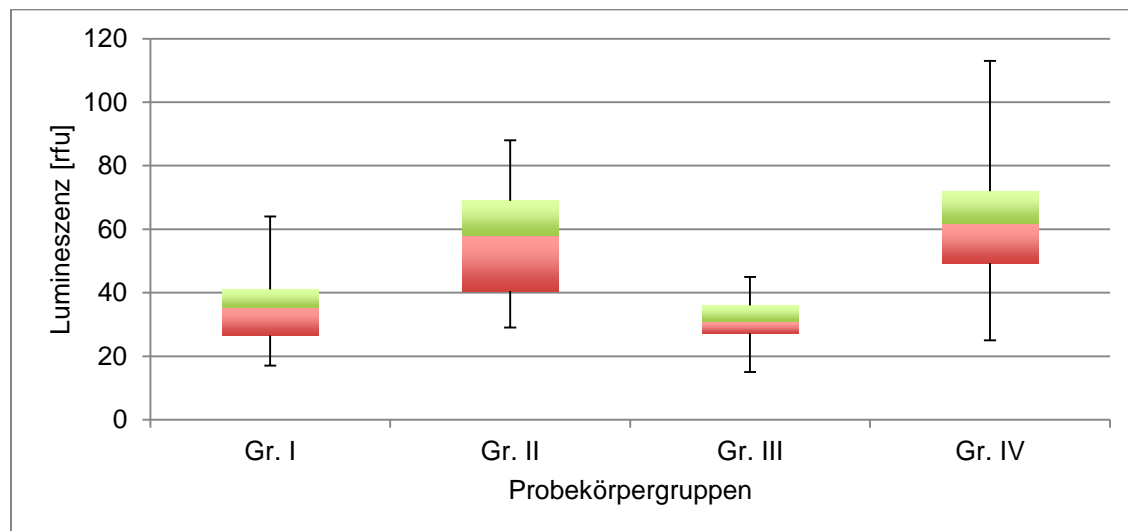


Abbildung 28: Lumineszenzmessung, *Candida albicans*, Probekörpergruppen [rlu] (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

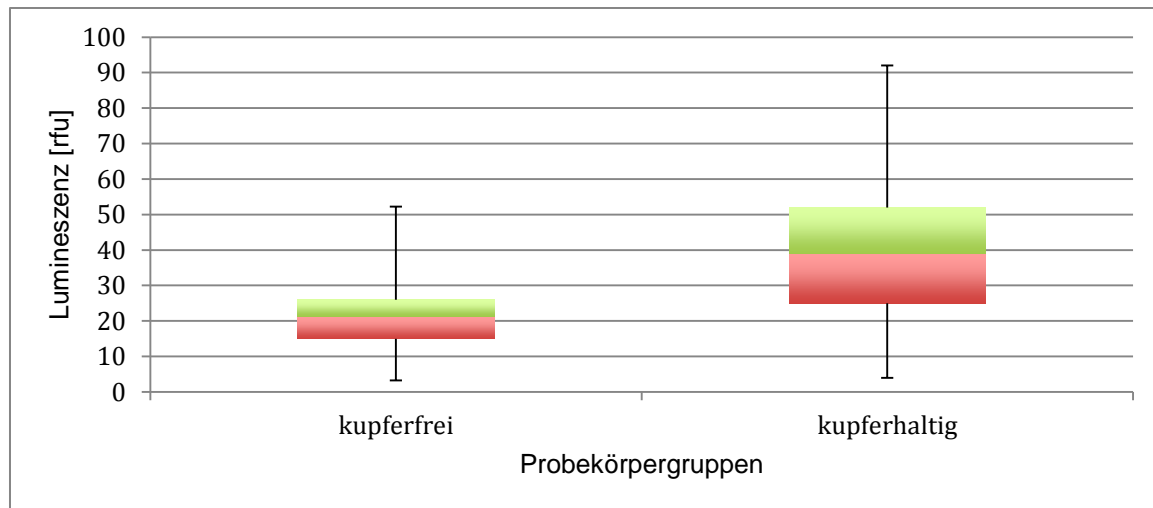


Abbildung 29: Lumineszenzmessung, *Candida albicans*, kupferfrei/kupferhaltig [rfu] (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

Die statistische Analyse erfolgte analog dem dargestellten Schema. Der Test auf Varianzhomogenität war mit $p = 0,018$ signifikant, eine Homogenität der Varianzen liegt demnach nicht vor. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte mit $p = 0,001$ signifikante Unterschiede an. Die paarweisen Vergleiche zeigten multiple signifikante Unterschiede, jedoch keinen zwischen den Gruppen kupferfrei und kupferhaltig ($p = 0,865$). Demzufolge gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Zementen.

5.5 Fluoreszenzmessung *Streptococcus sanguinis*

Die Fluoreszenzmessungen mit *Streptococcus sanguinis* ergaben die in Tabelle 16, Abbildung 30 und Abbildung 31 aufgeführten folgenden Werte in relativer Fluoreszenz (*rfu*, relative fluorescence units). Ein hoher Wert bedeutet hier einen hohen, ein niedriger Wert einen niedrigen Besatz mit Bakterien.

Tabelle 16: Fluoreszenzmessung, *S. sanguinis* nach Probekörpergruppen [rfu].

	Min.	Q1	Median	Q3	Max.
Gruppe I	13547	14547	30908,7	52574	53970
Gruppe II	8370	15104,75	22519,9	43857,7	51106,5
Gruppe III	24705	38975,75	43857,7	51106,5	54774,25
Gruppe IV	24706	40964	45105,9	54774,25	55221
Gruppe I + III	13547	22347,75	37383,2	62953	53970
Gruppe I + III	8370	24057,5	33812,9	46068,75	55221

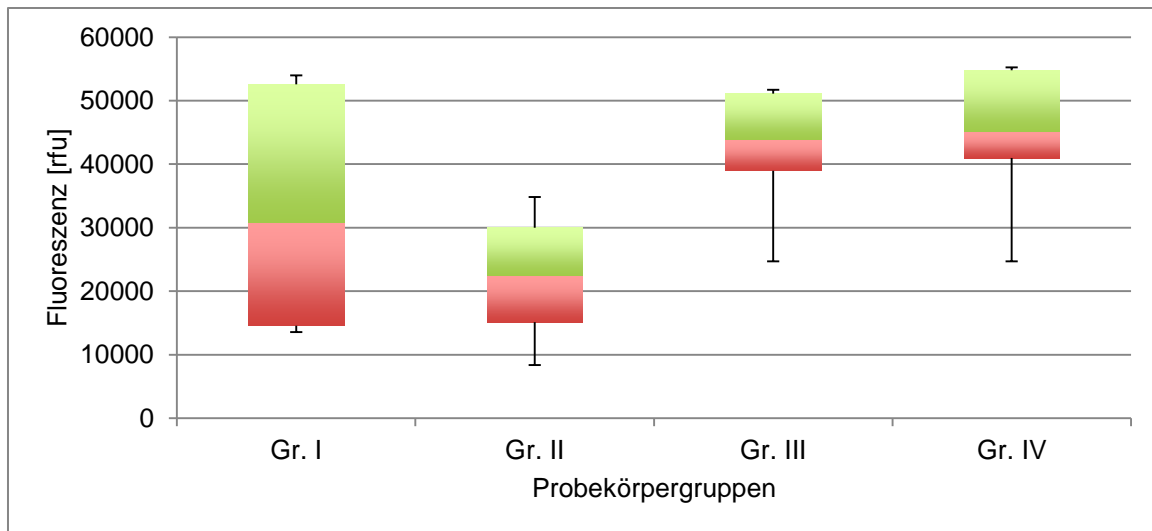


Abbildung 30: Fluoreszenzmessung, *S. sanguinis*, Probekörpergruppen [rfu] (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

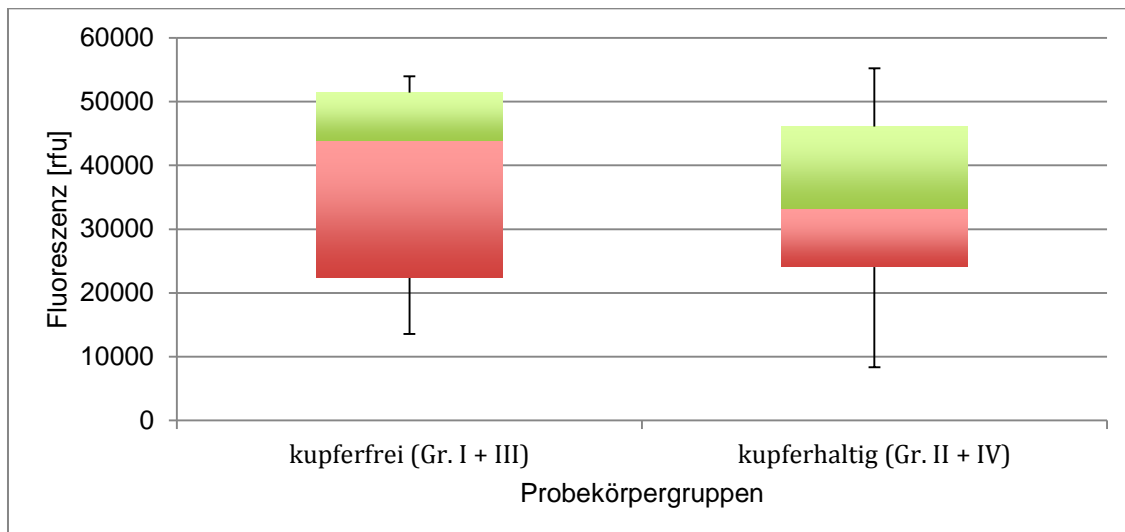


Abbildung 31: Fluoreszenzmessung, *S. sanguinis*, kupferfrei/kupferhaltig [rfu] (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

Die statistische Analyse erfolgte analog dem etablierten Schema. Der Test auf Varianzhomogenität war mit $p = 0,001$ signifikant, eine Homogenität der Varianzen liegt demnach nicht vor. Der Kruskal-Wallis-Test zeigt mit $p = 0,011$ signifikante Unterschiede an. Die paarweisen Vergleiche zeigen verschiedene signifikante Unterschiede, jedoch keinen zwischen den Gruppen kupferfrei und kupferhaltig ($p = 1,0$).

5.6 Zellviabilität Mausfibroblasten (L929)

Versuchsreihe a

Die Messung der Zellviabilität an Mausfibroblasten (L929) ergab nach 12 h Inkubation mit Probekörpern / konditioniertem Medium die in Tabelle 17, Abbildung 32 und Abbildung 33 aufgeführten Werte. Ein hoher Wert steht für eine hohe Zellviabilität, ein niedriger für eine niedrige Zellviabilität.

Tabelle 17: WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 12 h, Probekörper und konditioniertes Medium, nach Probekörpergruppen, Versuchsreihe a [relative Absorption].

	Min.	Q1	Median	Q3	Max.
Gruppe I	0,25	0,26	0,27	0,28	0,28
Gruppe I b	0,34	0,34	0,35	0,35	0,35
Gruppe II	0,22	0,23	0,24	0,25	0,26
Gruppe II b	0,34	0,34	0,35	0,35	0,35
Gruppe III	0,24	0,24	0,25	0,25	0,27
Gruppe III b	0,34	0,34	0,35	0,35	0,38
Gruppe IV	0,24	0,26	0,26	0,27	0,27
Gruppe IV b	0,33	0,34	0,34	0,35	0,35
Gr. I + I b + III + III b	0,22	0,24	0,25	0,26	0,28
Gr. II + II b + IV + IV b	0,33	0,34	0,35	0,34	0,38
Kontrollgruppe	1,33	1,41	1,43	1,48	1,48

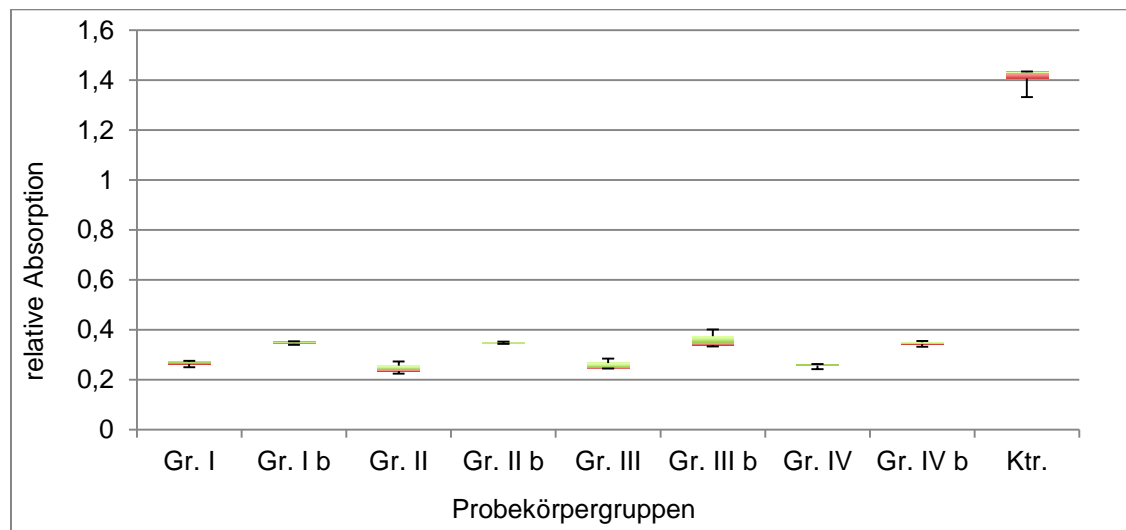


Abbildung 32: WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 12 h, Probekörpergruppen, Inkubation mit Probekörpern und konditioniertem Medium, Versuchsreihe a [relative Absorption] (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

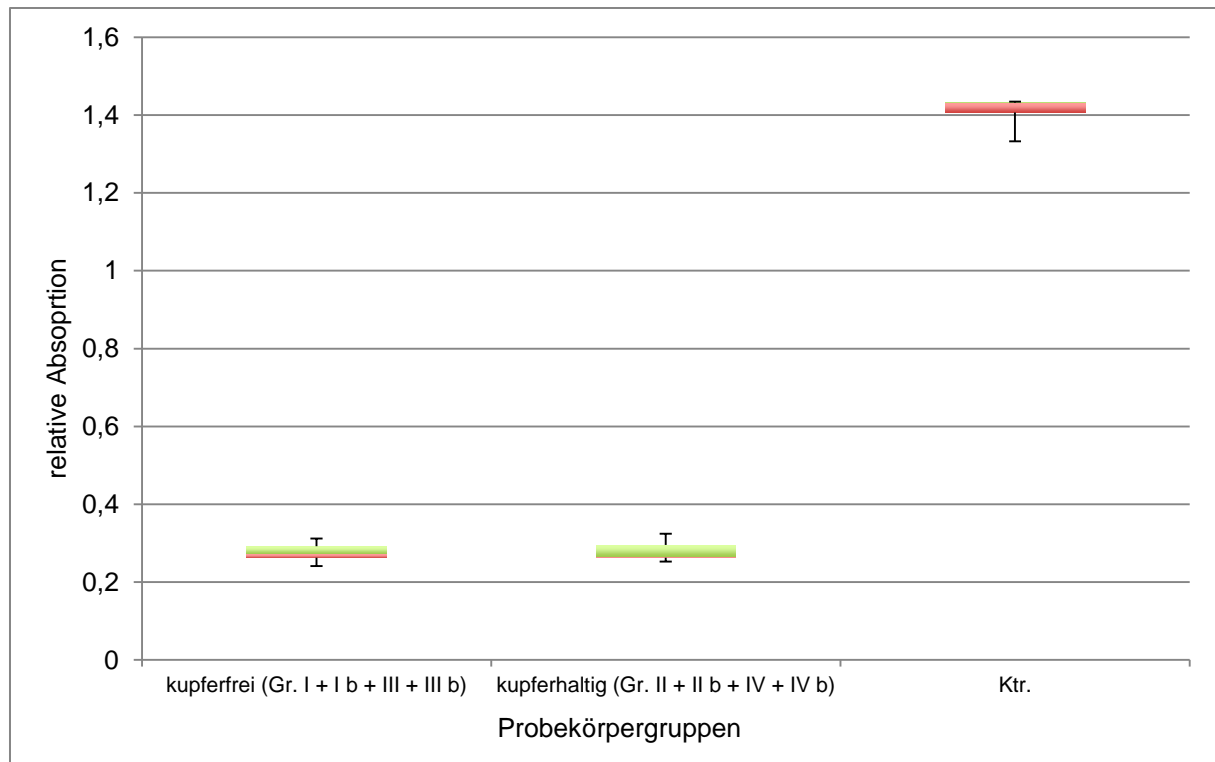


Abbildung 33: WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 12 h, kupferfrei/kupferhaltig, Inkubation mit Probekörpern und konditioniertem Medium, Versuchsreihe a [relative Absorption] (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

Die statistische Analyse erfolgte analog dem zuvor etablierten Schema. Der Test auf Varianzhomogenität war mit $p < 0,01$ signifikant, eine Homogenität der Varianzen liegt demnach nicht vor. Der Kruskal-Wallis-Test zeigt mit $p < 0,001$ signifikante Unterschiede an. Im paarweisen Vergleich zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen multiplen Gruppen und den Kontrollen, jedoch keine zwischen den Gruppen kupferfrei und kupferhaltig ($p = 1,0$). Auch die soliden Probekörper unterschieden sich signifikant vom konditionierten Medium ($p < 0,001$). Dieses bedeutet, dass sich die zu vergleichenden Zemente nach 12 h nicht signifikant voneinander unterscheiden haben, beide jedoch eine deutliche Zytotoxizität zeigten.

Die Messung der Zellviabilität an Mausfibroblasten (L929) nach 24 h Inkubation mit Probekörpern / konditioniertem Medium ergab die in Tabelle 18, Abbildung 34 und Abbildung 35 aufgeführten Werte.

Tabelle 18: WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 24 h, Probekörpergruppen, Inkubation mit Probekörpern und konditioniertem Medium, Versuchsreihe a [relative Absorption].

	Min.	Q1	Median	Q3	Max.
Gruppe I	0,188	0,1918	0,194	0,220	0,243
Gruppe I b	0,221	0,222	0,223	0,225	0,229
Gruppe II	0,173	0,191	0,202	0,214	0,225
Gruppe II b	0,2	0,207	0,227	0,229	0,229
Gruppe III	0,153	0,181	0,193	0,195	0,219
Gruppe III b	0,215	0,219	0,222	0,223	0,235
Gruppe IV	0,206	0,211	0,216	0,219	0,232
Gruppe IV b	0,217	0,219	0,221	0,223	0,224
Gr. I + I b + III + III b	0,173	0,207	0,216	0,222	0,232
Gr. II + II b + IV + IV b	0,153	0,192	0,215	0,222	0,243
Kontrollgruppe	0,906	0,946	1,015	1,075	1,088

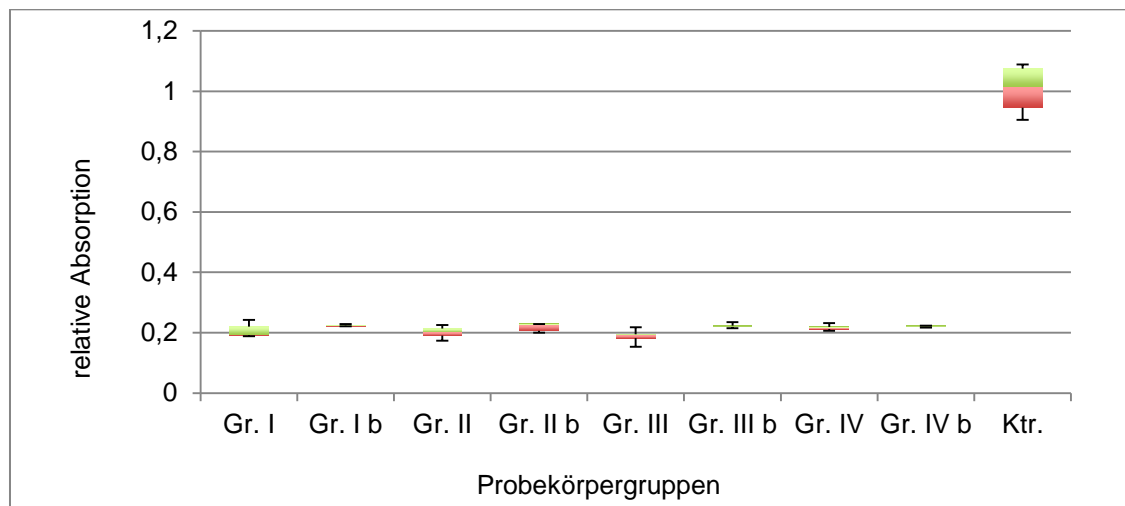


Abbildung 34: WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 24 h, Probekörpergruppen, Inkubation mit Probekörpern und konditioniertem Medium, Versuchsreihe a [relative Absorption] (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

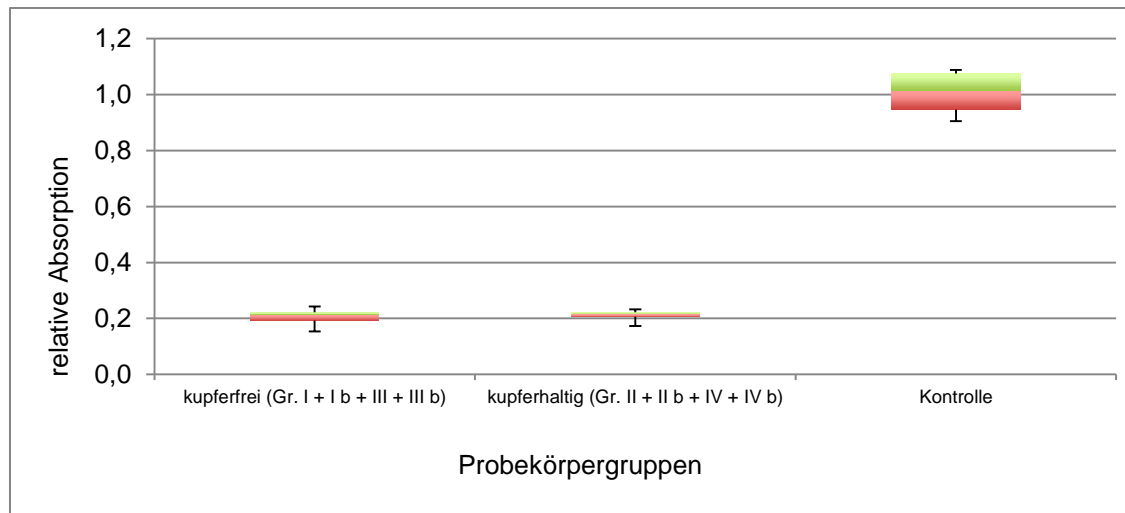


Abbildung 35: WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 24 h, kupferfrei/kupferhaltig, Inkubation mit Probekörpern und konditioniertem Medium, Versuchsreihe a [relative Absorption] (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

Die statistische Analyse erfolgte analog dem etablierten Schema. Der Test auf Varianzhomogenität war mit $p < 0,01$ signifikant, eine Homogenität der Varianzen liegt demnach nicht vor. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte mit $p < 0,001$ signifikante Unterschiede an. Der paarweise Vergleich offenbarte mehrere Mittelwertunterschiede mit $p < 0,05$ zwischen Probekörpergruppen und der Kontrolle. Es gab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen kupferhaltig und kupferfrei ($p = 1,0$). Die zu vergleichenden Zemente zeigten also nach 24 h keine signifikanten Unterschiede, jedoch eine deutliche zytotoxische Wirkung.

Versuchsreihe b

Die Messung der Zellviabilität an Mausfibroblasten (L929) ergab nach 6 h Inkubation mit Probekörpern die in Tabelle 19, Abbildung 36 und Abbildung 37 folgenden Werte.

Tabelle 19: WST-Test, L929Mausfibroblasten, 6 h, Inkubation, Versuchsreihe b, [relative Absorption].

	Min.	Q1	Median	Q3	Max.
Gruppe I	0,2176	0,22115	0,2247	0,228	0,2313
Gruppe II	0,2156	0,217	0,2184	0,22285	0,2273
Gruppe III	0,2083	0,21305	,02178	0,21955	0,2213
Gruppe IV	0,2016	0,20715	0,2127	0,2166	0,2205
Gruppen I + III	0,2083	0,21765	0,21955	0,22385	0,2313
Gruppen II + IV	0,2016	0,213425	0,217	0,219975	0,2273
Kontrollgruppe	0,2373	0,23845	0,2396	0,2397	0,2398

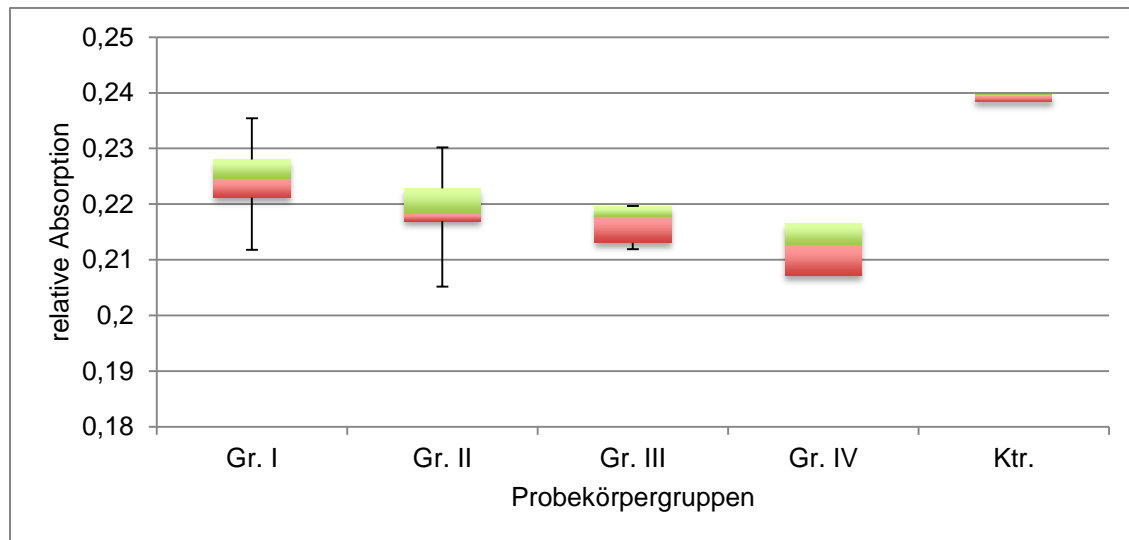


Abbildung 36: WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 6 h, Probekörpergruppen, Versuchsreihe b, [relative Absorption] (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

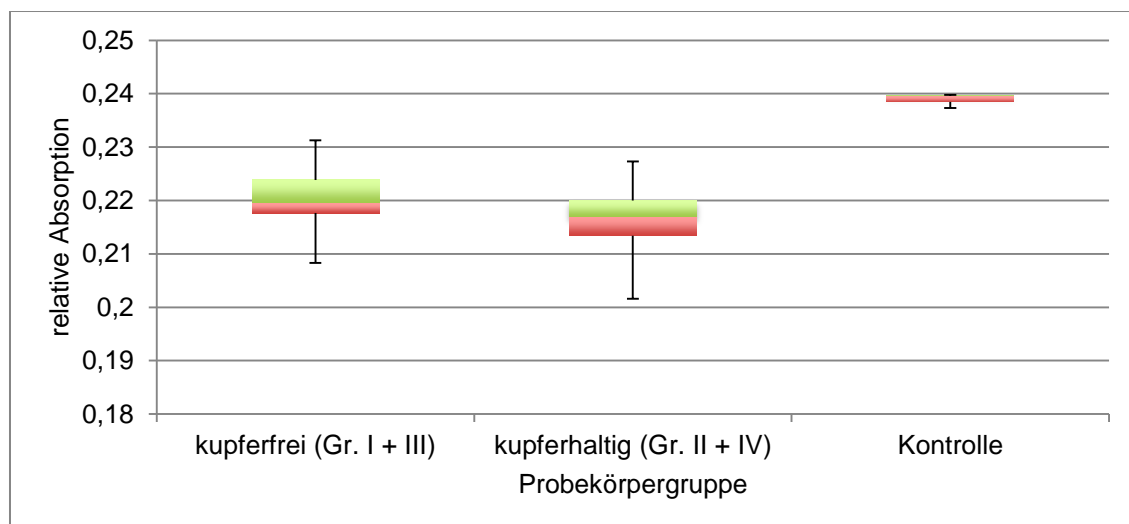


Abbildung 37: WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 6 h, kupferfrei/kupferhaltig, Versuchsreihe b, [relative Absorption] (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

Die statistische Analyse erfolgte analog dem etablierten Schema. Der Test auf Varianzhomogenität war mit $p < 0,739$ nicht signifikant, eine Homogenität der Varianzen liegt demnach vor. Der Test auf Normalverteilung war mit $p = 0,2$ nicht signifikant, es kann daher von einer Normalverteilung ausgegangen werden. Die ANOVA zeigte mit $p = 0,005$ signifikante Mittelwertunterschiede. Der Mehrfachvergleich nach Tukey zeigte mehrere signifikante Mittelwertunterschiede, so zwischen den Gruppen kupferfrei und der Kontrolle bzw. der Gruppe kupferhaltig und der Kontrolle ($p = 0,028$ und $p = 0,005$). Die Probekörpergruppen kupferfrei und kupferhaltig zeigten hierbei eine deutlich niedrigere relative Absorption und unterschieden sich untereinander nicht signifikant ($p = 0,956$). Die zu vergleichenden

Zemente zeigten somit nach 6 h keine signifikanten Unterschiede zueinander, jedoch eine signifikante zytotoxische Wirkung.

Die Messungen nach 24 h Inkubation an Mausfibroblasten führten zu den in Tabelle 20, Abbildung 38 und Abbildung 39 aufgelisteten Ergebnissen.

Tabelle 20: WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 24 h, Inkubation, Versuchsreihe b [relative Absorption].

	Min.	Q1	Median	Q3	Max.
Gruppe I	0,1863	0,18845	0,1906	0,2264	0,2622
Gruppe II	0,1811	0,18905	0,197	0,23395	0,2709
Gruppe III	0,2038	0,21995	0,2361	0,2486	0,2611
Gruppe IV	0,1955	0,2196	0,2437	0,25565	0,2676
Gruppen I + III	0,1863	0,1939	0,21995	0,25485	0,2622
Gruppen II + IV	0,1811	0,195875	0,22035	0,261625	0,2709
Kontrollgruppe	0,2533	0,2582	0,27865	0,889	0,2582

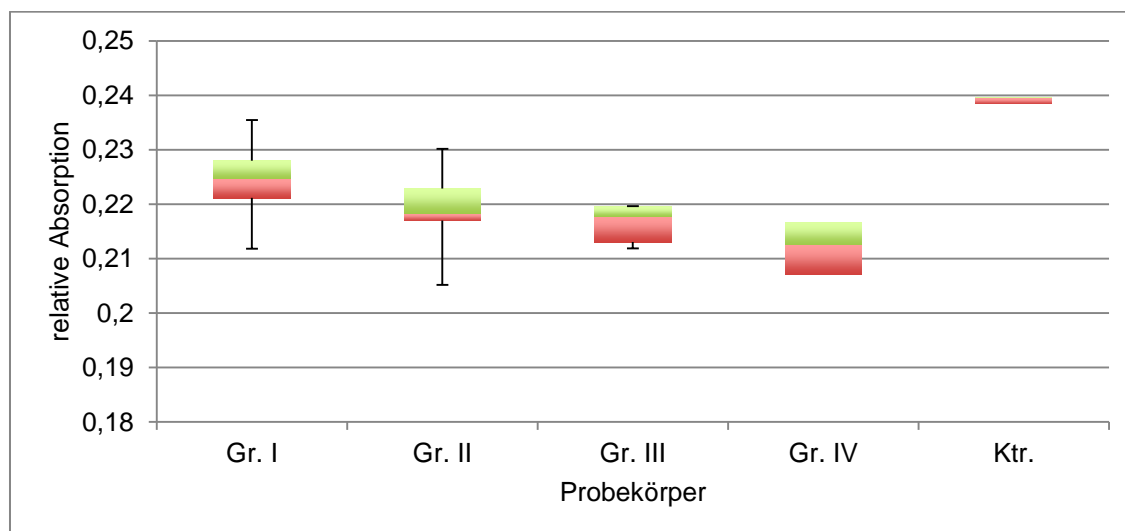


Abbildung 38: WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 24 h, Probekörpergruppen, Versuchsreihe b, [relative Absorption] (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

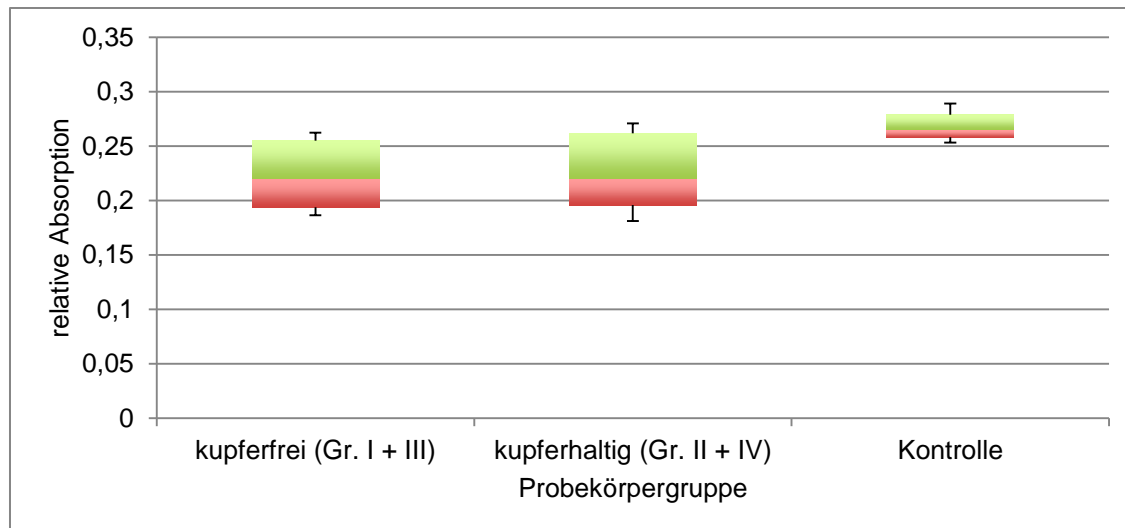


Abbildung 39: WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 24 h, kupferfrei/kupferhaltig, Versuchsreihe b, [relative Absorption] (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

Die statistische Analyse erfolgte analog dem etablierten Schema. Der Test auf Varianzhomogenität war mit $p = 0,046$ signifikant, eine Homogenität der Varianzen liegt demnach nicht vor. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte mit $p = 0,322$ keine signifikanten Unterschiede. Ein paarweiser Gruppenvergleich wurde daher nicht durchgeführt. Der Test zeigt, dass sich weder die zu vergleichenden Zemente noch andere Gruppen nach 24 h signifikant voneinander unterschieden haben. Ferner konnte für diesen Zeitpunkt keine signifikante zytotoxische Wirkung gezeigt werden.

Die Messungen nach 48 h Inkubation an Mausfibroblasten führten zu den in Tabelle 21, Abbildung 40 und Abbildung 41 aufgelisteten Ergebnissen.

Tabelle 21: WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 48 h, Inkubation, Versuchsreihe b), [relative Absorption].

	Min.	Q1	Median	Q3	Max.
Gruppe I	0,2044	0,2084	0,2124	0,21385	0,2153
Gruppe II	0,1846	0,1898	0,1947	0,199	0,2033
Gruppe III	0,1948	0,19985	0,2049	0,2086	0,2123
Gruppe IV	0,18	0,1863	0,1926	0,197	0,2014
Gruppen I + III	0,1948	0,204525	0,2086	0,212375	0,2153
Gruppen II + IV	0,18	0,186825	0,19365	0,199725	0,2033
Kontrollgruppe	0,2801	0,2958	0,3115	0,34455	0,3776

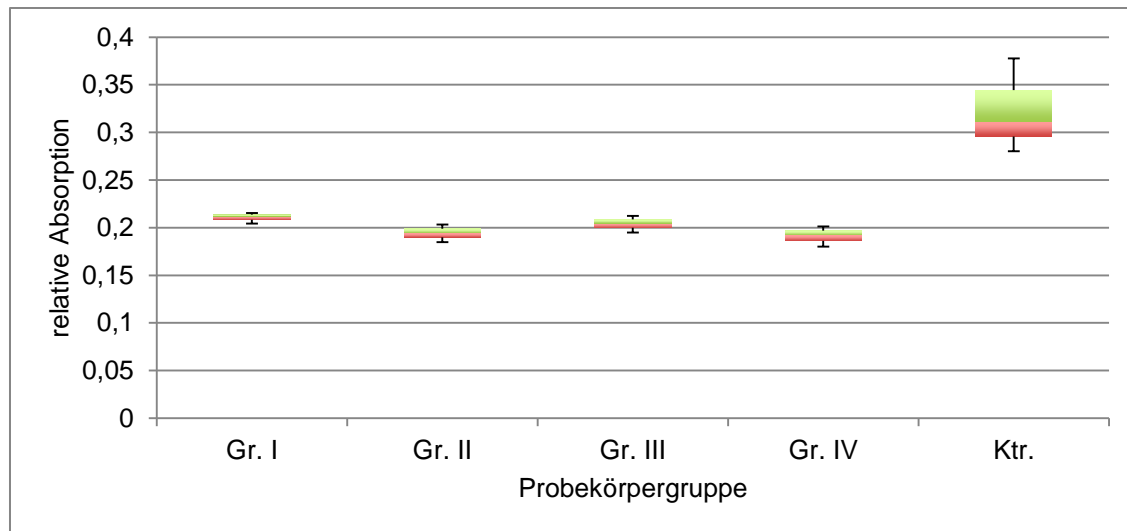


Abbildung 40: WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 48 h, Probekörpergruppen, Versuchsreihe b, [relative Absorption] (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

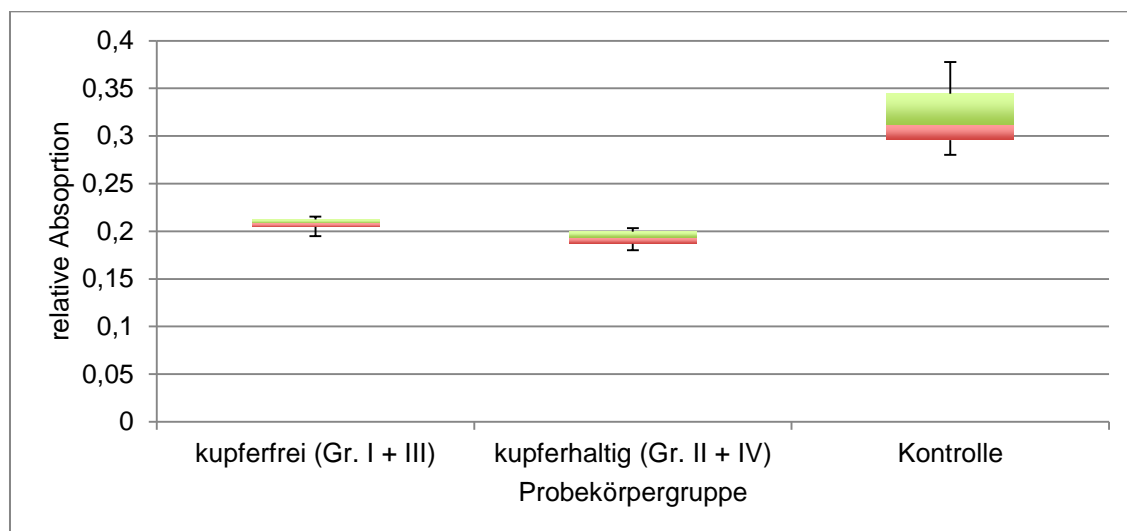


Abbildung 41: WST-Test, L929-Mausfibroblasten, 48 h, kupferfrei/kupferhaltig, Versuchsreihe b), [relative Absorption] (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

Die statistische Analyse erfolgte analog dem etablierten Schema. Der Test auf Varianzhomogenität war mit $p < 0,001$ signifikant, eine Homogenität der Varianzen liegt demnach nicht vor. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte mit $p = 0,05$ signifikante Unterschiede. Im paarweisen Vergleich zeigte sich nur die Gruppe IV signifikant von der Kontrolle verschieden ($p = 0,014$), alle anderen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant. Darunter fällt auch der Vergleich der Gruppen kupferfrei gegen kupferhaltig ($p = 1,0$). Es konnten somit nach 48 h keine signifikanten Unterschiede zwischen den zu untersuchenden Zementen gezeigt werden.

5.7 Zellviabilität Gingivafibroblasten (GF1)

Die Messung der Zellviabilität an Gingivafibroblasten (GF1) ergab nach 6 h Inkubation mit Probekörpern die in Tabelle 22, Abbildung 42 und Abbildung 43 folgenden Werte. Hohe Werte bedeuten eine hohe, niedrige eine geringe Zellaktivität.

Tabelle 22: WST-Test, GF1-Gingivafibroblasten, 6 h, Probekörpergruppen [relative Absorption].

	Min.	Q1	Median	Q3	Max.
Gruppe I	0,5303	0,5379	0,5455	0,5484	0,5513
Gruppe II	0,5097	0,54065	0,5716	0,5737	0,5758
Gruppe III	0,5869	0,59215	0,5974	0,62895	0,6605
Gruppe IV	0,5519	0,565	0,5781	0,594	0,6099
Gruppen I + III	0,5303	0,54695	0,5691	0,594775	0,6605
Gruppen II + IV	0,5097	0,556825	0,5737	0,577525	0,6099
Kontrollgruppe	0,6824	0,6843	0,6862	0,6867	0,6872

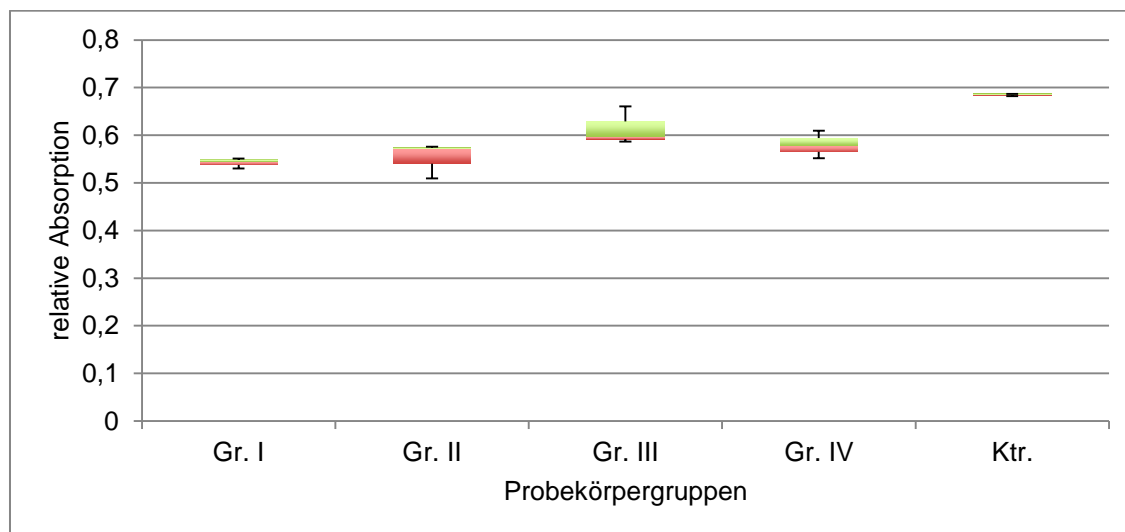


Abbildung 42: WST-Test, GF1-Gingivafibroblasten, 6 h, Probekörpergruppen [relative Absorption] (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

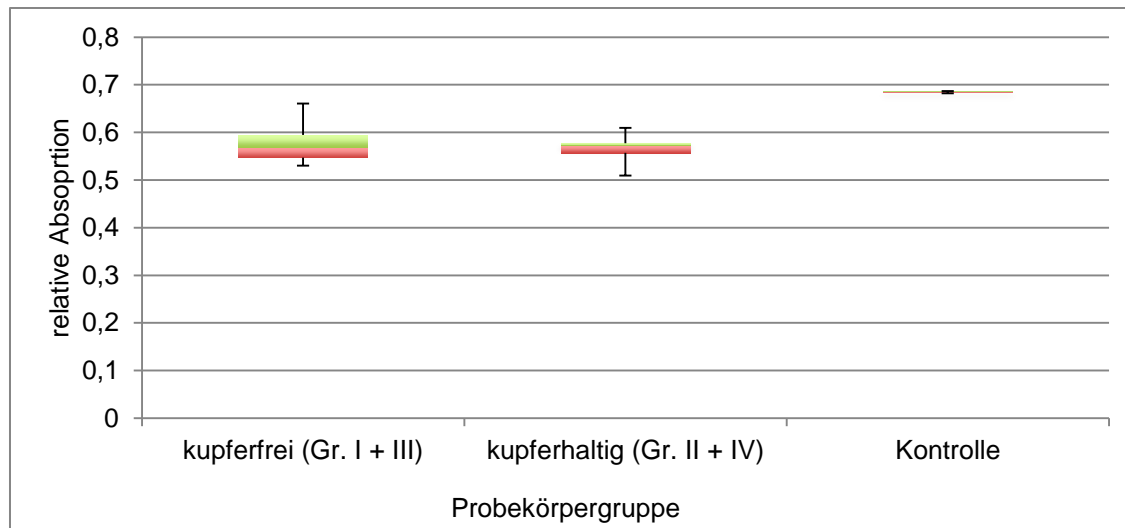


Abbildung 43: WST-Test, GF1-Gingivafibroblasten, 6 h, kupferfrei/kupferhaltig [relative Absorption] (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

Die statistische Analyse erfolgte analog dem etablierten Schema. Der Test auf Varianzhomogenität war mit $p = 0,194$ nicht signifikant, eine Homogenität liegt demnach vor. Der Test auf Normalverteilung war mit $p = 0,114$ nicht signifikant, es kann von einer Normalverteilung ausgegangen werden. Die ANOVA zeigte mit $p = 0,001$ signifikante Mittelwertunterschiede zwischen den Gruppen. Der Mehrfachvergleich nach Tukey zeigte multiple signifikante Mittelwertunterschiede, so u. a. zwischen den Gruppen kupferfrei und der Kontrolle bzw. der Gruppe kupferhaltig und der Kontrolle ($p = 0,006$ und $p = 0,002$). Die Probekörpergruppen kupferfrei und kupferhaltig zeigten eine niedrigere relative Absorption als die Kontrolle und unterschieden sich untereinander nicht signifikant ($p = 0,996$). Somit konnte nach 6 h kein signifikanter Unterschied zwischen den Zementen gezeigt werden. Es wurde jedoch eine signifikante zytotoxische Wirkung der Zemente deutlich.

Die Messung der Zellviabilität an Gingivafibroblasten (GF1) ergab nach 24 h Inkubation mit Probekörpern die in Tabelle 23, Abbildung 44 und Abbildung 45 folgenden Werte.

Tabelle 23: WST-Test, GF1-Gingivafibroblasten, 24 h, Probekörpergruppen [relative Absorption].

	Min.	Q1	Median	Q3	Max.
Gruppe I	0,2825	0,28545	0,2884	0,29575	0,3031
Gruppe II	0,2509	0,29005	0,3292	0,3402	0,3512
Gruppe III	0,2539	0,2867	0,3195	0,3561	0,3927
Gruppe IV	0,2154	0,2314	0,2474	0,26585	0,2843
Gruppen I + III	0,2539	0,283975	0,29575	0,3154	0,3927
Gruppen II + IV	0,2154	0,248275	0,2676	0,317975	0,3512
Kontrollgruppe	0,4235	0,42815	0,4328	0,4378	0,4428

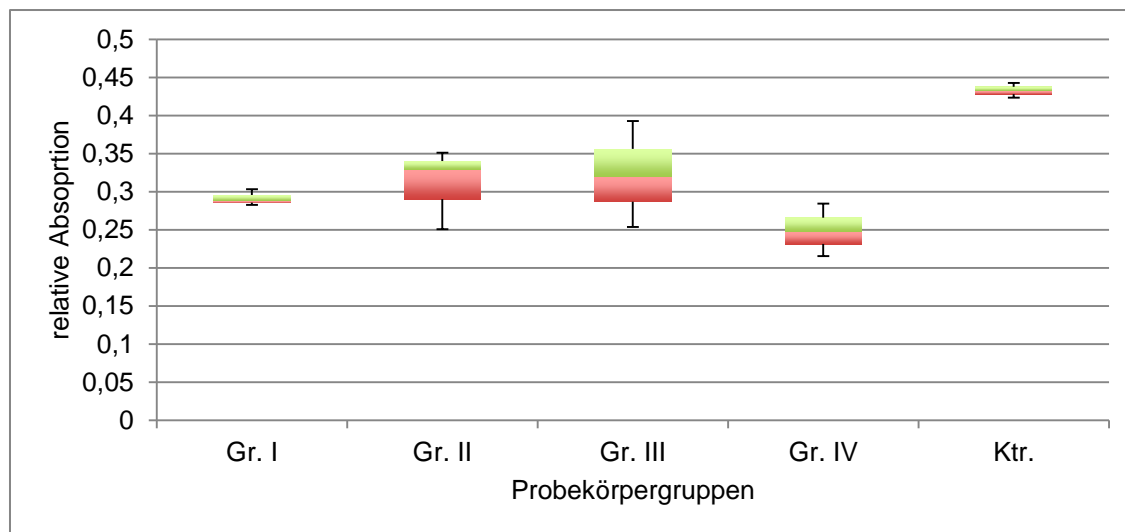


Abbildung 44: WST-Test, GF1-Gingivafibroblasten, 24 h, Probekörpergruppen [relative Absorption] (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

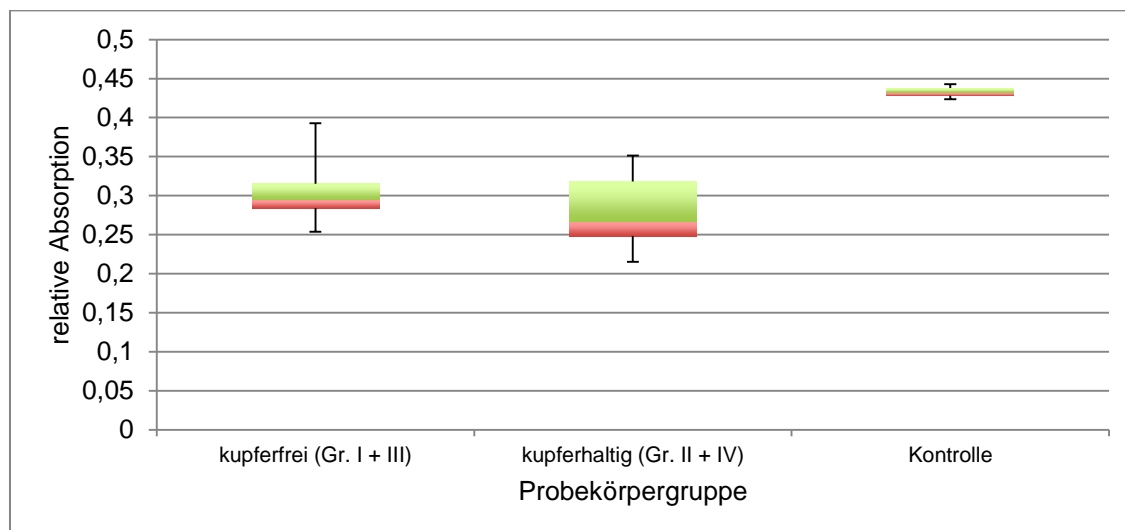


Abbildung 45: WST-Test, GF1-Gingivafibroblasten, 24 h, kupferfrei/kupferhaltig [relative Absorption] (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

Die statistische Analyse erfolgte analog dem etablierten Schema. Der Test auf Varianzhomogenität war mit $p = 0,258$ nicht signifikant, eine Homogenität der Varianzen liegt demnach vor. Der Test auf Normalverteilung war mit $p = 0,164$ nicht signifikant, es kann von einer Normalverteilung ausgegangen werden. Die ANOVA zeigte mit $p = 0,003$ signifikante Mittelwertunterschiede zwischen den Gruppen an. Der Mehrfachvergleich nach Tukey zeigte multiple signifikante Mittelwertunterschiede u. a. zwischen der Gruppe kupferfrei und der Kontrolle bzw. der Gruppe kupferhaltig und der Kontrolle ($p = 0,014$ und $p = 0,002$). Die Probekörpergruppen kupferhaltig und kupferfrei zeigten eine niedrigere relative Absorption als die Kontrollen und unterschieden sich untereinander nicht signifikant ($p = 0,946$). Nach 24 h konnten somit keine signifikanten Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Zementen gezeigt werden. Diese wiesen jedoch eine signifikante zytotoxische Wirkung auf.

Die Messung der Zellviabilität an Gingivafibroblasten (GF1) ergab nach 48 h Inkubation mit Probekörpern die in Tabelle 24, Abbildung 46 und Abbildung 47 aufgelisteten Werte.

Tabelle 24: WST-Test, GF1-Gingivafibroblasten, 48 h, Probekörpergruppen [relative Absorption].

	Min.	Q1	Median	Q3	Max.
Gruppe I	0,3412	0,3461	0,351	0,3566	0,3622
Gruppe II	0,3018	0,3527	0,4036	0,433	0,4624
Gruppe III	0,2482	0,34345	0,3787	0,4259	0,4731
Gruppe IV	0,2195	0,2227	0,2259	0,23445	0,243
Gruppen I + III	0,2482	0,34365	0,3566	0,374575	0,4731
Gruppen II + IV	0,2195	0,230175	0,2724	0,37815	0,4624
Kontrollgruppe	0,525	0,52565	0,5263	0,53075	0,5352

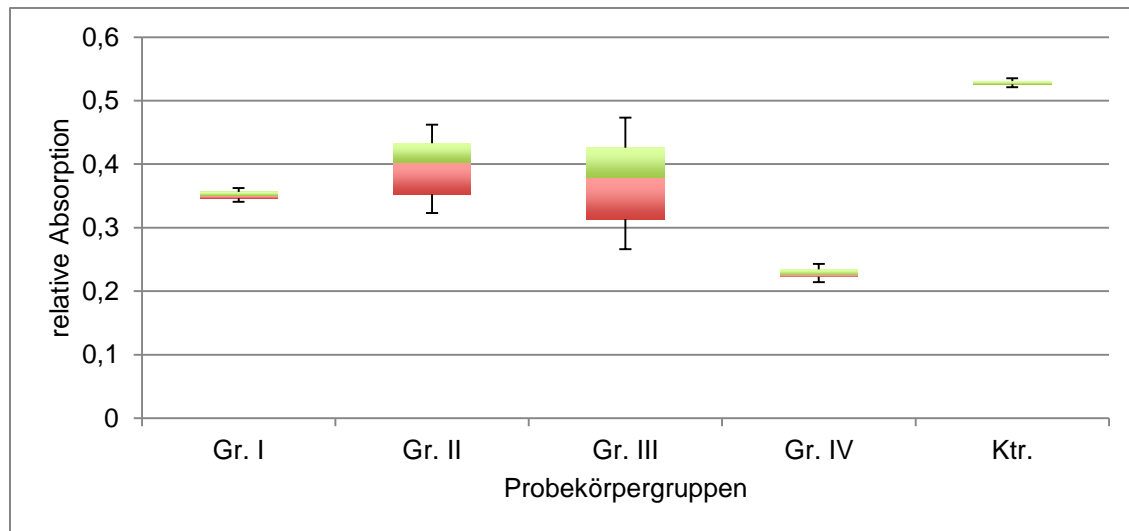


Abbildung 46: WST-Test, GF1-Gingivafibroblasten, 48 h, Probekörpergruppen [relative Absorption] (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

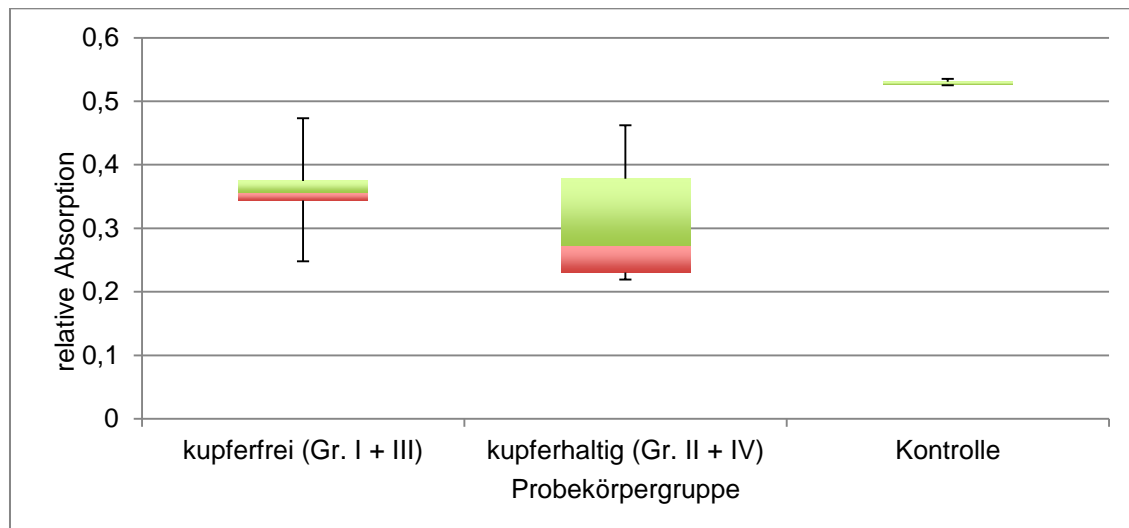


Abbildung 47: WST-Test, GF1-Gingivafibroblasten, 48 h, kupferhaltig/kupferfrei [relative Absorption] (Maximalwert, Q3, Median, Q2, Minimalwert).

Die statistische Analyse erfolgte analog dem etablierten Schema. Der Test auf Varianzhomogenität war mit $p = 0,06$ nicht signifikant, eine Homogenität der Varianzen liegt demnach vor. Der Test auf Normalverteilung war mit $p = 0,122$ nicht signifikant, es kann daher von einer Normalverteilung ausgegangen werden. Die ANOVA zeigte mit $p = 0,005$ signifikante Mittelwertunterschiede zwischen den Gruppen. Der Mehrfachvergleich zeigte diese u. a. zwischen der Gruppe kupferhaltig und der Kontrolle ($p = 0,009$), nicht jedoch zwischen der Gruppe kupferfrei und der Kontrolle ($p = 0,065$). Die Gruppen kupferfrei und kupferhaltig unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($p = 0,913$). Es konnten nach 48 h keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei zu vergleichenden Zementen gezeigt werden.

5.8 Lichtmikroskopie Mausfibroblasten (L929)

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigten bei den Mausfibroblasten der Kontrollgruppe nach 24 h Wachstum und eine regelrechte, spindelförmige Morphologie und Größe (siehe Abbildung 48). Nur vereinzelt sind kugelförmige Zellen zu sehen, welche als Zeichen nicht optimaler Bedingungen und / oder beginnenden Absterbens zu werten sind.

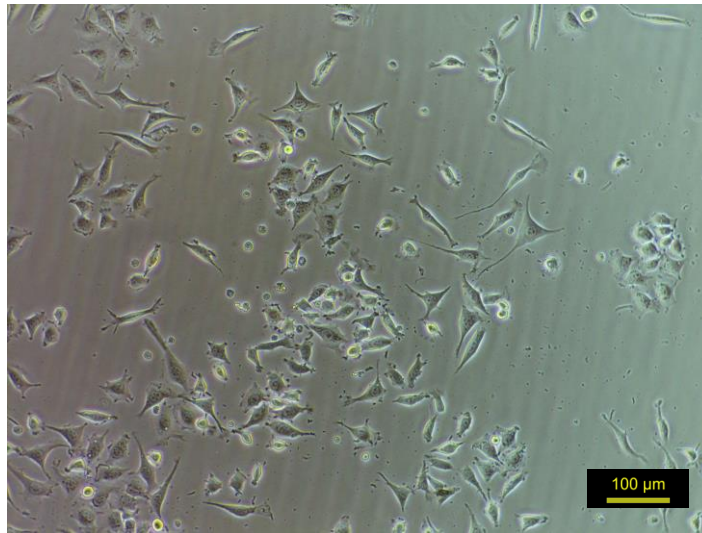


Abbildung 48: L929-Mausfibroblasten, Kontrollgruppe, 24 h Inkubation.

Die Aufnahmen der Probekörpergruppen (exemplarisch I, II, III B und IV B) zeigen nach 24 h nur vereinzelt spindelförmige Zellen mit normaler Größe, dafür jedoch einen großen Anteil an kugelförmigen Zellen (siehe Abbildung 49, Abbildung 50, Abbildung 51 und Abbildung 52).

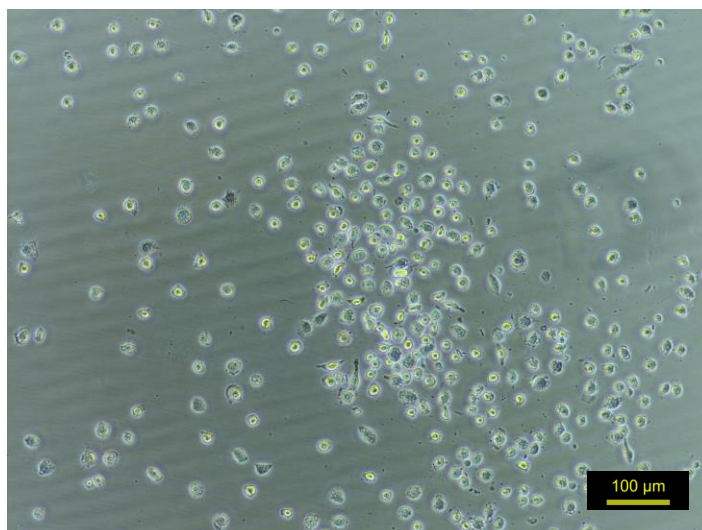


Abbildung 49: L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe I, 24 h Inkubation.

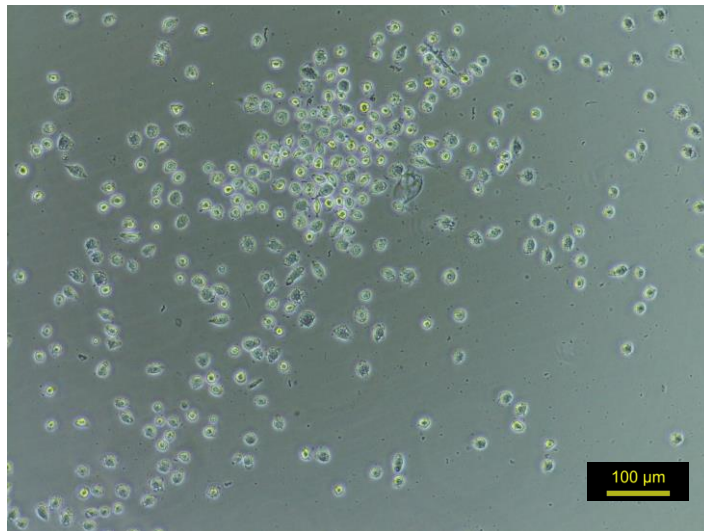


Abbildung 50: L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe II, 24 h Inkubation.

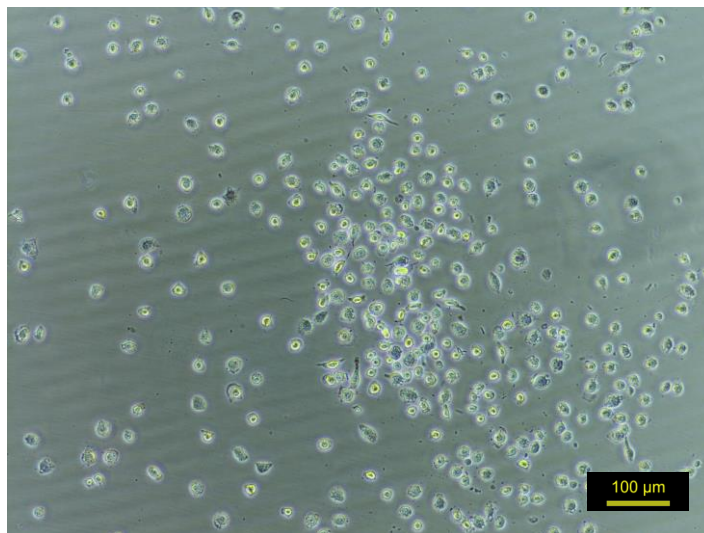


Abbildung 51: L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe III B, 24 h Inkubation.

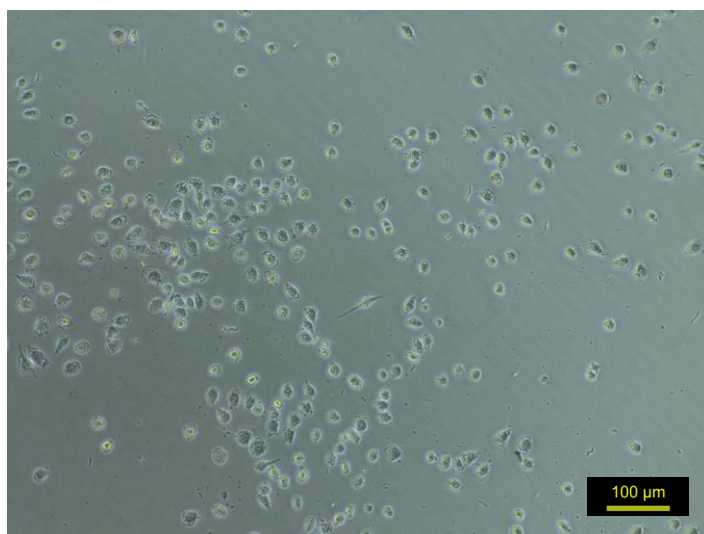


Abbildung 52: L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe IV B, 24 h Inkubation.

Die nach weiteren 24 h Inkubation angefertigten Bilder zeigen bei der 48-h-Kontrollgruppe einen beinahe geschlossenen Monolayer (siehe Abbildung 53). Die Zellen verfügen über eine regelrechte spindelförmige Morphologie sowie Größe, es sind nur stark vereinzelt kugelförmige Zellen zu erkennen.

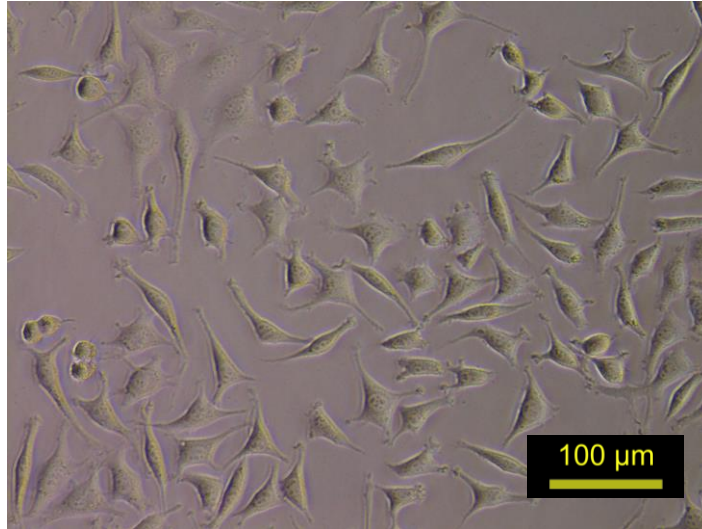


Abbildung 53: L929-Mausfibroblasten, Kontrollgruppe, 48 h Inkubation.

Die Aufnahmen der Probekörpergruppen (exemplarisch Gruppen III, IV und II B) zeigen nach 48 h nur noch vereinzelt Zellen, von denen wenige Zellen Ansätze einer Sichelform zeigen und reduziert in ihrer Größe sind (siehe Abbildung 54, Abbildung 55 und Abbildung 56). Die verbliebenen Zellen sind größtenteils kugelförmig.

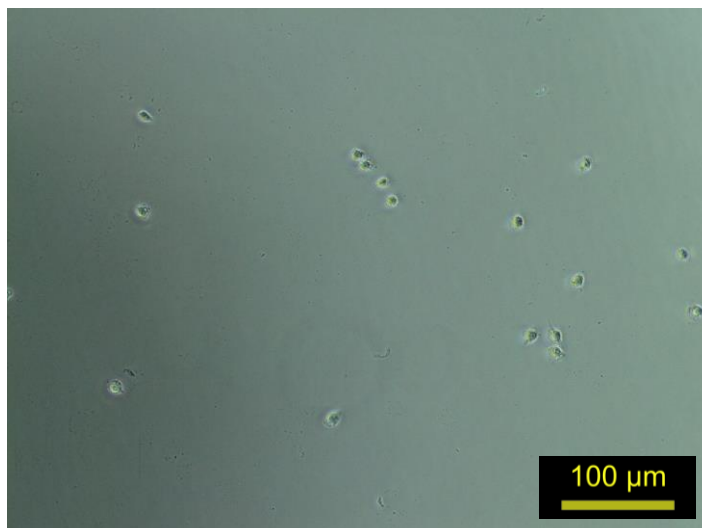


Abbildung 54: L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe III, 48 h Inkubation.

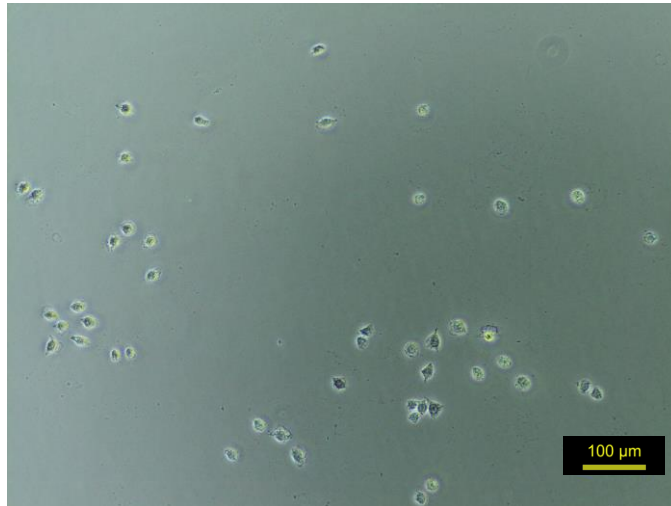


Abbildung 55: L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe IV, 48 h Inkubation.

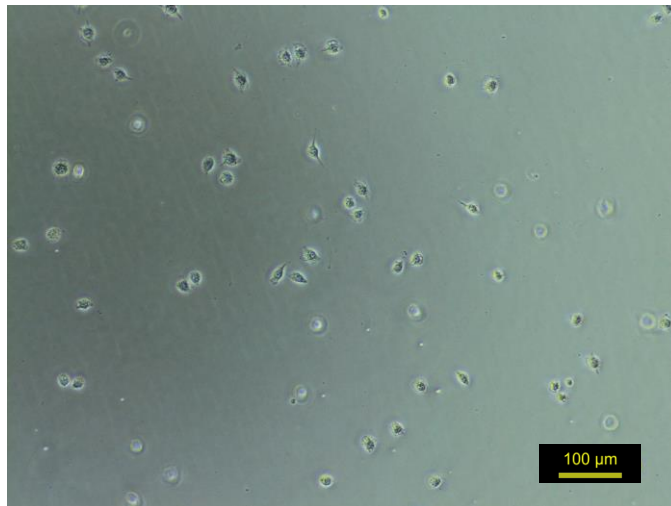


Abbildung 56: L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe II B, 48 h Inkubation.

5.9 Lichtmikroskopie Gingivafibroblasten (GF1)

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen die humanen GF1-Gingivafibroblasten in der Kontrollgruppe nach 24 h als beinahe geschlossenen Zellrasen. Auch in den Probekörpergruppen II und III ist eine große Anzahl von GF1-Zellen zu erkennen.

Die nach 48 h aufgenommenen Bilder zeigen ebenfalls einen hohen Besatz mit Zellen in allen Probekörpergruppen (Kontrollgruppe sowie exemplarische Probekörpergruppen II und IV).

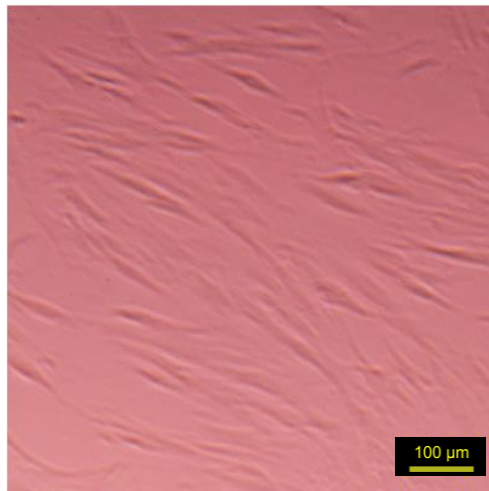


Abbildung 57: GF1-Gingivafibroblasten, Kontrollgruppe, 24 h Inkubation.

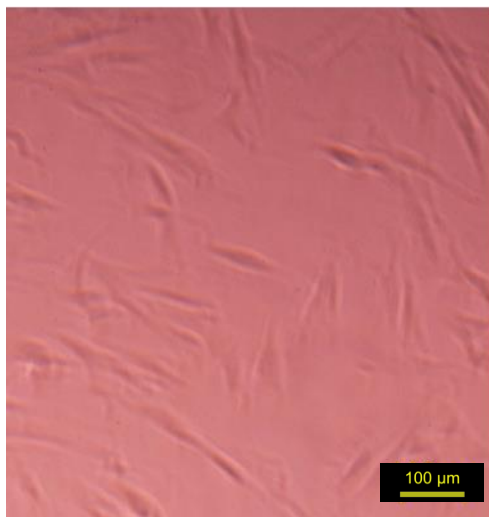


Abbildung 58: GF1-Gingivafibroblasten, Probekörpergruppe II, 24 h Inkubation.

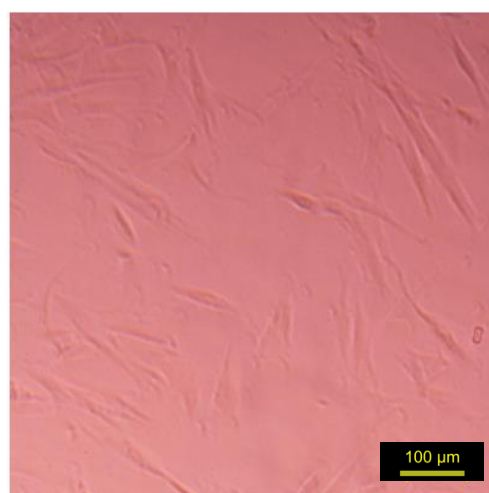


Abbildung 59: GF1-Gingivafibroblasten, Probekörpergruppe III, 24 h Inkubation.

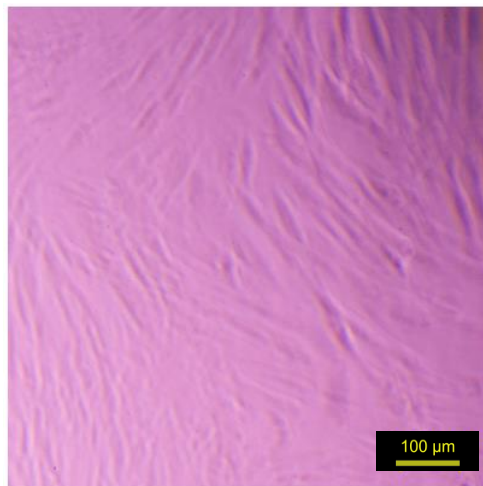


Abbildung 60: GF1-Gingivafibroblasten, Kontrollgruppe, 48 h Inkubation.

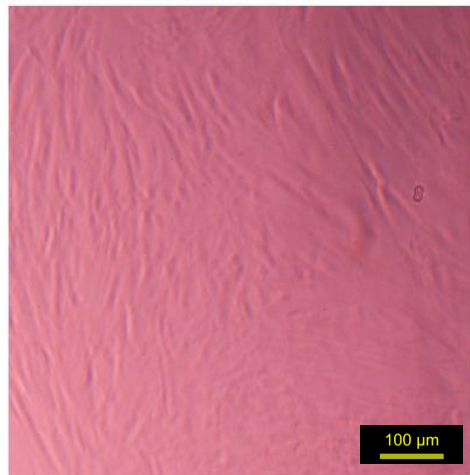


Abbildung 61: GF1-Gingivafibroblasten, Probekörpergruppe I, 48 h Inkubation.

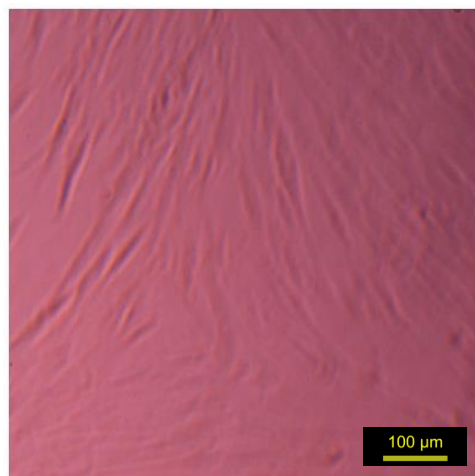


Abbildung 62: GF1-Gingivafibroblasten, Probekörpergruppe IV, 48 h Inkubation.

5.10 Elektronenspektroskopie (ESCA / XPS)

Die Ergebnisse der ESCA / XPS Untersuchungen sind in Tabelle 25 und Tabelle 26 aufgeführt.

Tabelle 25: Ergebnisse ESCA / XPS, detailliert [Atomprozent].

PK Cu Lagerung 6 Monate	PK Cu Lagerung 1 Monat	PK Cu neu	Element E _B (eV)
5,7	3,2	3,9	C3 288,2
5,9	4,0	5,1	C2 286,5
14,9	16,2	11,0	C1 284,6
50,1	52,4	56,6	O
0,7	-	-	N2 401,4
2,9	1,2	1,4	N1 399,7
4,0	1,8	-	Zn2 1023,8
7,8	12,1	12,5	Zn1 1021,5
0,4	0,2	0,3	Cu
-	0,6	2,6	P2 135,9
6,9	6,7	5,4	P1 133,5
-	0,2	-	Mg2 1305,9
0,4	1,2	1,1	Mg1 1303,8
0,1	0,2	0,2	Ca

Tabelle 26: Ergebnisse ESCA / XPS, gruppiert [Atomprozent].

PK Cu Lagerung 6 Monate	PK Cu Lagerung 1 Monat	PK Cu neu	Element E _B (eV)
26,5	23,4	20,0	C
50,1	52,4	56,6	O
3,6	1,2	1,4	N
11,8	13,9	12,5	Zn
0,4	0,2	0,3	Cu
6,9	7,3	8,0	P
0,4	1,4	1,1	Mg
0,1	0,2	0,2	Ca

Die Ergebnisse zeigen eine insgesamt niedrige oberflächliche Lokalisation von Kupfer (0,2 – 0,4 Atomprozent).

5.11 Rasterelektronenmikroskopie

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen u. a. Zellen von *Candida albicans* auf der Probekörperoberfläche (siehe Abbildung 63) und gehäuft in Porositäten der Oberfläche (siehe Abbildung 64). Die Aufnahmen nach der Inkubation mit *Streptococcus sanguinis* zeigen gut sichtbare Bakterienketten (siehe Abbildung 65 und Abbildung 66). Durch Vorbehandlung für das REM ausgetrocknete Mausfibroblasten (siehe Abbildung 67) zeigen teilweise noch zytoplasmatische Fortsätze (siehe Abbildung 68). Den REM-Aufnahmen wird jeweils ein nachbearbeitetes Falschfarbenbild beigefügt, das ausschließlich der besseren Erkennbarkeit der abgebildeten Zellen dienen soll.

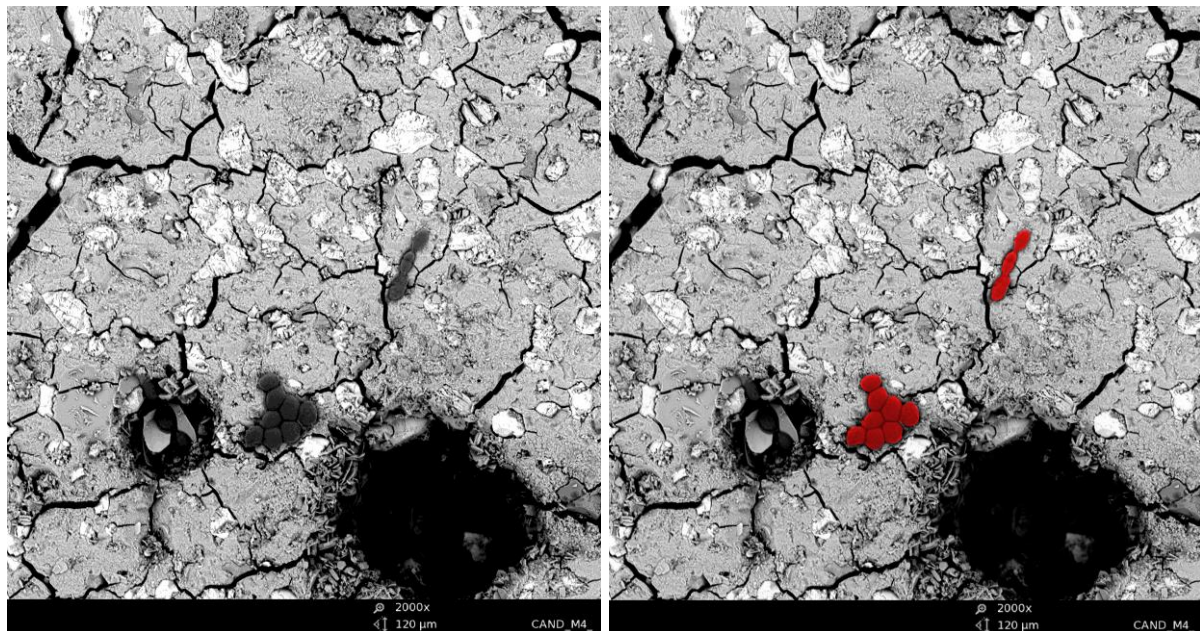


Abbildung 63: REM, 2000x Vergrößerung, *Candida albicans*, Probekörpergruppe IV, (links unbearbeitet, rechts mit Falschfarben).

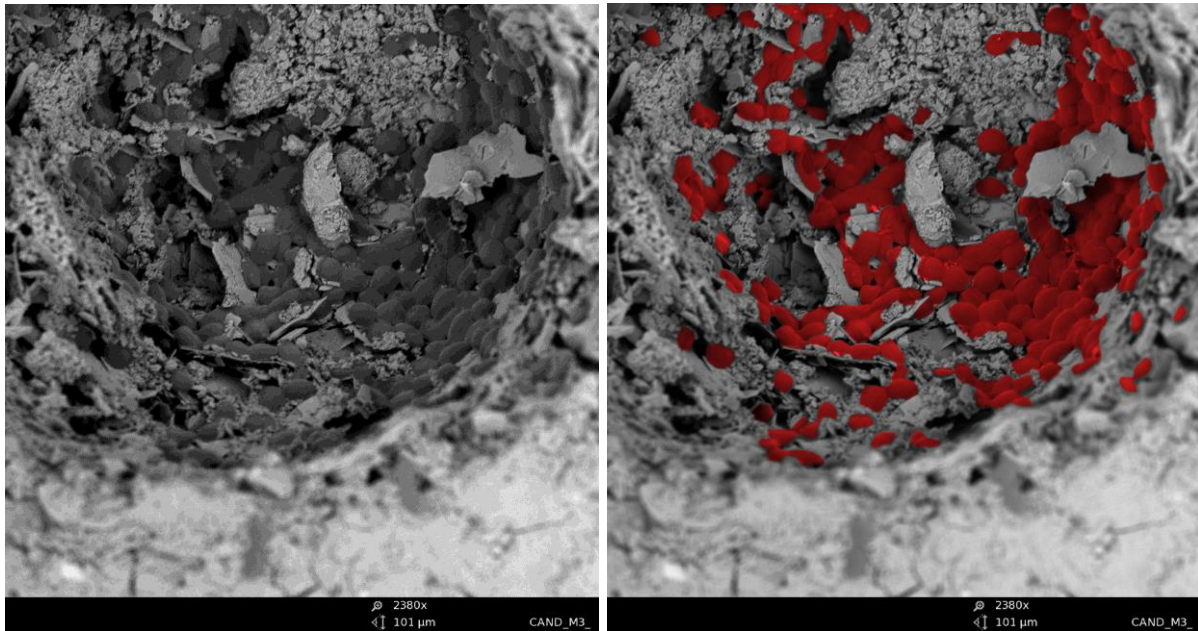


Abbildung 64: REM, 2380x Vergrößerung, *Candida albicans*, Probekörpergruppe III (links unbearbeitet, rechts mit Falschfarben).

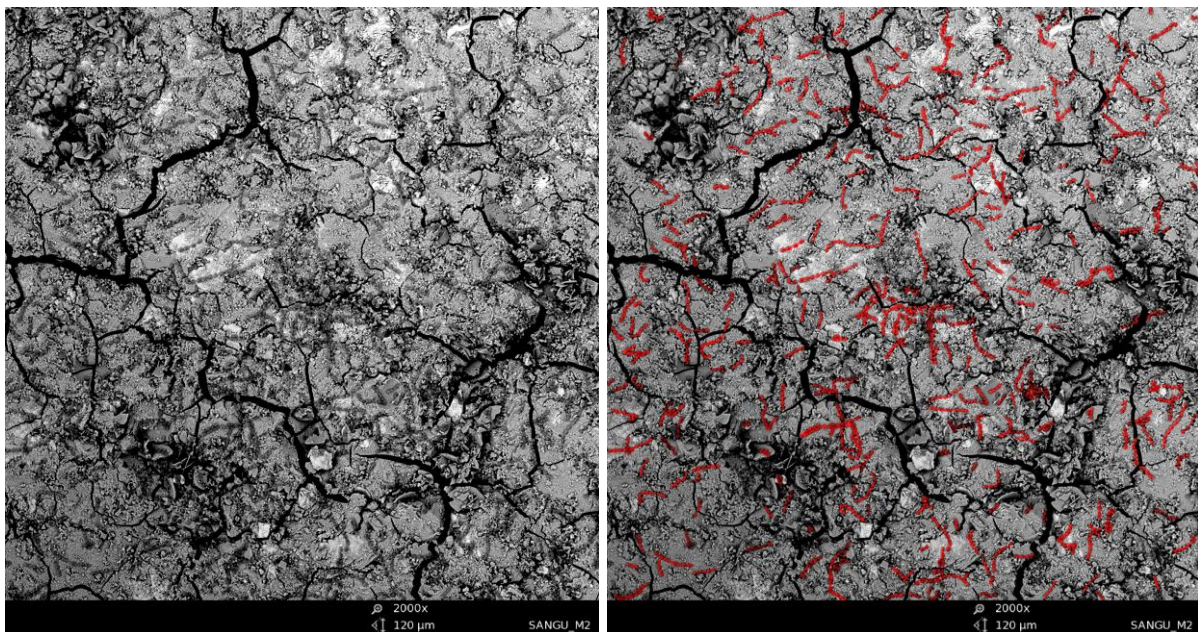


Abbildung 65: REM, 2000x Vergrößerung, *Streptococcus sanguinis*, Probekörpergruppe II (links unbearbeitet, rechts mit Falschfarben).

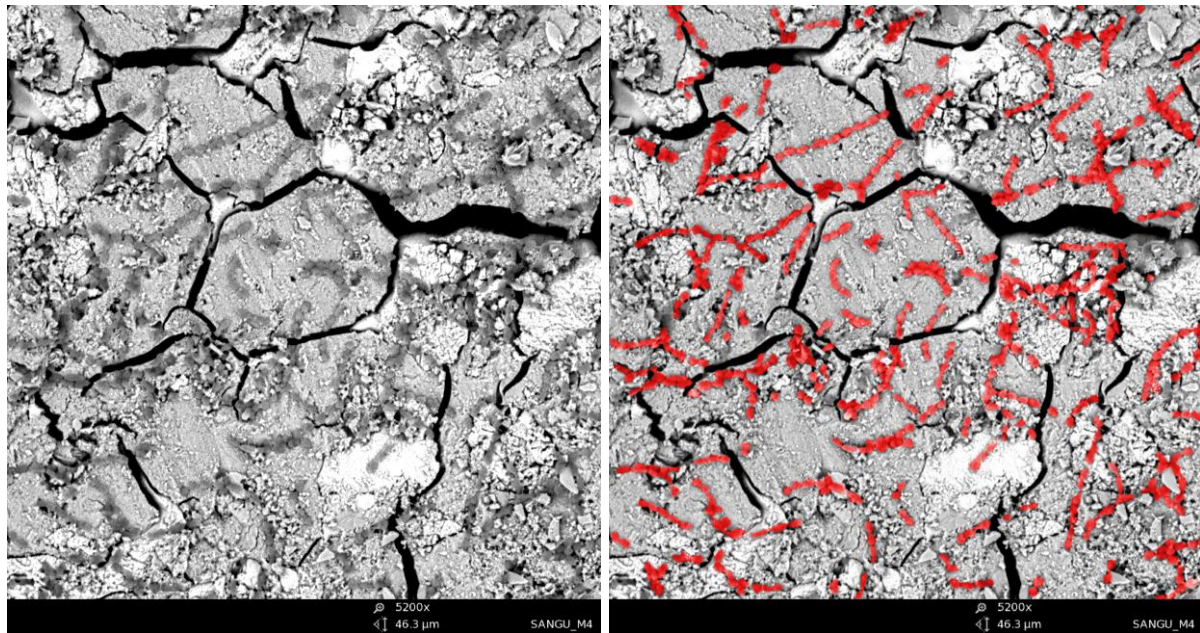


Abbildung 66: REM, 5200x Vergrößerung, *Streptococcus sanguinis*, Probekörpergruppe IV (links unbearbeitet, rechts mit Falschfarben).

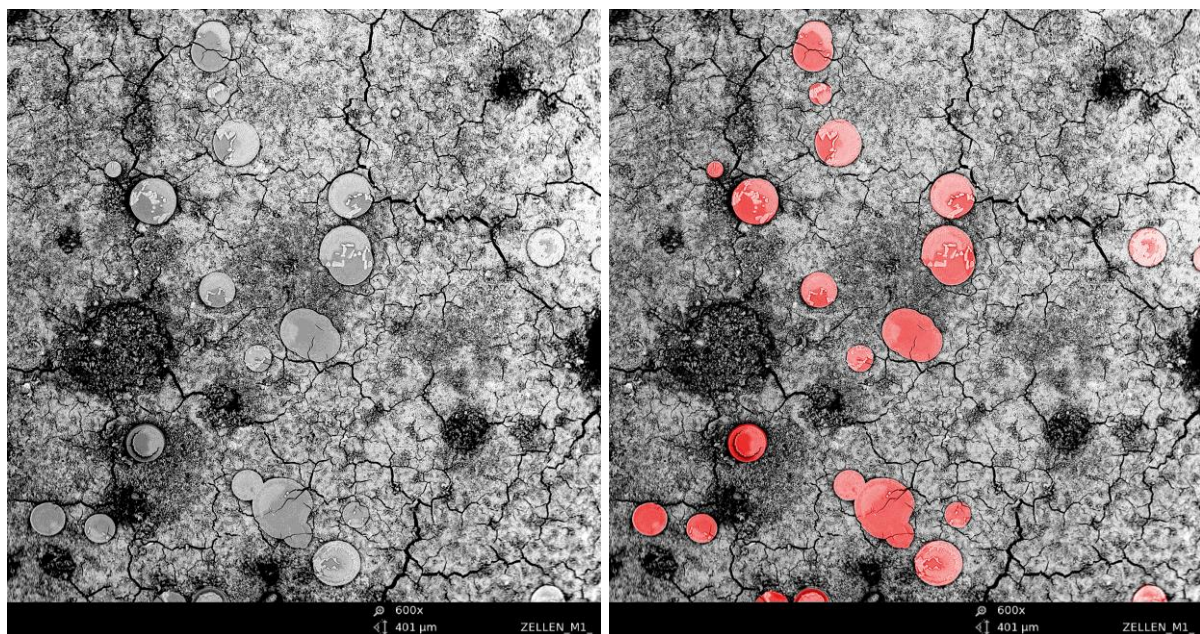


Abbildung 67: REM, 600x Vergrößerung, L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe I (links unbearbeitet, rechts mit Falschfarben).

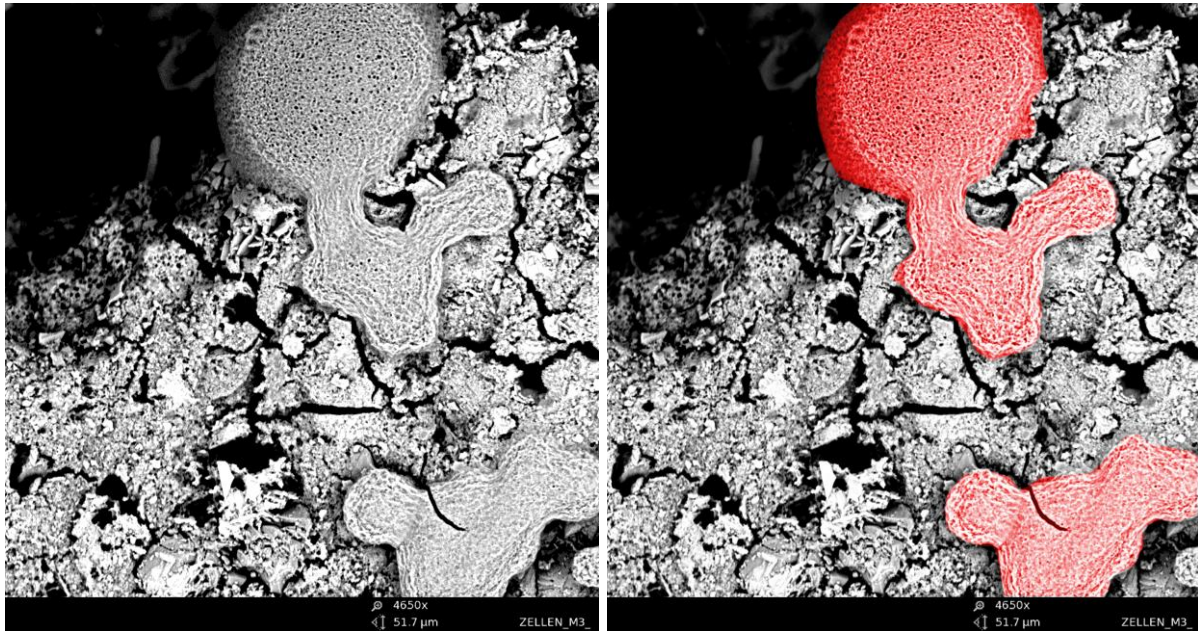


Abbildung 68: REM, 4650x Vergrößerung, L929-Mausfibroblasten, Probekörpergruppe III (links unbearbeitet, rechts mit Falschfarben).

5.12 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die beiden verglichenen Zemente zeigten keine signifikant unterschiedliche Rauheit, bei einer Rauheit von $R_A = 1,0 \mu\text{m}$ bzw. $R_A = 1,2 \mu\text{m}$ im Median. Die freie Oberflächenenergie der Gruppen kupferfrei und kupferhaltig unterschied sich signifikant, jedoch ist der Unterschied (kupferfrei $33,55 \pm 2,09 \text{ mN/m}$ vs. kupferhaltig $37,42 \pm 1,68 \text{ mN/m}$) klinisch nicht relevant.

Die Anlagerungsversuche mit *Candida albicans* zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen kupferhaltig und kupferfrei. Die Anlagerungsversuche mit *Streptococcus sanguinis* konnten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den Probekörpergruppen kupferfrei und kupferhaltig belegen.

Die Testung auf mögliche zytotoxische Eigenschaften an Mausfibroblasten zeigte zwar starke Effekte der Probekörper *per se* und der konditionierten Medien verglichen mit den Kontrollen, jedoch keine reproduzierbaren Unterschiede zwischen den Gruppen kupferfrei und kupferhaltig.

Die Versuche mit den GF1-Gingivafibroblasten zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen kupferfrei und kupferhaltig, jedoch insgesamt signifikante Unterschiede der Probekörper gegen die Kontrollgruppen. Die Probekörpergruppen zeigten hier wie bei den Versuchen mit den Mausfibroblasten eine deutlich niedrigere relative Absorption.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigten exemplarisch mit den WST-Tests vergleichbare Zellzustände in den Probekörper- und Kontrollgruppen, sowohl für die Maus- als auch die Gingivafibroblasten. Die ESCA / XPS-Resultate zeigten eine insgesamt niedrige (0,2 – 0,5 Atomprozent) oberflächliche Lokalisation von Kupfer. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen belegten, dass eine Adhäsion von *Candida albicans*, *Streptococcus sanguinis* und Mausfibroblasten auf den Probekörpern stattgefunden hatte.

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Studie keine signifikanten Unterschiede in den mikrobiologischen und zytologischen Eigenschaften der beiden Zemente gefunden.

Die in der Fragestellung postulierten Hypothesen können demnach wie folgt beantwortet werden:

1. Der kupferhaltige Zinkoxidphosphatzement hat kein niedrigeres Potential zur Anlagerung von *Streptococcus sanguinis* und *Candida albicans* als der kupferfreie Zinkoxidphosphatzement gezeigt.
2. Der kupferhaltige Zinkoxidphosphatzement hat kein höheres zytotoxisches Potential auf Mausfibroblasten und humane Gingivafibroblasten als der kupferfreie Zinkoxidphosphatzement gezeigt. (Beide zeigten jedoch ein ähnliches und anscheinend hohes zytotoxisches Potential.)
3. Der kupferhaltige Zinkoxidphosphatzement zeigte keine relevante Kupferfreisetzung über einen längeren Zeitraum.

6. Diskussion

6.1 Diskussion der Methodik

6.1.1 Konzept

Zur Analyse von Biofilmen und mikrobieller Adhäsion sind zahlreiche verschiedene Ansätze und Modelle entwickelt worden, bei deren Konzeption grundsätzlich zwischen *in vitro* und *in vivo* unterschieden wird (Lebeaux et al. 2013). Während *In-vitro*-Modelle nur Teile des zuvor beschriebenen komplexen Systems der Biofilmbildung nachbilden, geben *In-vivo*-Versuche die Bildung von Biofilmen realitätsnäher wieder (Wimpenny 1997). Die Vorteile einer solchen genauen Reproduktion gehen jedoch mit einer erhöhten Anzahl an nicht reproduzierbaren Störgrößen einher, die u. a. durch Wirtsfaktoren wie Immunsystem, Medikamenteneinnahme oder Speichelzusammensetzung bestimmt werden (Lebeaux et al. 2013; Wimpenny 1997). Vorteilhaft bei der Wahl eines *In-vitro*-Versuchsaufbaus ist im Gegenzug der Ausschluss vieler Störfaktoren (Standardisierung der Bedingungen) bei gleichzeitig einfacherer Handhabbarkeit und einem erhöhten Probendurchsatz – und damit eine höhere Reproduzierbarkeit (Coenye und Nelis 2010). Zur Evaluierung einer möglichen Wirksamkeit des Kupferzusatzes wurden daher zwei Studien in der Forschungsgruppe angelegt, von denen die vorliegende den *In-vitro*-Teil repräsentiert. Im Rahmen der *In-vitro*-Versuche sollen die physiko-chemischen Parameter der Zemente untersucht und unter kontrollierten Laborbedingungen Untersuchungen mit Modellorganismen durchgeführt werden. Hierbei orientiert sich das Studienkonzept an etablierten und erprobten Techniken und Versuchsabläufen zu vergleichbaren Fragestellungen (Burgers et al. 2010a; Faltermeier et al. 2008; Gosau et al. 2010b; Hahnel et al. 2012). Eine Übertragbarkeit so gewonnener *In-vitro*-Erkenntnisse auf eine *In-vivo*-Situation ist trotz der Limitationen möglich (Burgers et al. 2010a). In der sich anschließenden *In-vivo*-Studie am Probanden wurden die hier gewonnenen Ergebnisse bestätigt (*Med. Diss. Göttingen, Dr. Felix Malinski, noch nicht erschienen*).

6.1.2 Probekörper

Die Herstellung solider Probekörper in den gewählten Dimensionen ist aus Gründen der Praktikabilität und insbesondere der Messungen von Rauheit und freier Oberflächenenergie erforderlich (Mindestgröße der Tropfen, Mindestmessstrecke). Gleichwohl stellen die so produzierten Probekörper eine vergleichsweise große Masse an Zement mit einer ebenso großen Oberfläche dar. Ein Randspalt wird in der Praxis unter klinischen Bedingungen bis 0,1 mm als akzeptabel bewertet (Bronson et al. 2005). Bei einem Zementspalt von 0,1 mm und einem Kronenumfang von ca. 35 mm würde eine Krone über einen Zementspalt mit einer Gesamtfläche von 3,5 mm² verfügen. Die in den Versuchen wirksame Oberfläche eines Probekörpers (eine Seite, ohne Flanken) beträgt rund 79 mm², d. h. mehr als das 20-fache. Eventuelle vom Probekörper ausgehende und *in vitro* gemessene Effekte müssen entsprechend relativiert betrachtet werden. Darüber hinaus ist das Einbringen von relativ großen Mengen an Zement bei der Probekörperherstellung in Formen nicht problemlos möglich. Lufteinschlüsse bzw. Poren sind die Folge. Diese wurden bereits in anderen Studien, auch unter hoch kontrollierten Bedingungen (Kapselsysteme statt manueller Mischung) beschrieben, scheinen in der vorliegenden Studie jedoch in erhöhter Anzahl vorzuliegen (Fleming et al. 1999; Fleming et al. 2003; Servais und Cartz 1971).

Um die eventuelle Freisetzung von Materialbestandteilen in flüssigen Medien zu ermöglichen und damit eine Alterung zu simulieren, wurden die Probekörper in *Aqua dest.* gelagert. Die Lagerung in Wasser stellt eine häufige und praktikable Methode zum künstlichen Altern von Materialien dar (Hanks et al. 1981; Schedle et al. 1998; Schmid-Schwab et al. 2009). Zeit- und materialintensivere Methoden wie *Thermocycling* wären Alternativen gewesen. Hierbei bewirken thermische Lastwechsel eine Alterung der Probekörper (Blumer et al. 2015). Da der Fokus auf einem Vergleich zweier Zemente lag und die Lagerung in Wasser bereits deutliche Alterungseffekte erzeugt, wurde aus Gründen der Praktikabilität auf ein *Thermocycling* verzichtet.

6.1.3 Physiko-chemische Analysen

Die Rauheitsmessungen erfolgten mittels Tastschlittenprinzip. Alternativen hierzu sind bspw. die *atomic force microscopy* (AFM, Atomkraftmikroskopie) und berührungslose optische Verfahren wie Weißlichtinterferometrie oder konfokale

Laserscanningmikroskopie (Duparre et al. 2002). Die Ergebnisse dieser Methoden unterscheiden sich bei verschiedenen Fragestellungen und Materialien geringfügig (Vorburger et al. 2007). Für die vorliegende Fragestellung erscheint die Methode mittels Tastschlitten gut geeignet zu sein und wurde bei ähnlichen Fragestellungen in vergleichbaren Untersuchungen verwendet (Burgers et al. 2010a, Burgers et al. 2010b; Poon und Bhushan 1995; Quirynen et al. 1990; Vorburger et al. 2007). Das arithmetische Mittel R_a zur Charakterisierung einer Materialoberfläche wird zwar in der bio-medizinischen Forschung häufig angewendet, beschreibt eine Oberfläche aber nicht vollständig und kann insbesondere gegenüber starken Unregelmäßigkeiten wenig sensitiv sein (De Oliveira et al. 2012; Goodhand et al. 2016; Quirynen et al. 1990; Singh et al. 2011). Nach Literaturrecherche und vor dem Hintergrund der aktuellen Fragestellung schienen die Einschränkungen des R_a jedoch nicht gegen eine Verwendung in der vorliegenden Studie zu sprechen.

Die Untersuchung der SFE mittels *sessile drop / contact angle* – Methode mit unterschiedlichen Flüssigkeiten stellt eine gängige Methode dar, muss jedoch hinsichtlich ihrer Aussagekraft diskutiert werden (Good 1992). Die angewandte Technik kann zu geringen Abweichungen zwischen physikalischer Realität und den ermittelten Ergebnissen führen (Chibowski und Perea-Carpio 2002; Kwok und Neumann 1999). Größeren Einfluss hat jedoch vermutlich die vorangegangene feuchte Lagerung der Probekörper. Die trockengelagerten Probekörper nahmen die aufgetragenen Flüssigkeitstropfen schneller auf als die nass gelagerten. Durch strenge Zeitnahme zwischen Auftropfen und Messung wurde versucht, diesen Effekt zu minimieren. Die Messungenauigkeit der Methodik *per se* wird daher verglichen mit der Problematik der Restfeuchte einen vernachlässigbaren Effekt haben. Zum Vergleich der beiden Zemente erscheint die Messtechnik jedoch hinreichend geeignet zu sein.

Die ESCA / XPS ist als Materialanalysetechnik für diese und vergleichbare Fragestellungen geeignet (Baer et al. 2010; Ren et al. 2015). Die Untersuchungen der vorliegenden Studie konnten zwar die verschiedenen enthaltenen Elemente in Atomprozent angeben, jedoch keine Aussagen zum Verhältnis und zur örtlichen Verteilung verschiedener Kupferoxide (CuO und Cu₂O) treffen. Eine gezielte Untersuchung der enthaltenen Kupferoxide wäre wünschenswert gewesen, da die verschiedenen Oxide über unterschiedliche antimikrobielle Eigenschaften verfügen (Hans et al. 2013; Hans et al. 2016; Ren et al. 2015). Eine genaue Analyse der

Kupferoxide bzw. des Kupfers wäre mit weiteren aufwendigen Untersuchungsmethoden aus dem Feld der Röntgenspektroskopie möglich gewesen und hätte zeitgleich zu einer genauen Lokalisation und Größenbestimmung der Partikel verhelfen können (Allen et al. 2012; Baer et al. 2010; Su und Shemenski 2008; Wobrauschek 2007). Dies wäre von Interesse, da neben der Oxidationsstufe und Masse auch Verteilung, Bindung und Partikelgröße als bedeutende Faktoren für antimikrobielle Eigenschaften in Betracht kommen (Grass et al. 2011; Hans et al. 2013; Hans et al. 2016; Moritz und Geszke-Moritz 2013; Padovani et al. 2015). Mögliche Ursachen für eine Wirkung bzw. für deren Ausbleiben könnten so ergänzend untersucht werden. Für den reinen Vergleich der Wirksamkeit zweier Zemente war jedoch keine fortführende Methodik notwendig.

6.1.4 Mikrobiologische Versuche

Verschiedene Studien haben sich mit der mikrobiologischen Wirkung von Kupferzusätzen bzw. Kupferanteilen dentaler Materialien beschäftigt, wobei insbesondere Amalgame hier im Fokus standen. Einige Untersuchungen konnten eine antimikrobielle Aktivität bestätigen (Morrier et al. 1989; Netuschil et al. 1996; Shay et al. 1956). Andere Untersuchungen wiederum konnten keinen klaren Vorteil eines Kupferzusatzes belegen (Glassman und Miller 1984). Untersuchungen dentaler kupferhaltiger Zemente zeigten ebenfalls antimikrobielle Wirkungen, die jedoch teilweise im Laufe der Zeit abnahmen (Foley und Blackwell 2003a, 2003b; Klaunick 1970; Maeglin 1953; Schmalz und Rotgans 1977). Hierbei wurde in erster Linie die Wirkung auf *Streptococcus mutans* getestet, aber auch *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarius*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* und Laktobazillen waren Gegenstand der Untersuchungen.

Die in der vorliegenden Studie gewählten Keime sind exemplarisch ausgewählt worden. *Streptococcus sanguinis* ist ein wichtiger Pionierkeim, *C. albicans* ein wichtiger oral-pathogener Pilz und ebenfalls Teil dentaler Plaque (Cannon und Chaffin 1999; J Li et al. 2004). Wie oben beschrieben, gehen einer kariogenen Plaque die Kolonisation und Plaquereifung durch Erstbesiedler voraus. Zuvor wurde ebenfalls dargelegt, dass ein *In-vitro*-Versuch die komplexen Verhältnisse intraoraler Biofilmbildung u. a. zugunsten der Praktikabilität reduziert. Die fehlende Interaktion verschiedener Mikroorganismen kann ebenfalls nicht abgebildet werden, ist jedoch bedeutender Teil der Biofilmbildung (Stoodley et al. 2002). Obwohl gezeigt wurde,

dass sich die Ergebnisse aus dem Labor auf *In-vivo*-Situationen übertragen lassen, wäre mit einem Multi-Spezies-Modell eine elaboriertere Untersuchung möglich gewesen (Burgers et al. 2010a; Burmolle et al. 2014; Maske et al. 2016; Roder et al. 2016; van der Waal et al. 2016). Zum grundlegenden Vergleich der beiden Zemente kann die hier vorgenommene exemplarische Auswahl an Keimen in Mono-Spezies-Kulturen nach Betrachtung verschiedener mikrobiologischer Versuche vergleichbarer Zielsetzungen jedoch als hinreichend beurteilt werden (Burgers et al. 2009a; Burgers et al. 2012; Decker et al. 2003; Foley und Blackwell 2003b; Hauser-Gerspach et al. 2007; Schmalz 1987; Schmalz und Rotgans 1977; Walter et al. 2007; Winkler et al. 2014; Yli-Urpo et al. 2003). Die Methoden zum Nachweis der mikrobiellen Aktivität sind wie bereits oben beschrieben als Standardmethoden etabliert, erlauben jedoch keine Diskriminierung der Mikroorganismen nach vital und avital. Für den relativen Vergleich zweier Zemente erscheinen die Methoden dennoch geeignet. Für eine genaue Unterscheidung lebender und toter Zellen wären bspw. fluoreszenzmikroskopische Techniken geeignet (Tawakoli et al. 2013).

6.1.5 Zytologische Versuche

Wie die mikrobiellen Versuche unter Laborbedingungen bringen auch *In-vitro*-Versuche an Zellkulturen Vorteile mit sich. Sie dürfen als einfach in der Anwendung, reproduzierbar und - verglichen mit Versuchen an Tieren oder Probanden - als ethisch unbedenklich angesehen werden (Pizzoferrato et al. 1994; Schmalz 1994). Für die Untersuchung möglicher Zytotoxizitäten wurden hierbei verschiedene Versuchsdesigns und Methoden beschrieben (Hanks et al. 1996; Pizzoferrato et al. 1994; Schmalz 1994; Ziats et al. 1988). Vor einer Testung *in vivo* sollte stets die Testung *in vitro* an einer Zellkultur stehen (Schmalz 1982). Die ISO Norm 10993-5 definiert Richtlinien zur *In-vitro*-Testung von Medizinprodukten (ISO 2009). Die in der ISO Norm für Versuche beschriebene Zelllinie ist die auch im vorliegenden Versuch verwendete Kultur von L929-Mausfibroblasten. Die ursprüngliche Zelllinie wurde 1940 durch die Arbeitsgruppe um Earle aus dem subkutanen Fettgewebe einer männlichen C3H/An Maus gewonnen, 1943 beschrieben und der erste etablierte Klonstrang 929 bildete die Grundlage für die heutige Zelllinie L929 (Earle et al. 1943). Zahlreiche Studien haben zur Untersuchung dentaler Werkstoffe und Materialien diese Zelllinie verwendet (Al-Nazhan und Spangberg 1990; Saidon et al. 2003; Schmid-Schwab et al. 2009; Thonemann et al. 2002). Da die Mausfibroblasten

weder nach Spenderorganismus noch nach Gewebelokalisation dem simulierten oralen Milieu entsprechen, wurde die GF1-Zelllinie mit aufgenommen. Diese Zelllinie ist humanen Ursprunges und entspricht durch Ihren Entnahmeort genauer dem Anforderungsprofil, findet jedoch keine Abbildung in der ISO-Norm. Gingivale Fibroblasten anderer Arbeitsgruppen wurden in einer Reihe von Studien zu ähnlichen Fragestellungen verwendet (Eldeniz et al. 2007; Geurtsen et al. 1998; Imirzalioglu et al. 2012; Issa et al. 2004; Osorio et al. 1998; Thonemann et al. 2002). Die ISO-Norm empfiehlt zur Messung der Zellaktivität MTT-Assays, die als etablierte Methode zu betrachten sind (ISO 2009; Riss et al. 2004). Die Vorteile des hier verwendeten WST-8-Assays liegen bei einem ähnlichen chemischen Grundprinzip in der hohen Sensitivität bei geringer Zytotoxizität (Ginouves et al. 2014; Ishiyama et al. 1996; Tominaga et al. 1999; Tsukatani et al. 2008). Einzig die abweichende Dosierung der Testreagenzien, bedingt durch die größeren Probekörper und Wells, weicht von den Herstellerempfehlungen ab. Durch Vorversuche wurde die hier verwendete Konzentration der CCK-8-Messlösung bei geeigneter Zellzahl ermittelt. Ziel war hier ein optimaler Farbumschlag der Kontroll- und Probekörpergruppen. Dieser musste ausreichend stark und gleichzeitig frei von Boden- oder Deckeneffekten im Messbereich des Photometers sein.

6.1.6 Bildgebung

Unter den diversen verfügbaren Bildgebungstechniken hat sich insbesondere die konfokale Laserscanningmikroskopie (CLSM) für Fragestellungen zu Biofilmen etabliert (Neu und Lawrence 2015). Die CLSM ermöglicht eine zerstörungsfreie 3D-Bildgebung und Analyse von Biofilmen (Wood et al. 2000; Zaura-Arite et al. 2001). Alternativen zur CLSM wären Aufnahmen mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie oder REM, wobei fluoreszenzbasierte Techniken eine Differenzierung in lebend, tot und nach Spezies ermöglichen (Schaudinn et al. 2009; Tawakoli et al. 2013; Thurnheer et al. 2004). Sowohl bei Fluoreszenzmikroskopie als auch bei REM wäre der Bildgebung eine qualitative und quantitative Auswertung mittels spezifischer Software gefolgt (de Paz 2009; Yang et al. 2000).

In der vorliegenden Studie wurden alternativ colorimetrische Assays zur Bestimmung der mikrobiellen Adhäsion bzw. Stoffwechselaktivität verwendet. Diese ermöglichen einen hohen Probendurchsatz und eine bei der CLSM notwendige Auswertung der Bildinformationen entfällt. Zur Qualitätssicherung des Versuchsablaufs wurden

parallel zu den zellbiologischen Versuchen lichtmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Eine quantitative Auswertung dieser Aufnahmen erfolgte nicht, eine Überprüfung von Adhäsion und Zellmorphologien wurde jedoch durchgeführt. Die mikrobiellen Versuche wurden analog mittels REM nachuntersucht, mit dem Ziel, die erfolgreiche mikrobielle Besiedelung nachzuweisen und die Ergebnisse der colorimetrischen Assays dahingehend zu untermauern.

Für mögliche weiterführende Fragestellungen wäre eine Differenzierung in lebende und tote Mikroorganismen und Zellen wünschenswert. Das Ziel, *in vitro* eine antimikrobielle bzw. zytotoxische Wirkung beider Zemente zu vergleichen, ist mit den gewählten Methoden jedoch zuverlässig gegeben.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Rauheit

Die Gesamtergebnisse der Rauheitsuntersuchungen zeigten einen mittleren R_a zwischen $0,85 \mu\text{m}$ und $1,13 \mu\text{m}$ bei einer Streuung im Bereich von $0,27 \mu\text{m}$ und $3,59 \mu\text{m}$. Weiterhin wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen kupferfrei und kupferhaltig gefunden. Die große Streuung ist vermutlich auf die durch den Herstellungsprozess bedingten Porositäten zurückzuführen, die je nach Taststrecke unterschiedlich starken Eingang in die Berechnung fanden. Da Untersuchungen an Titanproben ergaben, dass erst bei R_a -Werten unterhalb von $0,2 \mu\text{m}$ von keinen weiteren Einflüssen der Rauheit auf die bakterielle Adhäsion auszugehen ist, wird die Probekörperrauheit einen Einfluss auf die Adhäsion ausgeübt haben (Bollen et al. 1997). Eine direkte Übertragung dieser Ergebnisse auf die hier getesteten Zemente ist jedoch nicht möglich und eine entsprechende Literaturrecherche zu der Abhängigkeit von mikrobieller Adhäsion und verschiedenen Rauheiten bei Zinkoxidphosphatzementen offenbarte das Fehlen von belastbaren Daten. Durch das Fehlen signifikanter Unterschiede zwischen den Probekörpergruppen kupferfrei und kupferhaltig ist dieses für die vorliegende Fragestellung aber irrelevant. Folgestudien sollten jedoch die fertigungsbedingt poröse Oberfläche und deren mögliche Einflüsse auf mikrobiologische Adhäsion beachten.

6.2.2 Freie Oberflächenenergie

Die freie Oberflächenenergie zeigte bei den durchgeführten Messungen signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen. Die Unterschiede zwischen kupferfreien und kupferhaltigen Probekörpern waren deutlich signifikant. Die gemessenen Werte lagen mit $33,55 \pm 2,09$ mN/m für die kupferfreien Probekörper und $37,42 \pm 1,68$ mN/m - klinisch betrachtet - jedoch nahe zusammen. Darüber hinaus liegen die Mittelwerte für die konditionierten Probekörper unter denen der trocken gelagerten Probekörper. Insgesamt scheinen die Unterschiede in der SFE klinisch nicht relevant und Aufstellungen der SFE von Festkörpern zeigen deutlich größere Abweichungen innerhalb eines Werkstoffes wie z. B. Stahl mit Werten von 29 mN/m bis 56 mN/m oder Glas mit Werten von 43,10 mN/m bis 112,90 mN/m (Krüss 2017). Auch sind die Ergebnisse vor dem Hintergrund der erschwerten Messung (enthaltene Wasser in porösen Probekörpern der konditionierten Gruppen) zu interpretieren.

6.2.3 Adhäsion *Candida albicans*

Die Adhäsion mit *C. albicans* zeigte auf den kupferhaltigen Probekörpern höhere mittlere Werte (60 rlu) als auf den kupferfreien Probekörpern (33,15 rlu). Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die Streuung der Messergebnisse war vergleichsweise hoch (kupferfrei 16 - 64 rlu und kupferhaltig 25 – 113 rlu). Die Wechselwirkungen von Pilzen und Kupfer sind komplex und Gegenstand aktueller Forschung (Li et al. 2015; Zheng et al. 2016). Ein Überangebot an Kupfer kann, wie ebenfalls ein nicht ausreichendes Angebot, zu einem limitierenden Faktor eines Pilzwachstums werden (Ding et al. 2013). Bei einer mittels XPS / ESCA gezeigten, niedrigen Kupferlokalisation auf der Oberfläche könnte also ein wachstumsförderlicher Effekt durch Kupferfreisetzung denkbar sein. Weiterhin belegen die auf den REM-Aufnahmen noch sichtbaren Pilzzellen, dass nicht alle Zellen lysiert worden waren. Grundsätzlich basiert das Assay auf einer vollständigen Lyse der Zellen. Mögliche Ursachen für das Ausbleiben einer vollständigen Lyse blieben auch bei der Nachbereitung der Versuche ungeklärt.

Zusammenfassend ist keine signifikante Reduktion der fungalen Adhäsion durch den getesteten Kupferzusatz messbar. Weitere Untersuchungen hinsichtlich des Zusammenwirkens von kupferhaltigem Zement und Pilzwachstums könnten

demzufolge noch bestehende Fragen klären und eine positive Wechselwirkung bestätigen oder ausschließen.

6.2.4 Adhäsion *Streptococcus sanguinis*

Die Ergebnisse des Adhäsionsversuches mit *S. sanguinis* zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen kupferfrei und kupferhaltig. Es konnte eine leicht erhöhte Aktivität des Testkeims auf den konditionierten Probekörpern gemessen werden. So wurde eine höhere Adhäsion auf den Probekörpern der Gruppen III und IV (konditioniert) als in den Gruppen I und II (trocken) gemessen. Diese Unterschiede sind jedoch nur für die Gruppen II gegen IV (kupferhaltig), nicht jedoch für die Gruppen I gegen III (kupferfrei) signifikant.

Weiterhin sind die Schwankungen aller Messungen mit Werten von 8370 rfu bis 55221 rfu relativ hoch. Eine mögliche Ursache für die Schwankungen der Messwerte liegt in der Messtechnik *orbital scanning*, die in jedem Well multiple Messwerte an unterschiedlichen Stellen des gesamten Wells aufnimmt und diese zur weiteren Auswertung ausgibt. Somit werden auch Bereiche erfasst, die keinen Probekörper tragen. Im Mittel gleichen sich diese stark unterschiedlichen Messwerte zwar aus, bleiben jedoch als Schwankungen in den Einzelmesswerten erhalten.

Die einzigen Änderungen im Adhäsionsverhalten zeigten sich also zwischen trocken gelagerten und konditionierten Probekörpern, nicht jedoch zwischen kupferfreien und kupferhaltigen Probekörpern. Die Messungen der SFE belegten ebenfalls Änderungen zwischen genau diesen Gruppen. Ein Einfluss von künstlicher Alterung auf das mikrobielle Adhäsionsverhalten auf Werkstoffen ist zuvor bereits beschrieben worden (Burgers et al. 2009a; Hahnel et al. 2010). Da in dieser Studie der Vergleich von kupferfreiem mit kupferhaltigem Zement im Vordergrund stand, wurde dieser Aspekt nicht näher untersucht.

6.2.5 Zellviabilität Mausfibroblasten (L929)

Im Rahmen der Zytotoxizitätstestung zeigten sich in der Versuchsreihe a) die stärksten signifikanten Effekte, sowohl durch die soliden Probekörper als auch durch die konditionierten Medien. Es gab signifikante Unterschiede der Kontrolle gegen fast alle Probekörpergruppen, jedoch keine zwischen den Gruppen kupferfrei und kupferhaltig. Die konditionierten Medien zeigten nach 12 h eine geringe, jedoch signifikant höhere Aktivität als die soliden Probekörper, wobei dieser Effekt auch

nach weiteren 12 h bestand. Die starken Effekte in der Versuchsreihe a) können vielleicht auf die Folgen der hohen Passage (19. Passage) der Zellkultur zurückgeführt werden. Die Effekte, die das konditionierte Medium hervorrief, konnten nicht auf eine Änderung des pH-Wertes zurückgeführt werden (gemessen, nicht weiterführend ausgewertet), die Ursachen bleiben im Rahmen dieser Studie ungeklärt.

Zur Verifizierung der Ergebnisse der Versuchsreihe a) wurden für die Versuchsreihe b) neue Zellkulturen der DSMZ verwendet. Diese zeigten in der Kontrollgruppe nach 6 h, 24 h und 48 h stetiges Wachstum. Zu keinem Zeitpunkt waren die Mittelwerte der Gruppen kupferfrei und kupferhaltig voneinander signifikant verschieden. Bemerkenswert ist, dass sich zwar nach 6 h die Kontrollen durch eine höhere relative Absorption signifikant von fast allen Gruppen unterschieden (Ausnahme Gruppe I), dies jedoch nach 24 h bzw. 48 h nicht mehr der Fall war. Denn nach einer Inkubation von 24 h existieren keinerlei signifikante Unterschiede, nach 48 h nur zwischen der Kontrolle und der Gruppe IV. Somit scheint der Unterschied zwischen Kontrollen und Probekörpergruppen geringer als in Versuchsreihe a), ein möglicher Einfluss durch frischere Mausfibroblasten in niedrigerer Passage erscheint zumindest möglich. Effekte wie dieser sind bereits früher beschrieben worden (Hughes 2008; Wataha et al. 1994). Die zytotoxischen Effekte konnten also bei beiden Versuchsreihen beobachtet werden, aber die Zellen in höherer Passage haben empfindlicher auf die Zemente reagiert. Die gemessenen zytotoxischen Effekte sind hierbei deutlich messbar gewesen. Diese teilweise sehr starke Wirkung eines Zinkoxidphosphatzementes deckt sich mit den Ergebnissen der aktuellen wissenschaftlichen Literatur (Franz et al. 2006; Mahasti et al. 2011; Winkler et al. 2014). Ebenfalls zeigt sich bei Betrachtung der Literatur eine Abnahme potentiell zytotoxischer Eigenschaften mit zunehmendem Alter bzw. längerer feuchter Lagerung der Probekörper (Hanks et al. 1981; Schedle et al. 1998).

6.2.6 Zellviabilität humane Fibroblasten (GF1)

Bei Betrachtung der Messergebnisse der Versuchsdurchläufe mit den humanen Fibroblasten GF1 zeigten sich ähnliche, mit den Mausfibroblasten L929 vergleichbare Resultate. Zu fast allen Messzeitpunkten zeigten die Kontrollen signifikant höhere Aktivität als die Gruppen kupferfrei und kupferhaltig (Ausnahme: nach 48 h, Kontrolle gegen Gruppe kupferfrei mit $p = 0,065$). Zu keinem

Messzeitpunkt unterschieden sich diese untereinander signifikant. Im Unterschied zu den Mausfibroblasten sank jedoch die durchschnittliche relative Absorption zwischen den 6 h- und 24 h-Messungen in den Gruppen Kontrolle, kupferfrei und kupferhaltig. Sie stieg nach weiteren 24 h nur leicht an und erreichte nicht wieder das 6 h-Niveau. Die Mausfibroblasten zeigten in der Kontrollgruppe kontinuierliches Wachstum. Als Ursache hierfür können Wirkungen des CCK-8 nicht ausgeschlossen werden, da auch die Kontrollgruppe eine Hemmung im Wachstum zu erfahren schien. Weitere Messungen zu späteren Zeitpunkten mit unterschiedlichen Messreagenzien könnten in nachfolgenden Untersuchungen hierzu Auskunft geben. Hier wurde darauf verzichtet, da die Fragestellung nach einem signifikanten Einfluss des Kupfers davon unberührt bleibt. Festzustellen bleibt, dass die Gingivafibroblasten anscheinend weniger sensibel auf die Zemente reagieren und gegebenenfalls stärker von der Messprozedur beeinflusst wurden. Diese unterschiedliche Reaktion der verschiedenen Zellreihen deckt sich mit Ergebnissen publizierter Studien; insbesondere die verstärkte Sensitivität der L929-Zellen wurde mehrfach dokumentiert (Al-Nazhan und Spangberg 1990; Eldeniz et al. 2007; Kwon et al. 2014; Thonemann et al. 2002; Wataha et al. 1994).

6.2.7 Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Fibroblasten zeigten mit den Messwerten zu vereinbarende Zellmorphologien und -mengen. Die Morphologie der Zellen unter zytotoxischen Einflüssen ist bereits beschrieben und deckt sich mit den vorliegenden Aufnahmen (Basso et al. 2013; Elias et al. 2015; Novotna et al. 2015; Schedle et al. 1998). Die Aufnahmen der GF1 waren hierbei weniger deutlich, zeigten aber noch immer eine charakteristische, spindelförmige Morphologien der Zelllinie.

Eine bessere Bildgebung wäre wünschenswert gewesen, die Bilder sind daher nur als qualitative Belege des Zellwachstums zu sehen. Eine quantitative Analyse scheint mit ihnen nicht möglich. Grundsätzlich wäre Lichtmikroskopie geeignet, sowohl quantitative als auch qualitative Ergebnisse zu erzeugen (Stephens und Allan 2003).

6.2.8 Elektronenspektrographie (ESCA / XPS)

Die ESCA / XPS-Ergebnisse zeigten bei trocken gelagerten Probekörpern eine oberflächliche Lokalisation von 0,3 % Atomprozent Kupfer, bei Probekörpern mit

einer Wasserlagerung von einem Monat noch 0,2 % Atomprozent Kupfer und nach sechs Monaten Wasserlagerung 0,4 % Atomprozent Kupfer. Diese Ergebnisse zeigten konstante Kupferwerte trotz allem. Vor dem Hintergrund von Studien, welche die Wirksamkeit von Kupfer bestätigen, scheint die Menge vergleichsweise gering (Bundy et al. 1980; Foley und Blackwell 2003a; Morrier et al. 1998; Neel et al. 2005). Die Schwankung der Kupferlokalisierung im Bereich von 0,1 % um den Mittelwert von 0,3 % lässt sich vermutlich durch die ungleiche Durchmischung des Zementes bzw. ungleiche Oberflächenlokalisierung von Kupfer eher erklären, als durch eine tatsächlich veränderte Oberflächenzusammensetzung. Weiterhin könnte ein zusätzliche Aufschlüsselung nach Cu^+ und Cu^{2+} die Qualität der Untersuchung weiter steigern, da Kupferionen unterschiedlich stark antibakteriell wirken können (Hans et al. 2013; Hans et al. 2016).

6.2.9 Rasterelektronenmikroskopie

Die in dieser Studie angefertigten REM-Aufnahmen zeigen die Probekörper mitsamt der Besiedelung durch die verschiedenen Zellen und Mikroorganismen. Darüber hinaus ist die komplexe Oberflächenstruktur der Probekörper zu sehen. Insbesondere große, eröffnete Poren und Risse sind sehr gut zu erkennen. Die REM-Aufnahmen zeigen exemplarisch die Zellen des jeweiligen Versuchsabschnittes, jedoch sind diese - bedingt durch die Probenvorbereitung - teilweise stark beeinträchtigt. Im Falle des Adhäsionsversuches mit *C. albicans* bedingt das ATP-Assay größtenteils eine Lyse der Pilzzellen. Dennoch sind Zellen auf den Probekörpern verblieben. Es finden sich größere Mengen nicht lysierter Pilzzellen in Oberflächenporositäten. Ein möglicher makroskopischer Schutz durch die Oberflächentopographie kann daher diskutiert werden. Da die Oberflächenrauheit jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Probekörpergruppen gezeigt hat, sollten sich diese Effekte im Mittel ausgleichen.

6.3 Schlussfolgerung

Die Methodik der vorliegenden Studie erscheint geeignet, die Fragestellung nach *In-vitro*-Wirkungen eines Kupferadditives in einem Zinkoxidphosphatzement zu untersuchen. Es konnten hierbei keine klinisch relevanten Unterschiede in den physiko-chemischen Eigenschaften der Materialien belegt werden. Darüber hinaus zeigten die beiden Zemente zwar eine insgesamt gleich hohe zytotoxische Wirkung,

jedoch keine unterschiedliche antimikrobielle Wirkung auf das getestete Bakterium oder den getesteten Pilz. Die niedrige Kupferkonzentration auf der Oberfläche der Probekörper des modifizierten Zementes korreliert mit diesen Ergebnissen. Die bildgebenden Techniken bestätigen die postulierten Ergebnisse. Die Ergebnisse korrelieren darüber hinaus mit den Resultaten der aktuellen wissenschaftlichen Literatur. In der vorliegenden getesteten Form kann der Kupferzusatz somit als wirkungslos beurteilt werden.

7. Zusammenfassung

In der Zahnmedizin dienen Biomaterialien der Wiederherstellung von Gewebe- und Zahnhartsubstanzdefekten. Die sich auf ihnen im oralen Milieu bildenden Biofilme können Sekundärkaries, Parodontopathien, Candidosen und Periimplantitiden verursachen. Diese biologischen Komplikationen zählen zu den Hauptversagensgründen dentaler Restaurationen. Um die biologischen Eigenschaften dentaler Werkstoffe zu verbessern, können diese u. a. mit biologisch aktiven Additiven versetzt werden. Hierbei steht jedoch eine mögliche antimikrobielle Wirkung häufig in Widerspruch zu möglichen sensibilisierenden oder toxischen Eigenschaften der modifizierten Werkstoffe. Ein Beispiel für derartige Modifizierungen sind mit Kupfer versetzte dentale Zemente. In der vorliegenden Studie wurde ein klassischer Zinkoxidphosphatzement (Hoffmann's Cement) mit seinem kupferhaltigen Pendant (Hoffmann's Kupfer Cement) verglichen. Beide Zemente sind kommerziell erhältlich, werden klinisch angewendet und wurden auf wichtige physiko-chemische Eigenschaften, ihre mikrobielle Wirkung und mögliche zytotoxische Folgen *in vitro* untersucht.

Für die Laboruntersuchungen wurden Probekörper beider Zemente hergestellt und in vier Gruppen aufgeteilt. Je Zementsorte wurde eine Hälfte der Probekörper trocken aufbewahrt, die andere Hälfte zur künstlichen Alterung für einen Monat in *Aqua dest.* gelagert. Es folgte die Ermittlung des arithmetischen Mittels der Oberflächenrauheit (R_A) mittels Tastschlittenuntersuchung sowie der freien Oberflächenenergie (SFE) mittels Kontaktwinkelmessung. Weiterhin wurde die Materialzusammensetzung an der Oberfläche durch Photoelektronenspektroskopie (ESCA /XPS) bestimmt. Die mikrobiellen Eigenschaften wurden durch Analyse der initialen Adhäsion nach zwei Stunden durch Kulturen von *Streptococcus sanguinis* und *Candida albicans* untersucht. Hierbei kamen etablierte colorimetrische Assays zum Einsatz. Mögliche zytotoxische Wirkungen wurden angelehnt an die ISO-Norm 10993-5 mittels Mausfibroblasten und WST-8-Assay nach 6, 24 und 48 Stunden geprüft. Humane Gingivafibroblasten wurden mit dem Ziel der besseren Übertragbarkeit der Ergebnisse dem gleichen Versuchsablauf unterzogen. Bildgebung mittels konventioneller Lichtmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie (REM) rundete

die Versuche mit dem Ziel, die Testabläufe und Ergebnisse zu verifizieren, ab. Eine statistische Analyse der gewonnenen Daten schloss die Versuche ab.

Nach Auswertung der Ergebnisse wurden keine relevanten physiko-chemischen Unterschiede zwischen den Zementen gefunden. Die Oberfläche der Zemente wies einen R_A im Bereich von $0,85 \mu\text{m}$ und $1,13 \mu\text{m}$ bei verhältnismäßig starker Streuung auf. Makroskopisch waren Poren auf der Oberfläche zu erkennen, die für die Streuung verantwortlich zu sein scheinen. Die Oberflächenenergie SFE lag für die kupferfreien Probekörper im Mittel bei $33,55 \pm 2,09 \text{ mN/m}$ und bei $37,42 \pm 1,68 \text{ mN/m}$ für die kupferhaltigen Probekörper. Bei den kupferhaltigen Probekörpern konnte mit maximal 0,4 Atomprozent eine nur niedrige Kupfermenge auf der Oberfläche detektiert werden. Es konnte weiterhin weder für *S. sanguinis* noch für *C. albicans* ein signifikanter Unterschied in der Adhäsion auf den Zementen nachgewiesen werden. Bei beiden Zementen wurde im nächsten Versuchsschritt jedoch ein deutlicher zytotoxischer Effekt gegen Maus- und Gingivafibroblasten gezeigt. Die Mausfibroblasten reagierten hierbei sensibler auf die Zementproben. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen bestätigten die zytotoxischen Wirkungen der Probekörper, und die REM-Aufnahmen zeigten die Adhäsion von Zellkultur, Pilz und Bakterium. Weiterhin zeigten die REM-Aufnahmen die teilweise stark poröse Oberfläche der Probekörper.

Zusammenfassend war kein antimikrobieller Effekt des Kupferadditives nachzuweisen. Gleichzeitig zeigten sich deutliche zytotoxische Effekte bei beiden Zementen. Die insgesamt niedrige Kupfermenge auf der Oberfläche des kupferhaltigen Zementes stimmt mit der fehlenden antibakteriellen Wirkung überein.

8. Anhang

Tabelle 27: Geräte, Chemikalien und Hilfsmittel.

Gerät, Chemikalie, Hilfsmittel	Hersteller
Agar	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
Albumin	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
alpha-Amylase	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
<i>Aqua dest.</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Aqua dest.</i> , Aqua	B. Braun Melsungen, Germany
Assay, CCK8, Cell-Counting-Kit	Dojindo EU GmbH München, Deutschland
Assay, ViaLight Buffer, LT27-079 Assay buffer, ViaLightPlusCell Proliferation and Cytotoxicity assay,	Lonza Basel, Schweiz
Automatische Pipette	Microlap Hamilton, Bondaduz, Schweiz
<i>Candida albicans</i> (DSMZ Nr. 1386)	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Braunschweig, Deutschland
Casein-peptone	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
Digitalmikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss Göttingen, Deutschland
Digitalmikroskop DS-Series	Nikon Chiyoda, Japan
Dubliersilikon Z-Dupe	Henry Schein Dental Germany GmbH Langen, Germany
Dubliersilikon Adisil rapid	Siladent Dr. Böhme & Schöps Goslar, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium + GlutaMax, DMEM + GlutaMax	Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM	Fisher Scientific Schwerte, Deutschland
Elektronenspektrometer Axis Ultra	Kratos Analytical Limited Manchester, Großbritannien
Ethylenglykol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Feinwaage 440-47N	Kern und Sohn GmbH Balingen, Deutschland
Gingivafibroblasten GF1	AG Orale Biologie und Geweberegeneration Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik Universitätsmedizin Göttingen
Glasplatte	Henry Schein Dental Germany GmbH Langen, Deutschland

Glasplatte	Henry Schein Dental Germany Langen, Deutschland
Glukose	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
Hefeextract, Yeast Extract	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
Hoffmann´s Cement	Hoffmann´s Dental Manufaktur Berlin, Deutschland
Hoffmann´s Kupfer Cement	Hoffmann´s Dental Manufaktur Berlin, Deutschland
Inkubator Labotec C200	Labotec Göttingen, Detuschland
Kohlenstoffklebstoff Leit-C nach Göcke	Provac GmbH Oestrich-Winkel, Deutschland
Kontaktwinkelmessgerät Goniometer G1	ERNA Tokyso, Japan
Kälberserum	Invitrogen Darmstadt, Deutschland
Kulturflasche	Corning Incorporated Corning, NY, USA
Kulturflasche	Sarstedt AG & Co Nümbrecht, Deutschland
Lichtmikroskop, System (DS-Fi2, Eclipse TS100, ELWD 0.3, DS-LE3)	Nikon Chiyoda, Japan
Lichtmikroskop, System (Axiovert 40 CFL)	Zeiss Göttingen, Deutschland
Lysisreagent LT27-076	Lonza, Basel, Schweiz
Lysozym	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
Malz-Extrakt, malt extract	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
Mausfibroblasten, L929, Nr. 85011425, Cell Line from mouse	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
Methylenjodid	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
Mucin Typ III / isoliert aus Schweinemägen	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
Multimode Plattenreader Fluostar Optima	BMG LabTech Offenburg, Deutschland
Multimode Plattenreader SpectraMax M2	Molecular Devices LLC, Sunnyvale, USA
Multimode Plattenreader Tecan Infinite F200	Tecan Männedorf, Schweiz
Paraformaldehyd Pulver	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
Perthometer SP6	Feinprüf Perthen Göttingen, Deutschland
pH-Messgerät Multi-Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. Berlin, Deutschland
<i>Phosphate-buffered saline, PBS</i>	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA

Photometer Genesys 10S	Thermo Spectronic Rochester, NY, USA
Poliergerät DAP-U	Streurs Ballerup, Dänemark
Probenträger Alu-Stubs	Provac GmbH Oestrich- Winkel, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop Cambridge S240	Cambridge Instruments Nussloch, Deutschland
Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co Nümbrecht, Deutschland
Resazurin-Salz	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
Röhrchen	Sarstedt AG & Co Nümbrecht, Deutschland
Rührfisch/Magnetrührer MSC basic C	IKA Works Incorporated Wilmington, NC, USA)
Rüttelplatte KM2	Edmund Bühler GmbH Hechingen, Deutschland).
Schleifpapier, 240 - 1200	Leco Corporation St. Joseph, Michigan, USA
Schüttler Orbital Shaker Typ 420	Thermo Forma Mariette, Ohio, USA
Sicherheitswerkbank Herasafe HSP 12	Heraeus Hanau, Deutschland
Software OCA 15 plus	Dataphysics Instruments Filderstadt, Deutschland
Software Endnote X7 für Mac, Version X7.7.1	Thomson Reuters New York City, USA
Software Microsoft Exel für Mac 14.7.0	Microsoft Corporation Redmont, Washington, USA
Software Mixrosoft Word für Mac 14.7.1	Microsoft Corporation Redmont, Washington, USA
Software GIMP Version 2.8.18	The GIMP Team www.gimp.org
Software IBM SPSS Statistics für Mac, Version 24 für 64-Bit-Systeme	IBM Armonk, North Castle, New York, USA
Sputtergerät SCD 005 Sputter Coater	BAL-TEC Walluf, Deutschland
Sterilfilter Steritop Millipore	Merck Millipore Darmstadt Deutschland
<i>Streptococcus sanguinis</i> (DSMZ-Nr. 20068)	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Braunschweig, Deutschland
Tripticase soy broth	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
Trypan Blue Dye 0,4 %	Bio-Rad Hercules, CA, USA
Trypsin	PAN Biotech Aidenbach, Deutschland
Vakuumpumpe PJ 1604-735	KNF Neuberger Freiburg, Deutschland
Vibrator L	Henry Schein Dental Germany GmbH Langen, Deutschland

Wellplatte 96er Fluostar Microplate	BMG LabTech Offenburg, Deutschland
Wellplatte Costar 48	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
Zählautomat Bio-Rad TC 20	Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA
Zählautomat Nexelom Vellometer TM Auto T4	VWR International GmbH Erlangen, Deutschland
Zementspatel DF 153R	Aesculap Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge5810	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Rotina 420 R	Hettich Zentrifugen GmbH Tuttlingen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Corning Incorporated Tweksbury, MA, USA

9. Literaturverzeichnis

Abiko Y, Sato T, Mayanagi G, Takahashi N (2010): Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time. PCR J Periodontal Res 45, 389-395

Addy M, Tapper-Jones L, Seal M (1974): Trial of astringent and antibacterial mouthwashes in the management of recurrent aphthous ulceration. Br Dent J 136, 452-455

Ahmad Z, Vargas-Reus MA, Bakhshi R, Ryan F, Ren GG, Oktar F, Allaker RP (2012): Antimicrobial properties of electrically formed elastomeric polyurethane-copper oxide nanocomposites for medical and dental applications. Methods Enzymol 509, 87-99

Ahn HB, Ahn SJ, Lee SJ, Kim TW, Nahm DS (2009): Analysis of surface roughness and surface free energy characteristics of various orthodontic materials. Am J Orthod Dentofacial Orthop 136, 668-674

Ahn SJ, Kho HS, Lee SW, Nahm DS (2002): Roles of salivary proteins in the adherence of oral streptococci to various orthodontic brackets. J Dent Res 81, 411-415

Ahn SJ, Wen ZT, Burne RA (2007): Effects of oxygen on virulence traits of *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 189, 8519-8527

al-Hiyasat AS, Bashabsheh OM, Darmani H (2002): Elements released from dental casting alloys and their cytotoxic effects. Int J Prosthodont 15, 473-478

Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R (2007): The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. Hum Reprod 22, 1304-1309

Al-Nazhan S, Spangberg L (1990): Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental material: An electron microscopic study on human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells. J Endodont 16, 129-134

Albert-Kiszely A, Pjetursson BE, Salvi GE, Witt J, Hamilton A, Persson GR, Lang NP (2007): Comparison of the effects of cetylpyridinium chloride with an essential oil mouth rinse on dental plaque and gingivitis - a six-month randomized controlled clinical trial. J Clin Periodontol 34, 658-667

Allan I, Newman H, Wilson M (2001): Antibacterial activity of particulate bioglass against supra- and subgingival bacteria. Biomaterials 22, 1683-1687

Allen LJ, D'Alfonso AJ, Freitag B, Klenov DO (2012): Chemical mapping at atomic resolution using energy-dispersive x-ray spectroscopy. MRS Bulletin 37, 47-52

Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T (2006): A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* 59, 1114-1128

Alomari Q, Al-Saiegh F, Qudeimat M, Omar R (2009): Recurrent Caries at Crown Margins: Making a Decision on Treatment. *Med Prin Pract* 18, 187-192

Altintas SH, Usumez A (2008): Evaluation of monomer leaching from a dual cured resin cement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 86, 523-529

Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM, Milosevic A (1999): Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. *J Dent Res* 78, 1821-1828

Amerongen AV, Veerman EC (2002): Saliva--the defender of the oral cavity. *Oral Dis* 8, 12-22

Ammann TW, Belibasakis GN, Thurnheer T (2013): Impact of early colonizers on in vitro subgingival biofilm formation. *PLoS One* 8, e83090

Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS (2000): Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1818-1824

Arslan Malkoc M, Demir N, Sengun A, Bozkurt SB, Hakki SS (2015): Cytotoxicity evaluation of luting resin cements on bovine dental pulp-derived cells (bDPCs) by real-time cell analysis. *Dent Mater J* 34, 154-160

Attramadal A, Svaton B (1984): In vivo antibacterial effect of tin on the oral microflora. *Scand J Dent Res* 92, 161-164

Aydin S (2007): A comparison of ghrelin, glucose, alpha-amylase and protein levels in saliva from diabetics. *J Biochem Mol Biol* 40, 29-35

Backstrom N, Lindell J, Zhang Y, Palkopoulou E, Qvarnstrom A, Saetre GP, Ellegren H (2010): A high-density scan of the Z chromosome in *Ficedula flycatchers* reveals candidate loci for diversifying selection. *Evolution* 64, 3461-3475

Baer DR, Gaspar DJ, Nachimuthu P, Techane SD, Castner DG (2010): Application of surface chemical analysis tools for characterization of nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396, 983-1002

Bakopoulou A, Mourelatos D, Tsiftoglou AS, Giassin NP, Mioglou E, Garefis P (2009): Genotoxic and cytotoxic effects of different types of dental cement on normal cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 672, 103-112

Bakula A, Lugovic-Mihic L, Situm M, Turcin J, Sinkovic A (2011): Contact Allergy in the Mouth: Diversity of Clinical Presentations and Diagnosis of Common Allergens Relevant to Dental Practice. *Acta Clin Croat* 50, 553-561

Balanyk TE, Sandham HJ (1985): Development of sustained-release antimicrobial dental varnishes effective against *Streptococcus mutans* in vitro. *J Dent Res* 64, 1356-1360

Bapna MS, Murphy R, Mukherjee S (1988): Inhibition of bacterial colonization by antimicrobial agents incorporated into dental resins. *J Oral Rehabil* 15, 405-411

Bardow A, Lagerlöf F, Nauntofte B, Tenovu J: The role of saliva: Dental Caries - The Disease and its Clinical Management; hrsg v. Fejerskov O, Nyvad B, Kidd EA; Wiley-Blackwell, Munksgard 2008, 189-207

Bardow A, Lykkeaa J, Qvist V, Ekstrand K, Twetman S, Fiehn NE (2014): Saliva composition in three selected groups with normal stimulated salivary flow rates, but yet major differences in caries experience and dental erosion. *Acta Odontol Scand* 72, 466-473

Basso FG, Pansani TN, de Oliveira CF, Turrioni AP, Soares DG, Hebling J, Costa CA (2013): Cytotoxic effects of zoledronic acid on human epithelial cells and gingival fibroblasts. *Braz Dent J* 24, 551-558

Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, Blevins JS, Smeltzer MS (2004): Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 186, 4665-4684

Behnen MJ, West LA, Liewehr FR, Buxton TB, McPherson JC, 3rd (2001): Antimicrobial activity of several calcium hydroxide preparations in root canal dentin. *J Endod* 27, 765-767

Bellion M, Santen L, Mantz H, Hähl H, Quinn A, Nagel A, Gilow C, Weitenberg C, Schmitt Y, Jacobs K (2008): Protein adsorption on tailored substrates: long-range forces and conformational changes. *J Phys-Condens Mat* 20 404226

Ben-Aryeh H, Shalev A, Szargel R, Laor A, Laufer D, Gutman D (1986): The salivary flow rate and composition of whole and parotid resting and stimulated saliva in young and old healthy subjects. *Biochem Med Metab Biol* 36, 260-265

Benelli EM, Serra MC, Rodrigues AL, Jr., Cury JA (1993): In situ anticariogenic potential of glass ionomer cement. *Caries Res* 27, 280-284

Bennick A, Cannon M, Madapallimattam G (1981): Factors affecting the adsorption of salivary acidic proline-rich proteins to hydroxyapatite. *Caries Res* 15, 9-20

Bergenholtz G, Cox CF, Loesche WJ, Syed SA (1982): Bacterial leakage around dental restorations: its effect on the dental pulp. *J Oral Pathol* 11, 439-450

Berglund A (1990): Estimation by a 24-hour study of the daily dose of intra-oral mercury vapor inhaled after release from dental amalgam. *J Dent Res* 69, 1646-1651

Berridge MV, Herst PM, Tan AS (2005): Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 11, 127-152

- Besinis A, De Peralta T, Handy RD (2014): The antibacterial effects of silver, titanium dioxide and silica dioxide nanoparticles compared to the dental disinfectant chlorhexidine on *Streptococcus mutans* using a suite of bioassays. *Nanotoxicology* 8, 1-16
- Biagi E, Candela M, Fairweather-Tait S, Franceschi C, Brigidi P (2012): Aging of the human metaorganism: the microbial counterpart. *Age (Dordr)* 34, 247-267
- Blumer L, Schmidli F, Weiger R, Fischer J (2015): A systematic approach to standardize artificial aging of resin composite cements. *Dent Mater* 31, 855-863
- Boeckh C, Schumacher E, Podbielski A, Haller B (2002): Antibacterial activity of restorative dental biomaterials in vitro. *Caries Res* 36, 101-107
- Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M (1997): Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater* 13, 258-269
- Boning K (1988): Effect of dental alloys on the acidogenic metabolism of *Streptococcus mutans*. *Dtsch Zahnarztl Z* 43, 393-395
- Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ (1999): Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions--its mechanisms and methods for study FEMS. *Microbiol Rev* 23, 179-230
- Bosch TCG, McFall-Ngai MJ (2011): Metaorganisms as the new frontier. *Zoology* 114, 185-190
- Bossmann K, Hoppe W, Staehle HJ (1984): Experimental studies of the antimicrobial effectiveness of different cavity lining materials. *Dtsch Zahnarztl Z* 39, 725-731
- Botelho MG (2003): Inhibitory effects on selected oral bacteria of antibacterial agents incorporated in a glass ionomer cement. *Caries Res* 37, 108-114
- Botelho MG (2005): The antimicrobial activity of a dentin conditioner combined with antibacterial agents. *Oper Dent* 30, 75-82
- Botsali MS, Kusgoz A, Altintas SH, Ulker HE, Tanriver M, Kilic S, Basak F, Ulker M (2014): Residual HEMA and TEGDMA release and cytotoxicity evaluation of resin-modified glass ionomer cement and compomers cured with different light sources. *ScientificWorldJournal* 2014, 218295
- Bouillaguet S, Shaw L, Gonzalez L, Wataha JC, Krejci I (2002): Long-term cytotoxicity of resin-based dental restorative materials. *J Oral Rehabil* 29, 7-13
- Bowden GH, Hamilton IR (1987): Environmental pH as a factor in the competition between strains of the oral streptococci *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, and "*S. mitior*" growing in continuous culture. *Can J Microbiol* 33, 824-827
- Boyd A, Chakrabarty AM (1994): Role of Alginate Lyase in Cell Detachment of *Pseudomonas-Aeruginosa*. *Appl Environ Microb* 60, 2355-2359

Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C (1998): Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infect Immun* 66, 4729-4732

Bradshaw DJ, Walker JT, Burger B, Gangnus B, Marsh PD (2001): In vitro modeling of biofouling of dental composite materials. *Methods Enzymol* 337, 416-425

Bradway SD, Bergey EJ, Jones PC, Levine MJ (1989): Oral mucosal pellicle. Adsorption and transpeptidation of salivary components to buccal epithelial cells. *Biochem J* 261, 887-896

Bronson MR, Lindquist TJ, Dawson DV (2005): Clinical acceptability of crown margins versus marginal gaps as determined by pre-doctoral students and prosthodontists. *J Prosthodont* 14, 226-232

Broukal Z, Zajicek O (1974): Amount and distribution of extracellular polysaccharides in dental microbial plaque. *Caries Res* 8, 97-104

Brownawell AM, Berent S, Brent RL, Bruckner JV, Doull J, Gershwin EM, Hood RD, Matanoski GM, Rubin R, Weiss B, et al. (2005): The potential adverse health effects of dental amalgam. *Toxicol Rev* 24, 1-10

Buchmann G, Klimm, W., Geurtsen, W. (1992): Der Füllungsrandspalt und dessen mikroökologische Bedeutung. *Dtsch Zahnärztl Z* 47, 188-192

Bundy KJ, Butler MF, Hochman RF (1980): An investigation of the bacteriostatic properties of pure metals. *J Biomed Mater Res* 14, 653-663

Burgers R, Cariaga T, Muller R, Rosentritt M, Reischl U, Handel G, Hahnel S (2009a): Effects of aging on surface properties and adhesion of *Streptococcus mutans* on various fissure sealants. *Clin Oral Invest* 13, 419-426

Burgers R, Eidt A, Frankenberger R, Rosentritt M, Schweikl H, Handel G, Hahnel S (2009b): The anti-adherence activity and bactericidal effect of microparticulate silver additives in composite resin materials. *Arch Oral Biol* 54, 595-601

Burgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M (2010a): In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 21, 156-164

Burgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T, Handel G, Gosau M (2010b): Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomater* 6, 2307-2313

Burgers R, Wittey C, Hahnel S, Gosau M (2012): The effect of various topical peri-implantitis antiseptics on *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, and *Streptococcus sanguinis*. *Arch Oral Biol* 57, 940-947

Burgess RC (1988): Dental caries. *Can Fam Physician* 34, 1341-1347

- Burmolle M, Ren DW, Bjarnsholt T, Sorensen SJ (2014): Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends Microbiol* 22, 84-91
- Busscher HJ, Cowan MM, van der Mei HC (1992): On the relative importance of specific and non-specific approaches to oral microbial adhesion. *FEMS Microbiol Rev* 8, 199-209
- Busscher HJ, van der Mei HC (1997): Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res* 11, 24-32
- Busscher HJ, van der Mei HC (2006): Microbial adhesion in flow displacement systems. *Clin Microbiol Rev* 19, 127-141
- Busscher HJ, Weerkamp AH, van der Mei HC, van Pelt AW, de Jong HP, Arends J (1984): Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl Environ Microbiol* 48, 980-983
- Busscher HJ, Weerkamp AH, Vandermei HC, Vansteenbergh D, Quirynen M, Pratt IH, Marechal M, Rouxhet PG (1989): Physicochemical Properties of Oral Streptococcal Cell-Surfaces and Their Relation with Adhesion to Solid Substrata In vitro and In vivo. *Colloids and Surfaces* 42, 345-353
- Busscher H, Weerkamp, A.H. (1987): Specific and nonspecific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiol Rev* 46, 165-173
- Busscher HJ, Bos R, van der Mei HC (1995): Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiol Lett* 128, 229-234
- Cannon RD, Chaffin WL (1999): Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med* 10, 359-383
- Carcuac O, Berglundh T (2014): Composition of human peri-implantitis and periodontitis lesions. *J Dent Res* 93, 1083-1088
- Carlen A, Olsson J, Ramberg P (1996): Saliva mediated adherence, aggregation and prevalence in dental plaque of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces* spp, in young and elderly humans. *Arch Oral Biol* 41, 1133-1140
- Carlen A, Nikdel K, Wennerberg A, Holmberg K, Olsson J (2001): Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. *Biomaterials* 22, 481-487
- Casey AL, Adams D, Karpanen TJ, Lambert PA, Cookson BD, Nightingale P, Miruszenko L, Shillam R, Christian P, Elliott TS (2010): Role of copper in reducing hospital environment contamination. *J Hosp Infect* 74, 72-77
- Cassels FJ, Hughes CV, Nauss JL (1995): Adhesin receptors of human oral bacteria and modeling of putative adhesin-binding domains. *J Ind Microbiol* 15, 176-185
- Chandki R, Banthia P, Banthia R (2011): Biofilms: A microbial home. *J Indian Soc Periodontol* 15, 111-114

Chao YS, Marks LR, Pettigrew MM, Hakansson AP (2015): Streptococcus pneumoniae biofilm formation and dispersion during colonization and disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4, 00194

Charalampakis G, Leonhardt A, Rabe P, Dahlen G (2012): Clinical and microbiological characteristics of peri-implantitis cases: a retrospective multicentre study. *Clin Oral Implants Res* 23, 1045-1054

Cheib Z, Rakmathulina E, Lussi A, Eick S (2015): Impact of Acquired Pellicle Modification on Adhesion of Early Colonizers. *Caries Res* 49, 626-632

Chen RS, Liu CC, Tseng WY, Jeng JH, Lin CP (2003): Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells. *J Dent* 31, 223-229

Chibowski E, Perea-Carpio R (2002): Problems of contact angle and solid surface free energy determination. *Advances in Colloid and Interface Science* 98, 245-264

Coenye T, Nelis HJ (2010): In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods* 83, 89-105

Colton MB, Ehrlich E (1953): Bactericidal effect obtained by addition of antibiotics to dental cements and direct filling resins. *J Am Dent Assoc* 47, 524-531

Combe EC: Zahnärztliche Werkstoffe. Hanser Verlag, München Wien 1984

Coogan MM, Creaven PJ (1993): Antibacterial properties of eight dental cements. *Int Endod J* 26, 355-361

Costerton JW (1995): Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* 15, 137-140

Costerton JW (1999): Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 11, 217-221; discussion 237-219

Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ (1987): Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 41, 435-464

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM (1995): Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49, 711-745

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999): Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322

Cowan MM, Vandermei HC, Stokroos I, Busscher HJ (1992): Heterogeneity of Surfaces of Subgingival Bacteria as Detected by Zeta Potential Measurements. *J Dent Res* 71, 1803-1806

Crouch SPM, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J (1993): The Use of Atp Bioluminescence as a Measure of Cell-Proliferation and Cytotoxicity. *J Immunol Methods* 160, 81-88

da Fonseca Roberti Garcia L, Pontes EC, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA, Soares DG (2016): Transdental cytotoxicity of resin-based luting cements to pulp cells. *Clin Oral Investig* 20, 1559-1566

Dale IL, Bradshaw TD, Gescher A, Pettit GR (1989): Comparison of effects of bryostatins 1 and 2 and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on protein kinase C activity in A549 human lung carcinoma cells. *Cancer Res* 49, 3242-3245

Dawes CJ, Jenkins GN, Tonge CH (1963): The nomenclature of the integuments of the enamel surface of teeth. *Br Dent J*, 115, 65-68

de Jong HP, de Boer P, Busscher HJ, van Pelt AW, Arends J (1984): Surface free energy changes of human enamel during pellicle formation. An in vivo study. *Caries Res* 18, 408-415

De Oliveira RRL, Albuquerque DAC, Cruz TGS, Yamaji FM, Leite FL: Measurement of the Nanoscale Roughness by Atomic Force Microscopy: Basic Principles and Applications, *Atomic Force Microscopy - Imaging, Measuring and Manipulating Surfaces at the Atomic Scale*. In: Bellito (Hrsg.): InTech Europe, Rijeka, 2012, 147-174 [siehe <http://www.intechopen.com/books/atomic-force-microscopy-imaging-measuring-and-manipulating-surfaces-at-the-atomic-scale/measurement-of-the-nanoscale-roughness-by-atomic-force-microscopy-basic-principles-and-applications>]

de Paz LEC (2009): Image Analysis Software Based on Color Segmentation for Characterization of Viability and Physiological Activity of Biofilms. *Appl Environ Microb* 75, 1734-1739

de Soet JJ, Nyvad B, Kilian M (2000): Strain-related acid production by oral streptococci. *Caries Res* 34, 486-490

Decker EM, Weiger R, Wiech I, Heide PE, Brex M (2003): Comparison of antiadhesive and antibacterial effects of antiseptics on *Streptococcus sanguinis*. *Eur J Oral Sci* 111, 144-148

DeSchepper EJ, White RR, von der Lehr W (1989): Antibacterial effects of glass ionomers. *Am J Dent* 2, 51-56

Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ, Jr., Kolenbrander PE (2006): Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol* 72, 2837-2848

Dijkman GE, de Vries J, Arends J (1992): Effect of glutardialdehyde on secondary caries in situ. *Caries Res* 26, 293-298

Ding C, Festa RA, Chen YL, Espart A, Palacios O, Espin J, Capdevila M, Atrian S, Heitman J, Thiele DJ (2013): Cryptococcus neoformans Copper Detoxification Machinery Is Critical for Fungal Virulence. *Cell Host Microbe* 13, 265-276

Dirckx P: Biofilm structure with labels. hrsg. [<https://www.biofilm.montana.edu/content/biofilm-structure-labels>, Zugriff am 25.10.2016] Montana State University-Bozeman, Center for Biofilm Engineering 1997
do Amaral GS, de Cassia Negrini T, Maltz M, Arthur RA (2015): Restorative materials containing antimicrobial agents: Is there evidence for their antimicrobial and anti-caries effects? - A systematic-review. *Aust Dent J* 4, 1-4

Dojindo Molecular Technologies I: CCK-8. hrsg. v.: CCK-8. [<http://www.dojindo.com/store/p/456-Cell-Counting-Kit-8.html>, Zugriff am 08.12.2016] Dojindo Molecular Technologies, Inc., <http://www.dojindo.com/store/p/456-Cell-Counting-Kit-8.html> 2016

Dollwet HHA, Sorenson JRJ (1985): Historic Uses of Copper-Compounds in Medicine. *Trace Elem Med* 2, 80-87

Domenico P, Baldassarri L, Schoch PE, Kaehler K, Sasatsu M, Cunha BA (2001): Activities of bismuth thiols against staphylococci and staphylococcal biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 1417-1421

Donlan RM, Costerton JW (2002): Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15, 167-193

Douglas CW (1983): The binding of human salivary alpha-amylase by oral strains of streptococcal bacteria. *Arch Oral Biol* 28, 567-573

Douglas CW (1994): Bacterial-protein interactions in the oral cavity. *Adv Dent Res* 8, 254-262

Duparre A, Ferre-Borrull J, Gliech S, Notni G, Steinert J, Bennett JM (2002): Surface characterization techniques for determining the root-mean-square roughness and power spectral densities of optical components. *Appl Opt* 41, 154-171

Duque C, Negrini Tde C, Hebling J, Spolidorio DM (2005): Inhibitory activity of glass-ionomer cements on cariogenic bacteria. *Oper Dent* 30, 636-640

<http://www.din.de/de/mitwirken/normenausschuesse/natg/normen/wdc-beuth:din21:129356592>; Zugriff am 07.12.2016

<http://www.din.de/de/mitwirken/normenausschuesse/natg/normen/wdc-beuth:din21:962490>; Zugriff am 07.12.2016

Earle WR, Schilling EL, Stark TH, Straus NP, Brown MF, Shelton E (1943): Production of Malignancy in Vitro. IV. The Mouse Fibroblast Cultures and Changes Seen in the Living Cells. *J Natl Cancer I* 4, 165-212

Ebi N, Imazato S, Noiri Y, Ebisu S (2001): Inhibitory effects of resin composite containing bactericide-immobilized filler on plaque accumulation. *Dent Mater* 17, 485-491

Edgar WM (1990): Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. *Br Dent J* 169, 96-98

- Edgar WM (1992): Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J* 172, 305-312
- Egerton M, Levine MJ (1992): Characterization of acquired denture pellicle from healthy and stomatitis patients. *J Prosthet Dent* 68, 683-691
- Eginton PJ, Holah J, Allison DG, Handley PS, Gilbert P (1998): Changes in the strength of attachment of micro-organisms to surfaces following treatment with disinfectants and cleansing agents. *Lett Appl Microbiol* 27, 101-105
- Ehara A, Torii M, Imazato S, Ebisu S (2000): Antibacterial activities and release kinetics of a newly developed recoverable controlled agent-release system. *J Dent Res* 79, 824-828
- Eickholz P, Mayer T, Staehle HJ: Befestigungszemente. In: Meiners H, Lehmann KM (Hrsg.): *Klinische Materialkunde für Zahnärzte*. Carl Hanser Verlag, München Wien 1998, 57-64
- Einwag J, Ulrich A, Gehring F (1990): In-vitro plaque accumulation on different filling materials. *Oralprophylaxe* 12, 22-25, 27
- Eldeniz AU, Mustafa K, Orstavik D, Dahl JE (2007): Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *Int Endod J* 40, 329-337
- Elguindi J, Wagner J, Rensing C (2009): Genes involved in copper resistance influence survival of *Pseudomonas aeruginosa* on copper surfaces. *J Appl Microbiol* 106, 1448-1455
- Eli I, Cooper Y, Ben-Amar A, Weiss E (1995): Antibacterial activity of three dental liners. *J Prosthodont* 4, 178-182
- Eliades GC, Caputo AA, Vougiouklakis GJ (1985): Composition, wetting properties and bond strength with dentin of 6 new dentin adhesives. *Dent Mater* 1, 170-176
- Elias ST, Santos AF, Garcia FC, Pereira PN, Hilgert LA, Fonseca-Bazzo YM, Guerra EN, Ribeiro AP (2015): Cytotoxicity of universal, self-etching and etch-and-rinse adhesive systems according to the polymerization time. *Braz Dent J* 26, 160-168
- Emilson CG (1994): Potential efficacy of chlorhexidine against mutans streptococci and human dental caries. *J Dent Res* 73, 682-691
- Ergucu Z, Hiller KA, Schmalz G (2005): Influence of dentin on the effectiveness of antibacterial agents. *J Endod* 31, 124-129
- Espeland EM, Wetzel RG (2001): Complexation, Stabilization, and UV Photolysis of Extracellular and Surface-Bound Glucosidase and Alkaline Phosphatase: Implications for Biofilm Microbiota. *Microb Ecol* 42, 572-585
- Faltermeier A, Burgers R, Rosentritt M (2008): Bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* to esthetic bracket materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 133, S99-103

- Fang M, Chen JH, Xu XL, Yang PH, Hildebrand HF (2006): Antibacterial activities of inorganic agents on six bacteria associated with oral infections by two susceptibility tests. *Int J Antimicrob Agents* 27, 513-517
- Fardal O, Johannessen AC, Morken T (2005): Gingivo-mucosal and cutaneous reactions to amalgam fillings. *J Clin Periodontol* 32, 430-433
- Farnaud SJ, Kosti O, Getting SJ, Renshaw D (2010): Saliva: physiology and diagnostic potential in health and disease. *ScientificWorldJournal* 10, 434-456
- Farrugia C, Camilleri J (2015): Antimicrobial properties of conventional restorative filling materials and advances in antimicrobial properties of composite resins and glass ionomer cements-A literature review. *Dent Mater* 31, 89-99
- Faundez G, Troncoso M, Navarrete P, Figueroa G (2004): Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol* 4, 19
- Felton D, Bergenholtz G, Cox CF (1989): Inhibition of bacterial growth under composite restorations following GLUMA pretreatment. *J Dent Res* 68, 491-495
- Ferreiros CM, Carballo J, Criado MT, Sainz V, del Rio MC (1989): Surface free energy and interaction of *Staphylococcus epidermidis* with biomaterials. *FEMS Microbiol Lett* 51, 89-94
- Ferretti GA, Tanzer JM, Tinanoff N (1982): The effect of fluoride and stannous ions on *Streptococcus mutans*. Viability, growth, acid, glucan production, and adherence. *Caries Res* 16, 298-307
- Feuerstein O, Matalon S, Slutzky H, Weiss EI (2007): Antibacterial properties of self-etching dental adhesive systems. *J Am Dent Assoc* 138, 349-354; quiz 396-348
- Fisher FJ (1972): The effect of a calcium hydroxide-water paste on micro-organisms in carious dentine. *Br Dent J* 133, 19-21
- Fisher FJ, McCabe JF (1978): Calcium hydroxide base materials. An investigation into the relationship between chemical structure and antibacterial properties. *Br Dent J* 144, 341-344
- Fleming GJ, Shortall AC, Shelton RM, Marquis PM (1999): Encapsulated versus hand-mixed zinc phosphate dental cement. *Biomaterials* 20, 2147-2153
- Fleming GJP, Farooq AA, Barralet JE (2003): Influence of powder/liquid mixing ratio on the performance of a restorative glass-ionomer dental cement. *Biomaterials* 24, 4173-4179
- Flemming HC: *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*. Springer, Heidelberg 1991
- Flemming HC (2000): Biofilms - Life on the edge of the aqueous phase. *Nachrichten Aus Der Chemie* 48, 442-454

- Foley J, Blackwell A (2003a): In vivo cariostatic effect of black copper cement on carious dentine. *Caries Res* 37, 254-260
- Foley J, Blackwell A (2003b): Ion release from copper phosphate cement and influence on *Streptococcus mutans* growth in vitro: a comparative study. *Caries Res* 37, 416-424
- Forsten L (1991a): Fluoride release and uptake by glass ionomers. *Scand J Dent Res* 99, 241-245
- Forsten L (1991b): Short- and long-term fluoride release from glass ionomer based liners. *Scand J Dent Res* 99, 340-342
- Fraga RC, Siqueira JF, Jr., de Uzeda M (1996): In vitro evaluation of antibacterial effects of photo-cured glass ionomer liners and dentin bonding agents during setting. *J Prosthet Dent* 76, 483-486
- Franz A, Konradsson K, König F, Van Dijken JW, Schedle A (2006): Cytotoxicity of a calcium aluminate cement in comparison with other dental cements and resin-based materials. *Acta Odontol Scand* 64, 1-8
- Freeman BA, Crapo JD (1982): Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47, 412-426
- Frencken JE, Imazato S, Toi C, Mulder J, Mickenautsch S, Takahashi Y, Ebisu S (2007): Antibacterial effect of chlorhexidine- containing glass ionomer cement in vivo: a pilot study. *Caries Res* 41, 102-107
- Frias-Lopez J, Duran-Pinedo A (2012): Effect of periodontal pathogens on the metatranscriptome of a healthy multispecies biofilm model. *J Bacteriol* 194, 2082-2095
- Friedl KH, Schmalz G, Hiller KA, Shams M (1997): Resin-modified glass ionomer cements: fluoride release and influence on *Streptococcus mutans* growth. *Eur J Oral Sci* 105, 81-85
- Gadelmawla ES, Koura MM, Maksoud TMA, Elewa IM, Soliman HH (2002): Roughness parameters. *J Mater Process Tech* 123, 133-145
- Galarraga-Vinueza ME, Mesquita-Guimaraes J, Magini RS, Souza JC, Fredel MC, Boccaccini AR (2016): Anti-biofilm properties of bioactive glasses embedding organic active compounds. *J Biomed Mater Res A* 37, 1952-1959
- Gama-Teixeira A, Simionato MR, Elian SN, Sobral MA, Luz MA (2007): *Streptococcus mutans*-induced secondary caries adjacent to glass ionomer cement, composite resin and amalgam restorations in vitro. *Braz Oral Res* 21, 368-374
- Garagnani P, Pirazzini C, Giuliani C, Candela M, Brigidi P, Sevinci F, Luiselli D, Bacalini MG, Salvioli S, Capri M, et al. (2014): The Three Genetics (Nuclear DNA, Mitochondrial DNA, and Gut Microbiome) of Longevity in Humans Considered as Metaorganisms. *Biomed Research International* 2014, 560340

- Ge J, Catt DM, Gregory RL (2004): Streptococcus mutans surface alpha-enolase binds salivary mucin MG2 and human plasminogen. *Infect Immun* 72, 6748-6752
- Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G (1998): Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res* 41, 474-480
- Gibbons RJ, van Houte J (1973): On the formation of dental plaques. *J Periodontol* 44, 347-360
- Gibbons RJ, Hay DI (1988): Human salivary acidic proline-rich proteins and statherin promote the attachment of Actinomyces viscosus LY7 to apatitic surfaces. *Infect Immun* 56, 439-445
- Gilbert P, Allison DG, McBain AJ (2002): Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 31, 98-110
- Ginouves M, Carme B, Couppie P, Prevot G (2014): Comparison of Tetrazolium Salt Assays for Evaluation of Drug Activity against Leishmania spp. *J Clin Microbiol* 52, 2131-2138
- Glantz POJ, Nilner K, Jendresen MD, Sundberg H (2002): Quality of fixed prosthodontics after twenty-two years. *Acta Odontol Scand* 60, 213-218
- Glassman MD, Miller IJ (1984): Antibacterial properties of one conventional and three high-copper dental amalgams. *J Prosthet Dent* 52, 199-203
- Goho C, Aaron GR (1992): Enhancement of antimicrobial properties of cavity varnish: a preliminary report. *J Prosthet Dent* 68, 623-625
- Goldberg M (2008): In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investig* 12, 1-8
- Good RJ (1992): Contact-Angle, Adhesion and Wetting - a Critical-Review. *Abstr Pap Am Chem S* 203, 2-Coll
- Goodhand MN, Walton K, Blunt L, Lung HW, Miller RJ, Marsden R (2016): The Limitations of Using "R-a" to Describe Surface Roughness. *J Turbomach* 138, 101003
- Gosau M, Hahnel S, Schwarz F, Gerlach T, Reichert TE, Burgers R (2010a): Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on in vivo human oral biofilm. *Clin Oral Implants Res* 21, 866-872
- Gosau M, Prantl L, Feldmann M, Kokott A, Hahnel S, Burgers R (2010b): The effects of copper additives on the quantity and cell viability of adherent Staphylococcus epidermidis in silicone implants. *Biofouling* 26, 359-365
- Gosau M, Burgers R, Vollkommer T, Holzmann T, Prantl L (2013): Effectiveness of antibacterial copper additives in silicone implants. *J Biomater Appl* 28, 187-198

Gosau M, Haupt M, Thude S, Strowitzki M, Schminke B, Buegers R (2016): Antimicrobial effect and biocompatibility of novel metallic nanocrystalline implant coatings. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 104, 1571-1579

Grass G, Rensing C, Solioz M (2011): Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl Environ Microbiol* 77, 1541-1547

Grossner-Schreiber B, Griepentrog M, Haustein I, Muller WD, Lange KP, Briedigkeit H, Gobel UB (2001): Plaque formation on surface modified dental implants. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res* 12, 543-551

Gunput ST, Wouters D, Nazmi K, Cukkemane N, Brouwer M, Veerman EC, Ligtenberg AJ (2016): Salivary agglutinin is the major component in human saliva that modulates the lectin pathway of the complement system. *Innate Immun* 22, 257-265

Hahnel S, Henrich A, Rosentritt M, Handel G, Burgers R (2010): Influence of artificial ageing on surface properties and *Streptococcus mutans* adhesion to dental composite materials. *J Mat Sci-Mater M* 21, 823-833

Hahnel S, Rosentritt M, Burgers R, Handel G, Lang R (2012): *Candida albicans* biofilm formation on soft denture liners and efficacy of cleaning protocols. *Gerodontology* 29, 383-391

Haisch C, Niessner R (2007): Visualisation of transient processes in biofilms by optical coherence tomography. *Water Res* 41, 2467-2472

Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskan MA, McIntosh ML, Alsam A, Kirkwood KL, Lambris JD, et al. (2011): Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe* 10, 497-506

Hajishengallis G, Lamont RJ (2012): Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol* 27, 409-419

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004): Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2, 95-108

Halwani M, Hebert S, Suntres ZE, Lafrenie RM, Azghani AO, Omri A (2009): Bismuth-thiol incorporation enhances biological activities of liposomal tobramycin against bacterial biofilm and quorum sensing molecules production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Pharm* 373, 141-146

Hamilton IR (1990): Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. *J Dent Res* 69 Spec No, 660-667; discussion 682-663

Hammer BK, Bassler BL (2003): Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 50, 101-114

Hammerle CH (1994): Success and failure of fixed bridgework. *Periodontol* 2000 4, 41-51

Hanks CT, Anderson M, Craig RG (1981): Cytotoxic effects of dental cements on two cell culture systems. *J Oral Pathol* 10, 101-112

Hanks CT, Wataha JC, Sun Z (1996): In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater* 12, 186-193

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

Hannig M (1999): Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials in vivo. *Eur J Oral Sci* 107, 55-64

Hannig M, Joiner A (2006): The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci* 19, 29-64

Hannig M, Dobert A, Stigler R, Muller U, Prokhorova SA (2004): Initial salivary pellicle formation on solid substrates studied by AFM. *J Nanosci Nanotechnol* 4, 532-538

Hans M, Erbe A, Mathews S, Chen Y, Solioz M, Mucklich F (2013): Role of copper oxides in contact killing of bacteria *Langmuir* 29, 16160-16166

Hans M, Mathews S, Mucklich F, Solioz M (2016): Physicochemical properties of copper important for its antibacterial activity and development of a unified model. *Biointerphases* 11, 018902

Harrison JJ, Ceri H, Yerly J, Stremick CA, Hu YP, Martinuzzi R, Turner RJ (2006): The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device. *Biological Procedures Online* 8, 194-215

Hasan A, Palmer RM (2014): A clinical guide to periodontology: pathology of periodontal disease. *Br Dent J* 216, 457-461

Hauser-Gerspach I, Kulik EM, Weiger R, Decker EM, Von Ohle C, Meyer J (2007): Adhesion of *Streptococcus sanguinis* to dental implant and restorative materials in vitro. *Dent Mater J* 26, 361-366

Hay DI (1973): The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. *Arch Oral Biol* 18, 1517-1529

Hayacibara MF, Rosa OP, Koo H, Torres SA, Costa B, Cury JA (2003): Effects of fluoride and aluminum from ionomeric materials on *S. mutans* biofilm. *J Dent Res* 82, 267-271

Heath RJ, Rock CO (2000): A triclosan-resistant bacterial enzyme. *Nature* 406, 145-146

Heitz-Mayfield LJ, Lang NP (2010): Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontol* 2000 53, 167-181

Hellwig E, Klimek J, Attin T: Einführung in die Zahnerhaltung. Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln 2009

Henskens YM, van der Velden U, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV (1993): Protein, albumin and cystatin concentrations in saliva of healthy subjects and of patients with gingivitis or periodontitis. *J Periodontal Res* 28, 43-48

Hernandez-Delgadillo R, Velasco-Arias D, Martinez-Sanmiguel JJ, Diaz D, Zumeta-Dube I, Arevalo-Nino K, Cabral-Romero C (2013): Bismuth oxide aqueous colloidal nanoparticles inhibit *Candida albicans* growth and biofilm formation. *Int J Nanomedicine* 8, 1645-1652

Holbrook WP, Magnusdottir MO (2012): Studies on strains of *Streptococcus mutans* isolated from caries-active and caries-free individuals in Iceland. *J Oral Microbiol* 4, 10611

Holden MT, Ram Chhabra S, de Nys R, Stead P, Bainton NJ, Hill PJ, Manefield M, Kumar N, Labatte M, England D, et al. (1999): Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* 33, 1254-1266

Honda K (2011): *Porphyromonas gingivalis* sinks teeth into the oral microbiota and periodontal disease. *Cell Host Microbe* 10, 423-425

Hong R, Kang TY, Michels CA, Gadura N (2012): Membrane lipid peroxidation in copper alloy-mediated contact killing of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 78, 1776-1784

Hori R, Kohno S, Hoshino E (1997): Bactericidal eradication from carious lesions of prepared abutments by an antibacterial temporary cement. *J Prosthet Dent* 77, 348-352

Hornez JC, Lefevre A, Joly D, Hildebrand HF (2002): Multiple parameter cytotoxicity index on dental alloys and pure metals. *Biomol Eng* 19, 103-117

Hoshino E, Kota K, Sato M, Iwaku M (1988): Bactericidal efficacy of metronidazole against bacteria of human carious dentin in vitro. *Caries Res* 22, 280-282

Hoshino E, Iwaku M, Sato M, Ando N, Kota K (1989): Bactericidal efficacy of metronidazole against bacteria of human carious dentin in vivo. *Caries Res* 23, 78-80

Hosoki M, Bando E, Asaoka K, Takeuchi H, Nishigawa K (2009): Assessment of allergic hypersensitivity to dental materials. *Biomed Mater Eng* 19, 53-61

Hoszek A, Pierreville F, Schittek M, Ericson D (1998): Fissure penetration and antibacterial effect in vitro of a glass ionomer cement containing chlorhexidine gluconate. *Swed Dent J* 22, 133-141

Hotta M, Nakajima H, Yamamoto K, Aono M (1998): Antibacterial temporary filling materials: the effect of adding various ratios of Ag-Zn-Zeolite. *J Oral Rehabil* 25, 485-489

Houry A, Gohar M, Deschamps J, Tischenko E, Aymerich S, Gruss A, Briandet R (2012): Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 13088-13093

Hoyle BD, Costerton JW (1991): Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog Drug Res* 37, 91-105

Huang R, Li M, Gregory RL (2011): Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence* 2, 435-444

Hughes P (2008): The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *Biotechniques* 44, 47-47

Hull PS (1980): Chemical inhibition of plaque. *J Clin Periodontol* 7, 431-442

Humphrey CJ (2001): Occupational injuries--practice the policy. *Home Healthc Nurse* 19, 335

Humphrey SP, Williamson RT (2001): A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 85, 162-169

Imazato S, McCabe JF (1994): Influence of incorporation of antibacterial monomer on curing behavior of a dental composite. *J Dent Res* 73, 1641-1645

Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y, McCabe JF, Russell RR (1994): Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite. *J Dent Res* 73, 1437-1443

Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y (1995): Antibacterial effect of composite incorporating Triclosan against *Streptococcus mutans*. *J Osaka Univ Dent Sch* 35, 5-11

Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Torii M, Russell RR, McCabe JF (1997): Incorporation of antibacterial monomer MDPB into dentin primer. *J Dent Res* 76, 768-772

Imazato S, Ebi N, Tarumi H, Russell RR, Kaneko T, Ebisu S (1999): Bactericidal activity and cytotoxicity of antibacterial monomer MDPB. *Biomaterials* 20, 899-903

Imazato S, Tay FR, Kaneshiro AV, Takahashi Y, Ebisu S (2007): An in vivo evaluation of bonding ability of comprehensive antibacterial adhesive system incorporating MDPB. *Dent Mater* 23, 170-176

Imirzalioglu P, Alaaddinoglu E, Yilmaz Z, Oduncuoglu B, Yilmaz B, Rosenstiel S (2012): Influence of recasting different types of dental alloys on gingival fibroblast cytotoxicity. *J Prosthet Dent* 107, 24-33

Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K (1996): A combines assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Bio Pharm Bull* 19, 1518-1520

Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K (1997): A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta* 44, 1299-1305

ISO-Norm / IOFS, Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität (ISO 10993-5:2009); Deutsche Fassung EN ISO 10993-5:2009

Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ (2004): Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dent Mater* 20, 12-20

Jagr M, Eckhardt A, Pataridis S, Broukal Z, Duskova J, Miksik I (2014): Proteomics of human teeth and saliva. *Physiol Res* 63 Suppl 1, 141-154

Jakob S: Antibakterielle Zusätze in dentalen Füllungswerkstoffen. Med. Diss. Regensburg 2012

Jedrychowski JR, Caputo AA, Kerper S (1983): Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *J Oral Rehabil* 10, 373-381

Jensen JL, Lamkin MS, Oppenheim FG (1992): Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite: a comparison between whole saliva and glandular salivary secretions. *J Dent Res* 71, 1569-1576

Jia H, Hou W, Wei L, Xu B, Liu X (2008): The structures and antibacterial properties of nano-SiO₂ supported silver/zinc-silver materials. *Dent Mater* 24, 244-249

Joharji RM, Adenubi JO (2001): Prevention of pit and fissure caries using an antimicrobial varnish: 9 month clinical evaluation. *J Dent* 29, 247-254

Jones N, Ray B, Ranjit KT, Manna AC (2008): Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 279, 71-76

Jones RD, Jampani HB, Newman JL, Lee AS (2000): Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *Am J Infect Control* 28, 184-196

Jordan RA, Micheelis W: Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie. Deutscher Zahnärzterverlag, Köln, 2016

Juriaanse AC, Booij M, Arends J, ten Bosch JJ (1981): The adsorption in vitro of purified salivary proteins on bovine dental enamel. *Arch Oral Biol* 26, 91-96

Kachur AV, Koch CJ, Biaglow JE (1999): Mechanism of copper-catalyzed autoxidation of cysteine. *Free Radic Res* 31, 23-34

Kaelble DH (1970): Dispersion-Polar Surface Tension Properties of Organic Solids. *Journal of Adhesion* 2, 66-78

Kapoor A, Malhotra R, Grover V, Grover D (2012): Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Dent Res J (Isfahan)* 9, 505-515

Kappert HF, Eichner K: Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung. Bd. 2: Werkstoffe unter klinischen Aspekten. 6. vollst. überarb. Auflage; Thieme, Stuttgart 2008

Karatan E, Watnick P (2009): Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. *Microbiol Mol Biol R* 73, 310-321

Karched M, Bhardwaj RG, Asikainen SE (2015): Coaggregation and biofilm growth of *Granulicatella* spp. with *Fusobacterium nucleatum* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *BMC Microbiol* 15, 114-119

Katsikogianni M, Missirlis YF (2004): Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater* 8, 37-57

Kawahara K, Tsuruda K, Morishita M, Uchida M (2000): Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dent Mater* 16, 452-455

Kawai K, Urano M (2001): Adherence of plaque components to different restorative materials. *Oper Dent* 26, 396-400

Kawashita M, Tsuneyama S, Miyaji F, Kokubo T, Kozuka H, Yamamoto K (2000): Antibacterial silver-containing silica glass prepared by sol-gel method. *Biomaterials* 21, 393-398

Kerezoudi C, Gogos C, Samanidou V, Tziafas D, Palaghias G (2016): Evaluation of monomer leaching from a resin cement through dentin by a novel model. *Dent Mater* 32, 297-305

Khammissa RA, Feller L, Meyerov R, Lemmer J (2012a): Peri-implant mucositis and peri-implantitis: bacterial infection. *SADJ* 67, 70, 72-74

Khammissa RA, Feller L, Meyerov R, Lemmer J (2012b): Peri-implant mucositis and peri-implantitis: clinical and histopathological characteristics and treatment. *SADJ* 67, 122, 124-126

Kielbassa AM: Speichel, orale Mikrobiologie und Bioadhäsion. Quintessenz-Verlags-GmbH, Berlin 2006

Kim O, Jaewoo Shim W (2001): Studies on the preparation and dental properties of antibacterial polymeric dental restorative composites containing alkylated ammonium chloride derivatives. *J Polym Res* 8, 49-57

Kinane DF (2001): Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000 25, 8-20

Kitasako Y, Senpuku H, Foxton RM, Hanada N, Tagami J (2004): Growth-inhibitory effect of antibacterial self-etching primer on mutans streptococci obtained from arrested carious lesions. *J Esthet Restor Dent* 16, 176-182; discussion 183-174

Kivela J, Parkkila S, Parkkila AK, Rajaniemi H (1999): A low concentration of carbonic anhydrase isoenzyme VI in whole saliva is associated with caries prevalence. *Caries Res* 33, 178-184

Klaiber B, Gruner W, Bredt W (1982): Antimicrobial Effectiveness of Root Filling Materials, Temporary Fixing Cements, and Pulp Protection or Capping Agents. *Dtsch Zahnarztl Z* 37, 448-451

Klaunick JD (1970): The testing of silver and copper containing zinc-phosphate cements according to the FDI specification number 6 and of their bacteriological activity. *Dtsch Zahnarztl Z* 25, 325-332

Klement D, Siebert G (1985): Quantification of the effect of fluoride on *Streptococcus mutans* NCTC 10449. *Dtsch Zahnarztl Z* 40, 1036-1039

Kloukos D, Pandis N, Eliades T (2013): Bisphenol-A and residual monomer leaching from orthodontic adhesive resins and polycarbonate brackets: a systematic review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 143, S104-112 e101-102

Kocher T, Langenbeck N, Rosin M, Bernhardt O (2002): Methodology of three-dimensional determination of root surface roughness. *J Periodontal Res* 37, 125-131

Kolenbrander PE (2000): Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol* 54, 413-437

Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ, Jr. (2002): Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 486-505

Koo H, Xiao J, Klein MI (2009): Extracellular polysaccharides matrix--an often forgotten virulence factor in oral biofilm research. *Int J Oral Sci* 1, 229-234

Koo H, Falsetta ML, Klein MI (2013): The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res* 92, 1065-1073

Korkmaz FM, Tuzuner T, Baygin O, Buruk CK, Durkan R, Bagis B (2013): Antibacterial activity, surface roughness, flexural strength, and solubility of conventional luting cements containing chlorhexidine diacetate/cetrimide mixtures. *J Prosthet Dent* 110, 107-115

Kouassi M, Michalesco P, Lacoste-Armynot A, Boudeville P (2003): Antibacterial effect of a hydraulic calcium phosphate cement for dental applications. *J Endod* 29, 100-103

Krasse B: Die Quintessenz des Kariesrisikos. Quintessenz, Berlin, 1986

Kreulen CM, de Soet JJ, Weerheijm KL, van Amerongen WE (1997): In vivo cariostatic effect of resin modified glass ionomer cement and amalgam on dentine. *Caries Res* 31, 384-389

Krüss: Kontaktwinkel eines liegenden Tropfens. Krüss GmbH, <http://www.kruss.de> 2010

<https://www.kruss.de/de/service/schulung-theorie/substanzdaten/festkoerper/>; Zugriff am 05.01.2017

Kudou Y, Obara K, Kawashima T, Kubota M, Abe S, Endo T, Komatsu M, Okuda R (2000): Addition of antibacterial agents to MMA-TBB dentin bonding systems--influence on tensile bond strength and antibacterial effect. *Dent Mater J* 19, 65-74

Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W (2007): Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 653-670

Kwok DY, Neumann AW (1999): Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Adv Colloid Interfac* 81, 167-249

Kwon JS, Illeperuma RP, Kim J, Kim KM, Kim KN (2014): Cytotoxicity evaluation of zinc oxide-eugenol and non-eugenol cements using different fibroblast cell lines. *Acta Odontol Scand* 72, 64-70

Lado EA, Pappas J, Tyler K, Stanley HR, Walker C (1986): In vitro antimicrobial activity of six pulp-capping agents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 61, 197-200

Lai CC, Huang FM, Yang HW, Chan Y, Huang MS, Chou MY, Chang YC (2001): Antimicrobial activity of four root canal sealers against endodontic pathogens. *Clin Oral Investig* 5, 236-239

Larsen MJ, Jensen AF, Madsen DM, Pearce EI (1999): Individual variations of pH, buffer capacity, and concentrations of calcium and phosphate in unstimulated whole saliva. *Arch Oral Biol* 44, 111-117

Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE (1991): Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* 173, 6558-6567

Le Magrex-Debar E, Lemoine J, Gelle MP, Jacquelin LF, Choisy C (2000): Evaluation of biohazards in dehydrated biofilms on foodstuff packaging. *Int J Food Microbiol* 55, 239-243

Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C (2013): From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens* 2, 288-356

Leid JG, Shirliff ME, Costerton JW, Stoodley P (2002): Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun* 70, 6339-6345

Leidal TI, Eriksen HM (1979): A scanning electron microscopic study of the effect of various cleansing agents on cavity walls in vitro. *Scand J Dent Res* 87, 443-449

- Leirskar J, Helgeland K (1977): Toxicity of some dental cements in a cell culture system. *Scand J Dent Res* 85, 471-479
- Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG (2000a): Saliva and dental pellicle--a review. *Adv Dent Res* 14, 22-28
- Leung D, Spratt DA, Pratten J, Gulabivala K, Mordan NJ, Young AM (2005): Chlorhexidine-releasing methacrylate dental composite materials. *Biomaterials* 26, 7145-7153
- Leung RL, Loesche WJ, Charbeneau GT (1980): Effect of Dycal on bacteria in deep carious lesions. *J Am Dent Assoc* 100, 193-197
- Levine MJ (1993): Development of artificial salivas. *Crit Rev Oral Biol Med* 4, 279-286
- Li CX, Gleason JE, Zhang SX, Bruno VM, Cormack BP, Culotta VC (2015): *Candida albicans* adapts to host copper during infection by swapping metal cofactors for superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E5336-5342
- Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS, Oppenheim FG (2004): Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 97, 1311-1318
- Li YH, Lau PC, Lee JH, Ellen RP, Cvitkovitch DG (2001): Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J Bacteriol* 183, 897-908
- Li YH, Tang N, Aspiras MB, Lau PC, Lee JH, Ellen RP, Cvitkovitch DG (2002): A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 184, 2699-2708
- Lie T (1977): Early Dental Plaque Morphogenesis - Scanning Electron-Microscope Study Using Hydroxyapatite Splint Model and a Low-Sucrose Diet. *J Periodontal Res* 12, 73-89
- Lie T (1978): Ultrastructural-Study of Early Dental Plaque-Formatio.n *J Periodontal Res* 13, 391-409
- Lie T (1979): Morphologic Studies on Dental Plaque-Formation - Summary. *Acta Odontol Scand* 37, 73-85
- Liljemark WF, Bloomquist CG, Reilly BE, Bernards CJ, Townsend DW, Pennock AT, LeMoine JL (1997): Growth dynamics in a natural biofilm and its impact on oral disease management. *Adv Dent Res* 11, 14-23
- Limoli DH, Jones CJ, Wozniak DJ (2015): Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiol Spectr* 3, 1-30

Lindh L (2002): On the adsorption behaviour of saliva and purified salivary proteins at solid/liquid interfaces. *Swed Dent J Suppl* 152, 1-57

Listgarten MA (1994): The structure of dental plaque. *Periodontol* 2000 5, 52-65

Lobo MM, Goncalves RB, Pimenta LA, Bedran-Russo AK, Pereira PN (2005): In vitro evaluation of caries inhibition promoted by self-etching adhesive systems containing antibacterial agents. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 75, 122-127

Madsen JS, Burmolle M, Hansen LH, Sorensen SJ (2012): The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65, 183-195

Maeglin B (1953): Bacteriological studies on antiseptic support cements. *Dtsch Zahnarztl Z* 8, 149-150; suppl

Maeyama R, Mizunoe Y, Anderson JM, Tanaka M, Matsuda T (2004): Confocal imaging of biofilm formation process using fluoroprobed *Escherichia coli* and fluorostained exopolysaccharide. *J Biomed Mater Res A* 70, 274-282

Mahasti S, Sattari M, Romoozi E, Akbar-Zadeh Baghban A (2011): Cytotoxicity Comparison of Harvard Zinc Phosphate Cement Versus Panavia F2 and Rely X Plus Resin Cements on Rat L929-fibroblasts. *Cell J* 13, 163-168

Mahr / MarSurf, Oberflächen-Kenngrößen, Rauheitsmessung mit dem MarSurf. Mahr GmbH, Göttingen, 2014

Mandel ID (1987): The functions of saliva. *J Dent Res* 66 Spec No, 623-627

Mangi SL, Summers WA, Phillips RW, Swartz ML (1959): Antibacterial action of certain fluoride-containing dental restorative materials. *J Dent Res* 38, 88-95

Marques SM, Esteves da Silva JC (2009): Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB Life* 61, 6-17

Marquis RE (1995): Antimicrobial actions of fluoride for oral bacteria. *Can J Microbiol* 41, 955-964

Marsh P, Martin, MV: Zahnplaque: Orale Mikrobiologie; hrsg v. Marsh P, Martin MV; Thieme, Stuttgart 2003, 67-94

Marsh PD (1991): Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque. *Proc Finn Dent Soc* 87, 515-525

Marsh PD (1994): Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 8, 263-271

Marsh PD (1999): Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent Clin North Am* 43, 599-614

- Marsh PD, Bradshaw DJ (1995): Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* 15, 169-175
- Marxkors R, Meiners, H.: Taschenburch der zahnärztlichen Werkstoffkunde. Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln 2005
- Maske TT, Brauner KV, Nakanishi L, Arthur RA, van de Sande FH, Cenci MS (2016): An in vitro dynamic microcosm biofilm model for caries lesion development and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling* 32, 339-348
- Mayer R, Chrenko M, Weeh N (1988): Dentin dressings in bacteriological test. *Dtsch Zahnarztl Z* 43, 865-868
- McCue RW, McDougal FG, Shay DE (1951): The antibacterial properties of some dental restorative materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 4, 1180-1184
- McComb D, Ericson D (1987): Antimicrobial action of new, proprietary lining cements. *J Dent Res* 66, 1025-1028
- McComb D, Erickson RL, Maxymiw WG, Wood RE (2002): A clinical comparison of glass ionomer, resin-modified glass ionomer and resin composite restorations in the treatment of cervical caries in xerostomic head and neck radiation patients. *Oper Dent* 27, 430-437
- McDermid AS, McKee AS, Ellwood DC, Marsh PD (1986): The effect of lowering the pH on the composition and metabolism of a community of nine oral bacteria grown in a chemostat. *J Gen Microbiol* 132, 1205-1214
- McMurry LM, Oethinger M, Levy SB (1998): Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* 394, 531-532
- McNeill K, Hamilton IR (2003): Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* 221, 25-30
- Meckel AH (1965): The formation and properties of organic films on teeth. *Arch Oral Biol* 10, 585-598
- Meeker HG, Najafi MM, Linke HA (1986): Germicidal properties of dental cavity liners, bases, and cements. *Gen Dent* 34, 474-478
- Meeker HG, Kaim JM, Linke HA, Scherer WI (1990): Antibacterial properties of Dycal and visible-light-cured Dycal (Prisma VLC Dycal). *Gen Dent* 38, 121-124
- Meiers JC, Miller GA (1996): Antibacterial activity of dentin bonding systems, resin-modified glass ionomers, and polyacid-modified composite resins. *Oper Dent* 21, 257-264
- Meng H, Han D, Zhan DS (2009): Effects of different dental alloys on cytotoxic and apoptosis related genes expression of mouse fibroblast cells L929. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 44, 497-501

Mergenhagen SE, Sandberg AL, Chassy BM, Brennan MJ, Yeung MK, Donkersloot JA, Cisar JO (1987): Molecular basis of bacterial adhesion in the oral cavity. *Rev Infect Dis* 9 Suppl 5, S467-474

Mermel LA (2015): The human-microbe metaorganism, evolution and extraterrestrial colonization. *Future Microbiol* 10, 1269-1270

Meryon SD, Johnson SG (1989): The modified model cavity method for assessing antibacterial properties of dental restorative materials. *J Dent Res* 68, 835-839

Mese H, Matsuo R (2007): Salivary secretion, taste and hyposalivation. *J Oral Rehabil* 34, 711-723

Michels HT, Noyce JO, Keevil CW (2009): Effects of temperature and humidity on the efficacy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* challenged antimicrobial materials containing silver and copper. *Lett Appl Microbiol* 49, 191-195

Mickel AK, Wright ER (1999): Growth inhibition of *Streptococcus anginosus* (milleri) by three calcium hydroxide sealers and one zinc oxide-eugenol sealer. *J Endod* 25, 34-37

Milheiro A, Nozaki K, Kleverlaan CJ, Muris J, Miura H, Feilzer AJ (2016): In vitro cytotoxicity of metallic ions released from dental alloys. *Odontology* 104, 136-142

Mineoka T, Awano S, Rikimaru T, Kurata H, Yoshida A, Ansai T, Takehara T (2008): Site-specific development of periodontal disease is associated with increased levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque. *J Periodontol* 79, 670-676

Mitra SB (1991): In vitro fluoride release from a light-cured glass-ionomer liner/base. *J Dent Res* 70, 75-78

Mjor I (1977): Histologic demonstration of bacteria subjacent to dental restorations. *Scand J Dent Res* 85, 169-174

Mjor IA, Tronstad L (1972): Experimentally induced pulpitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 34, 102-108

Mo SS, Bao W, Lai GY, Wang J, Li MY (2010): The microfloral analysis of secondary caries biofilm around Class I and Class II composite and amalgam fillings. *BMC Infect Dis* 10, 241

Molin S, Tolker-Nielsen T (2003): Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotech* 14, 255-261

Molteni C, Abicht HK, Solioz M (2010): Killing of bacteria by copper surfaces involves dissolved copper. *Appl Environ Microbiol* 76, 4099-4101

Monroe D (2007): Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms *PLoS Biol* 5, e307

Moran J, Addy M, Kohut B, Hovliaras CA, Newcombe RG (1994): Efficacy of mouthrinses in inhibiting the development of supragingival plaque over a 4-day period of no oral hygiene. *J Periodontol* 65, 904-907

Morgan TD, Wilson M (2001): The effects of surface roughness and type of denture acrylic on biofilm formation by *Streptococcus oralis* in a constant depth film fermentor. *J Appl Microbiol* 91, 47-53

Morita Y, Imai S, Hanyuda A, Matin K, Hanada N, Nakamura Y (2014): Effect of silver ion coating of fixed orthodontic retainers on the growth of oral pathogenic bacteria. *Dent Mater J* 33, 268-274

Moritz M, Geszke-Moritz M (2013): The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. *Chem Eng J* 228, 596-613

Morrier JJ, Barsotti O, Blanc-Benon J, Rocca JP, Dumont J (1989): Antibacterial properties of five dental amalgams: an in vitro study. *Dent Mater* 5, 310-313

Morrier JJ, Suchett-Kaye G, Nguyen D, Rocca JP, Blanc-Benon J, Barsotti O (1998): Antimicrobial activity of amalgams, alloys and their elements and phases. *Dent Mater* 14, 150-157

Muller R, Groger G, Hiller KA, Schmalz G, Ruhl S (2007): Fluorescence-based bacterial overlay method for simultaneous in situ quantification of surface-attached bacteria. *Appl Environ Microbiol* 73, 2653-2660

Munksgaard EC, Asmussen E (1984): Bond strength between dentin and restorative resins mediated by mixtures of HEMA and glutaraldehyde. *J Dent Res* 63, 1087-1089

Munukka E, Lepparanta O, Korkeamaki M, Vaahtio M, Peltola T, Zhang D, Hupa L, Ylanen H, Salonen JI, Viljanen MK, et al. (2008): Bactericidal effects of bioactive glasses on clinically important aerobic bacteria. *J Mater Sci Mater Med* 19, 27-32

Nagaoka S, Hojo K, Murata S, Mori T, Ohshima T, Maeda N (2008): Interactions between salivary *Bifidobacterium adolescentis* and other oral bacteria: in vitro coaggregation and coadhesion assays. *FEMS Microbiol Lett* 281, 183-189

Nakajima H, Komatsu H, Okabe T (1997): Aluminum ions in analysis of released fluoride from glass ionomers. *J Dent* 25, 137-144

National Center for Biotechnology Information: CID=6099081. hrsg. [<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6099081> Zugriff am 30.01.2017] National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Database 2015a

National Center for Biotechnology Information: CID=101049151. hrsg. [<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/101049151> Zugriff am 30.01.2017] National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Database 2015b

Naumova EA, Valta A, Schaper K, Arnold WH, Piwowarczyk A (2015): Microleakage of Different Self-Adhesive Materials for Lithium Disilicate CAD/CAM Crowns. *Materials* 8, 3238-3253

Neel EA, Ahmed I, Pratten J, Nazhat SN, Knowles JC (2005): Characterisation of antibacterial copper releasing degradable phosphate glass fibres. *Biomaterials* 26, 2247-2254

Netuschil L, Vohrer KG, Riethe P, Kasloff Z, Brex M (1996): Antibacterial effects of amalgams on mutans streptococci in an in vitro biofilm test procedure. *Acta Stomatol Belg* 93, 73-78

Neu TR, Lawrence JR (2015): Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales. *Trends in Microbiol* 23, 233-242

Neyraud E, Palicki O, Schwartz C, Nicklaus S, Feron G (2012): Variability of human saliva composition: possible relationships with fat perception and liking. *Arch Oral Biol* 57, 556-566

Nourollahi M, Meryon SD (1989): The antibacterial properties of four elements released from dental restorative materials. *Int Endod J* 22, 9-16

Novotna Z, Reznickova A, Rimpelova S, Vesely M, Kolska Z, Svorcik V (2015): Tailoring of PEEK bioactivity for improved cell interaction: plasma treatment in action. *Rsc Advances* 5, 41428-41436

Noyce JO, Michels H, Keevil CW (2006): Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment. *J Hosp Infect* 63, 289-297

Nunez LJ, Schmalz G, Hembree J (1976a): Influence of amalgam, alloy, and mercury on the in vitro growth of *Streptococcus mutans*: I. Biological test system. *J Dent Res* 55, 257-261

Nunez LJ, Schmalz G, Hembree J, Hulett LD, Jr. (1976b): Influence of amalgam, alloy, and mercury on the in vitro growth of *Streptococcus mutans*: II. Comparison of amalgams and alloys. *J Dent Res* 55, 893-899

Nunez LJ, Schmalz G, Hembree JH (1976c): Influence of amalgam, alloy, and Hg on the in vitro growth of *Streptococcus mutans*: III. Effect of specimen age and composition. *J Dent Res* 55, 1001-1003

Nyvad B, Fejerskov O (1987): Scanning electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 95, 287-296

O'Brien J, Pognan F (2001): Investigation of the Alamar blue (Resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Toxicology* 164, 132-132

- Ogaard B, Larsson E, Henriksson T, Birkhed D, Bishara SE (2001): Effects of combined application of antimicrobial and fluoride varnishes in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 120, 28-35
- Ohashi S, Saku S, Yamamoto K (2004): Antibacterial activity of silver inorganic agent YDA filler. *J Oral Rehabil* 31, 364-367
- Oilo G, Jorgensen KD (1978): The influence of surface roughness on the retentive ability of two dental luting cements. *J Oral Rehabil* 5, 377-389
- Ollos PJ, Huck PM, Slawson RM (2003): Factors affecting biofilm accumulation in model distribution systems. *J Am Water Works Ass* 95, 87-96
- Oppermann RV, Rolla G, Johansen JR, Assev S (1980): Thiol groups and reduced acidogenicity of dental plaque in the presence of metal ions in vivo. *Scand J Dent Res* 88, 389-396
- Orstavik D (1985): Antibacterial properties of and element release from some dental amalgams. *Acta Odontol Scand* 43, 231-239
- Osinaga PW, Grande RH, Ballester RY, Simionato MR, Delgado Rodrigues CR, Muench A (2003): Zinc sulfate addition to glass-ionomer-based cements: influence on physical and antibacterial properties, zinc and fluoride release. *Dent Mater* 19, 212-217
- Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL (1998): Cytotoxicity of endodontic materials. *J Endod* 24, 91-96
- Othman HF, Wu CD, Evans CA, Drummond JL, Matasa CG (2002): Evaluation of antimicrobial properties of orthodontic composite resins combined with benzalkonium chloride. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 122, 288-294
- Owens DK, Wendt RC (1969): Estimation of Surface Free Energy of Polymers. *Journal of Applied Polymer Science* 13, 1741-1749
- Ozer F, Karakaya S, Unlu N, Erganis O, Kav K, Imazato S (2003): Comparison of antibacterial activity of two dentin bonding systems using agar well technique and tooth cavity model. *J Dent* 31, 111-116
- Padovani GC, Feitosa VP, Sauro S, Tay FR, Duran G, Paula AJ, Duran N (2015): Advances in Dental Materials through Nanotechnology: Facts, Perspectives and Toxicological Aspects. *Trends Biotechnol* 33, 621-636
- Palk L, Sneyd J, Shuttleworth TJ, Yule DI, Crampin EJ (2010): A dynamic model of saliva secretion. *J Theor Biol* 266, 625-640
- Palmer RJ, Jr., Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE (2003): Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. *J Bacteriol* 185, 3400-3409
- Pameijer CH (2012): A review of luting agents. *Int J Dent* 2012, 752861

- Paramonova E, Kalmykova OJ, van der Mei HC, Busscher HJ, Sharma PK (2009): Impact of hydrodynamics on oral biofilm strength. *J Dent Res* 88, 922-926
- Pawlig O: Grundlegende Untersuchungen zur Abbindereaktion von Zinkphosphatzement. Geol. Diss. Mainz 2001
- Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB, Nauntofte B (2002): Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis* 8, 117-129
- Periasamy S, Kolenbrander PE (2010): Central role of the early colonizer *Veillonella* sp. in establishing multispecies biofilm communities with initial, middle, and late colonizers of enamel. *J Bacteriol* 192, 2965-2972
- Petersson LG, Edwardsson S, Arends J (1992): Antimicrobial effect of a dental varnish, in vitro. *Swed Dent J* 16, 183-189
- Petrova OE, Sauer K (2016): Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Current Opin Microbiol* 30, 67-78
- Phattarataratip E, Olson B, Broffitt B, Qian F, Brogden KA, Drake DR, Levy SM, Banas JA (2011): *Streptococcus mutans* strains recovered from caries-active or caries-free individuals differ in sensitivity to host antimicrobial peptides. *Mol Oral Microbiol* 26, 187-199
- Pienihakkinen K, Soderling E, Ostela I, Leskela I, Tenovuo J (1995): Comparison of the efficacy of 40% chlorhexidine varnish and 1% chlorhexidine-fluoride gel in decreasing the level of salivary *mutans streptococci*. *Caries Res* 29, 62-67
- Pieralisi FJ, Rodrigues MR, Segura VG, Maciel SM, Ferreira FB, Garcia JE, Poli-Frederico RC (2010): Genotypic Diversity of *Streptococcus mutans* in Caries-Free and Caries-Active Preschool Children. *Int J Dent* 2010, 824976
- Pinheiro SL, Simionato MR, Imparato JC, Oda M (2005): Antibacterial activity of glass-ionomer cement containing antibiotics on caries lesion microorganisms. *Am J Dent* 18, 261-266
- Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola CR, Granchi D, Savarino L (1994): Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin Mater* 15, 173-190
- Polydorou O, Konig A, Hellwig E, Kummerer K (2009): Long-term release of monomers from modern dental-composite materials. *Eur J Oral Sci* 117, 68-75
- Pontes EC, Soares DG, Hebling J, Costa CA (2014): Cytotoxicity of resin-based luting cements to pulp cells. *Am J Dent* 27, 237-244
- Pontoriero R, Tonelli MP, Carnevale G, Mombelli A, Nyman SR, Lang NP (1994): Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. *Clin Oral Implants Res* 5, 254-259
- Poole K (2001): Overcoming antimicrobial resistance by targeting resistance mechanisms. *J Pharm Pharmacol* 53, 283-294

Poon CY, Bhushan B (1995): Comparison of surface roughness measurements by stylus profiler, AFM and non-contact optical profiler. *Wear* 190, 76-88

Prantl L, Burgers R, Schreml S, Zellner J, Gosau M (2010): A novel antibacterial silicone implant material with short- and long-term release of copper ions. *Plast Reconstr Surg* 125, 78e-80e

Prati C, Fava F, Di Gioia D, Selighini M, Pashley DH (1993): Antibacterial effectiveness of dentin bonding systems. *Dent Mater* 9, 338-343

Preshaw PM, Seymour RA, Heasman PA (2004): Current concepts in periodontal pathogenesis. *Dent Update* 31, 570-572, 574-578

Pschyrembel W: Pschyrembel Klinisches Wörterbuch Online. [siehe <https://www.pschyrembel.de>, Zugriff am 08.12.2016] Walter De Gruyter GmbH, Berlin 2016

Purevdorj-Gage B, Costerton WJ, Stoodley P (2005): Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbiology-Sgm* 151, 1569-1576

Quaranta D, Krans T, Espirito Santo C, Elowsky CG, Domaille DW, Chang CJ, Grass G (2011): Mechanisms of contact-mediated killing of yeast cells on dry metallic copper surfaces. *Appl Environ Microbiol* 77, 416-426

Quirynen M (1994): The clinical meaning of the surface roughness and the surface free energy of intra-oral hard substrata on the microbiology of the supra- and subgingival plaque: results of in vitro and in vivo experiments. *J Dent* 22 Suppl 1, S13-16

Quirynen M, Bollen CM (1995): The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol* 22, 1-14

Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, van Steenberghe D (1990): The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. *J Clin Periodontol* 17, 138-144

Quirynen M, Soers C, Desnyder M, Dekeyser C, Pauwels M, van Steenberghe D (2005): A 0.05% cetyl pyridinium chloride/0.05% chlorhexidine mouth rinse during maintenance phase after initial periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 32, 390-400

Raap U, Stiesch M, Kapp A (2012): Contact allergy to dental materials. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 10, 391-396

Rabe M, Verdes D, Seeger S (2011): Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* 162, 87-106

Rabel W (1971): Einige Aspekte der Benetzungstheorie und ihre Anwendung auf die Untersuchung und Veränderung der Oberflächeneigenschaften von Polymeren. *Farbe und Lack* 77, 997-1005

Rädel M, Bohm S, Priess H-W, Walter M: Barmer GEK Zahnreport 2016. Asgard Verlagsservice GmbH, Siegburg 2016

Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ (2014): Antibiotic resistance in human peri-implantitis microbiota. *Clin Oral Implants Res* 25, 82-90

Ramseier CA, Kinney JS, Herr AE, Braun T, Sugai JV, Shelburne CA, Rayburn LA, Tran HM, Singh AK, Giannobile WV (2009): Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. *J Periodontol* 80, 436-446

Rasmussen B (2000): Filamentous microfossils in a 3,235-million-year-old volcanogenic massive sulphide deposit. *Nature* 405, 676-679

Rathbun MA, Craig RG, Hanks CT, Filisko FE (1991): Cytotoxicity of a BIS-GMA dental composite before and after leaching in organic solvents. *J Biomed Mater Res* 25, 443-457

Rathore M, Singh A, Pant VA (2012): The dental amalgam toxicity fear: a myth or actuality. *Toxicol Int* 19, 81-88

Raval NC, Wadhvani CP, Jain S, Darveau RP (2015): The Interaction of Implant Luting Cements and Oral Bacteria Linked to Peri-Implant Disease: An In Vitro Analysis of Planktonic and Biofilm Growth--A Preliminary Study. *Clin Implant Dent Relat Res* 17, 1029-1035

Ray CA, Gfell LE, Buller TL, Gregory RL (1999): Interactions of *Streptococcus mutans* fimbria-associated surface proteins with salivary components. *Clin Diagn Lab Immunol* 6, 400-404

Ren L, Chong J, Loya A, Kang Q, Stair JL, Nan L, Ren G (2015): Determination of Cu²⁺ ions release rate from antimicrobial copper bearing stainless steel by joint analysis using ICP-OES and XPS. *Mater Technol* 30, B86-B89

Renton-Harper P, Addy M, Moran J, Doherty FM, Newcombe RG (1996): A comparison of chlorhexidine, cetylpyridinium chloride, triclosan, and C31G mouthrinse products for plaque inhibition. *J Periodontol* 67, 486-489

Ribeiro J, Ericson D (1991): In vitro antibacterial effect of chlorhexidine added to glass-ionomer cements. *Scand J Dent Res* 99, 533-540

Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS (2003): Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol* 11, 94-100

Rickard AH, Palmer RJ, Jr., Blehert DS, Campagna SR, Semmelhack MF, Eglund PG, Bassler BL, Kolenbrander PE (2006): Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. *Mol Microbiol* 60, 1446-1456

Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al.: Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al. (Hrsg.): Assay Guidance Manual. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. [siehe https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/#_NBK144065_pubdet_]

Roberts HW, Charlton DG (2009): The release of mercury from amalgam restorations and its health effects: a review. *Oper Dent* 34, 605-614

Roda A, Guardigli M (2012): Analytical chemiluminescence and bioluminescence: latest achievements and new horizons. *Anal Bioanal Chem* 402, 69-76

Roda A, Pasini P, Mirasoli M, Michelini E, Guardigli M (2004): Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. *Trends Biotechnol* 22, 295-303

Roder HL, Sorensen SJ, Burmolle M (2016): Studying Bacterial Multispecies Biofilms: Where to Start? *Trends Microbiol* 24, 503-513

Rogers SA, Kraymer M, Lindsey JS, Melander C (2009): Tandem dispersion and killing of bacteria from a biofilm. *Organic & Biomolecular Chemistry* 7, 603-606

Romani AM, Fund K, Artigas J, Schwartz T, Sabater S, Obst U (2008): Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. *Microb Ecol* 56, 427-436

Rosan B, Lamont RJ (2000): Dental plaque formation. *Microbes Infect* 2, 1599-1607

Rosenstiel SF, Land MF, Crispin BJ (1998): Dental luting agents: A review of the current literature. *J Prosthet Dent* 80, 280-301

Rowe MC, Withers HL, Swift S (2010): Uropathogenic *Escherichia coli* forms biofilm aggregates under iron restriction that disperse upon the supply of iron. *Fems Microbiol Lett* 307, 102-109

Rudney JD (1995): Does variability in salivary protein concentrations influence oral microbial ecology and oral health? *Crit Rev Oral Biol Med* 6, 343-367

Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spangberg LS (2003): Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 95, 483-489

Saito K, Hayakawa T, Kawabata R, Meguro D, Kasai K (2007): Antibacterial activity and shear bond strength of 4-methacryloxyethyl trimellitate anhydride/methyl methacrylate-tri-n-butyl borane resin containing an antibacterial agent. *Angle Orthod* 77, 532-536

Salcedo DE, Lee JH, Ha UH, Kim SP (2015): The effects of antibiotics on the biofilm formation and antibiotic resistance gene transfer. *Desali Water Treat* 54, 3582-3588

Sanchez MC, Llama-Palacios A, Marin MJ, Figuero E, Leon R, Blanc V, Herrera D, Sanz M (2013): Validation of ATP bioluminescence as a tool to assess antimicrobial effects of mouthrinses in an in vitro subgingival-biofilm model. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 18, e86-92

Sander M: A practical guide to the assessment of surface texture. Feinprüf Perthen, Mahr GmbH, Göttingen 1991

Sanderink RB: Curriculum orale Mikrobiologie und Immunologie. Quintessenz-Verlag, Berlin 2004

Sanders BJ, Gregory RL, Moore K, Avery DR (2002): Antibacterial and physical properties of resin modified glass-ionomers combined with chlorhexidine. *J Oral Rehabil* 29, 553-558

Sandham HJ, Brown J, Phillips HI, Chan KH (1988): A preliminary report of long-term elimination of detectable mutans streptococci in man. *J Dent Res* 67, 9-14

Sauer K, Cullen MC, Rickard AH, Zeef LA, Davies DG, Gilbert P (2004): Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J Bacteriol* 186, 7312-7326

Savioli RN, Pecora JD, Mian H, Ito IY (2006): Evaluation of the antimicrobial activity of each component in Grossman's sealer. *Braz Oral Res* 20, 127-131

Scannapieco FA, Torres GI, Levine MJ (1995): Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite. *J Dent Res* 74, 1360-1366

Schaeken MJ, van der Hoeven JS, Hendriks JC (1989): Effects of varnishes containing chlorhexidine on the human dental plaque flora. *J Dent Res* 68, 1786-1789

Schaudinn C, Carr G, Gorur A, Jaramillo D, Costerton JW, Webster P (2009): Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/cLSM - SEM). *J Microsc* 235, 124-127

Schedle A, Franz A, Rausch-Fan X, Spittler A, Lucas T, Samorapoompichit P, Sperr W, Boltz-Nitulescu G (1998): Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. *Dent Mater* 14, 429-440

Scheie AA (1994): Mechanisms of dental plaque formation. *Adv Dent Res* 8, 246-253

Scherer W, Lippman N, Kaim J, LoPresti J (1990a): Antimicrobial properties of VLC liners. *J Esthet Dent* 2, 31-32

Scherer W, Lippman N, Kaim J (1989): Antimicrobial properties of glass-ionomer cements and other restorative materials. *Oper Dent* 14, 77-81

Scherer W, Cooper H, Antonelli J (1990b): Antimicrobial properties of dental dentin-enamel adhesives. *J Esthet Dent* 2, 140-141

Schmalz G (1977): The effect of various front tooth filling materials on the in vitro growth of *Streptococcus mutans*. *Dtsch Zahnarztl Z* 32, 575-579

Schmalz G (1982): Analysis of Correlations between Cell-Cultures and Animal-Experiments. *Dtsch Zahnarztl Z* 37, 184-186

Schmalz G (1987): Antimicrobial properties of a zinc oxyphosphate cement and a glass ionomer cement with and without silver additives. *Dtsch Zahnarztl Z* 42, 628-632

Schmalz G (1994): Use of Cell-Cultures for Toxicity Testing of Dental Materials Advantages and Limitations. *Journal of Dentistry* 22, S6-S11

Schmalz G, Rotgans J (1977): Antimicrobial properties of cements with and without copper content. *Dtsch Zahnarztl Z* 32, 760-762

Schmalz G, ArenholtBindslev D, Pfuller S, Schweikl H (1997): Cytotoxicity of metal cations used in dental cast alloys. *ATLA* 25, 323-330

Schmalz G, Ergucu Z, Hiller KA (2004): Effect of dentin on the antibacterial activity of dentin bonding agents. *J Endod* 30, 352-358

Schmid-Schwap M, Franz A, Konig F, Bristela M, Lucas T, Piehslinger E, Watts DC, Schedle A (2009): Cytotoxicity of four categories of dental cements. *Dent Mater* 25, 360-368

Schwartzman B, Caputo AA, Schein B (1980): Antimicrobial action of dental cements. *J Prosthet Dent* 43, 309-312

Schweikl H, Schmalz G (1996): Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J Oral Sci* 104, 292-299

Sehgal V, Shetty VS, Mogra S, Bhat G, Eipe M, Jacob S, Prabu L (2007): Evaluation of antimicrobial and physical properties of orthodontic composite resin modified by addition of antimicrobial agents--an in-vitro study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 131, 525-529

Sengun A, Yalcin M, Ulker HE, Ozturk B, Hakki SS (2011): Cytotoxicity evaluation of dentin bonding agents by dentin barrier test on 3-dimensional pulp cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 112, e83-88

Seppa L, Forss H, Ogaard B (1993): The effect of fluoride application on fluoride release and the antibacterial action of glass ionomers. *J Dent Res* 72, 1310-1314

Seppa L, Korhonen A, Nuutinen A (1995): Inhibitory effect on *S. mutans* by fluoride-treated conventional and resin-reinforced glass ionomer cements. *Eur J Oral Sci* 103, 182-185

Servais GE, Cartz L (1971): Structure of Zinc Phosphate Dental Cement. *J Dent Res* 50, 613-620

Shapiro L, Lodato FM, Jr., Courant PR, Stallard RE (1972): Endotoxin determinations in gingival inflammation. *J Periodontol* 43, 591-596

Shay DE, Allen TJ, Mantz RF (1956): The antibacterial effects of some dental restorative materials. *J Dent Res* 35, 25-32

Shintani H, Sakudo A, McDonnell GE (2011): Methods of rapid microbiological assay and their application to pharmaceutical and medical device fabrication. *Biocontrol Sci* 16, 13-21

Sidhu SK, Nicholson JW (2016): A Review of Glass-Ionomer Cements for Clinical Dentistry. *J Funct Biomater* 7, 2-15

Simon-Soro A, Guillen-Navarro M, Mira A (2014): Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *J Oral Microbiol* 6, 25443

Singh AV, Vyas V, Patil R, Sharma V, Scopelliti PE, Bongiorno G, Podesta A, Lenardi C, Gade WN, Milani P (2011): Quantitative characterization of the influence of the nanoscale morphology of nanostructured surfaces on bacterial adhesion and biofilm formation. *PLoS One* 6, e25029

Sisman R, Aksoy A, Yalcin M, Karaoz E (2016): Cytotoxic effects of bulk fill composite resins on human dental pulp stem cells. *J Oral Sci* 58, 299-305

Skjorland K, Gjermo P, Rolla G (1978): Effect of some polyvalent cations on plaque formation in vivo. *Scand J Dent Res* 86, 103-107

Skjorland KK, Rykke M, Sonju T (1995): Rate of pellicle formation in vivo. *Acta Odontol Scand* 53, 358-362

Slots J (1977a): The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. *Scand J Dent Res* 85, 114-121

Slots J (1977b): Microflora in the healthy gingival sulcus in man. *Scand J Dent Res* 85, 247-254

Smiley CJ, Tracy SL, Abt E, Michalowicz BS, John MT, Gunsolley J, Cobb CM, Rossmann J, Harrel SK, Forrest JL, et al. (2015): Systematic review and meta-analysis on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planing with or without adjuncts. *J Am Dent Assoc* 146, 508-524 e505

Socransky SS, Haffajee AD (1992): The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 63, 322-331

Socransky SS, Haffajee AD (1994): Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000* 5, 7-25

Sogn JA, Gibbons WA, Randall EW (1973): Study of nitrogen-15-labeled amino acids and peptides by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 12, 2100-2105

- Solano C, Echeverz M, Lasa I (2014): Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* 18, 96-104
- Sonju T, Rolla G (1973): Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. Rate of formation and amino acid analysis. *Caries Res* 7, 30-38
- Staehele HJ, Pioch T, Hoppe W (1989): The alkalizing properties of calcium hydroxide compounds. *Endod Dent Traumatol* 5, 147-152
- Stanley PE (1989): A review of bioluminescent ATP techniques in rapid microbiology. *J Biolumin Chemilumin* 4, 375-380
- Stephens DJ, Allan VJ (2003): Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science* 300, 82-86
- Stewart PS, Costerton JW (2001): Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358, 135-138
- Stipetic J, Celebic A, Catovic A (1998): Early antibacterial effect of Pd-Ag dental alloy on aerobic and microaerophilic flora in oral cavity. *Coll Antropol* 22 Suppl, 31-38
- Stoodley P, Debeer D, Lewandowski Z (1994): Liquid flow in biofilm systems. *Appl Environ Microbiol* 60, 2711-2716
- Stoodley P, Wilson S, Hall-Stoodley L, Boyle JD, Lappin-Scott HM, Costerton JW (2001): Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl Environ Microbiol* 67, 5608-5613
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW (2002): Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56, 187-209
- 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
- Strickland S, Retief DH, Russell CM (1990): Shear bond strengths to dentin and fluoride release from fluoride-containing liners. *Am J Dent* 3, 259-263
- Sturr MG, Marquis RE (1990): Inhibition of proton-translocating ATPases of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus casei* by fluoride and aluminum. *Arch Microbiol* 155, 22-27
- Su YY, Shemanski RM (2008): Qualitative and quantitative identification of copper oxides. *Surface and Interface Analysis* 40, 1183-1189
- Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hammerle CH (2009): Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants* 24, 616-626
- Sundh B, Odman P (1997): A study of fixed prosthodontics performed at a university clinic 18 years after insertion. *Int J Prosthodont* 10, 513-519

Svanberg M, Krasse B, Ornerfeldt HO (1990a): Mutans streptococci in interproximal plaque from amalgam and glass ionomer restorations. *Caries Res* 24, 133-136

Svanberg M, Mjor IA, Orstavik D (1990b): Mutans streptococci in plaque from margins of amalgam, composite, and glass-ionomer restorations. *J Dent Res* 69, 861-864

Svatun B, Attramadal A (1978): The effect of stannous fluoride on human plaque acidogenicity in situ (Stephan curve). *Acta Odontol Scand* 36, 211-218

Syafiuddin T, Hisamitsu H, Toko T, Igarashi T, Goto N, Fujishima A, Miyazaki T (1997): In vitro inhibition of caries around a resin composite restoration containing antibacterial filler. *Biomaterials* 18, 1051-1057

Syed M, Chopra R, Sachdev V (2015): Allergic Reactions to Dental Materials-A Systematic Review. *J Clin Diagn Res* 9, ZE04-09

Tabatabaei MH, Arami S, Zandi S, Bassir SH (2011): Evaluation of Bis-GMA/TEGDMA monomers leaching from a hybrid dental composite resin. *Minerva Stomatol* 60, 159-165

Tabuchi K, Oikawa K, Murashita H, Hoshino T, Tsuji S, Hara A (2006): Protective effects of glucocorticoids on ischemia-reperfusion injury of outer hair cells. *Laryngoscope* 116, 627-629

Tadin A, Marovic D, Galic N, Kovacic I, Zeljezic D (2014): Composite-induced toxicity in human gingival and pulp fibroblast cells. *Acta Odontol Scand* 72, 304-311

Takahashi N, Nyvad B (2008): Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process. *Caries Res* 42, 409-418

Takahashi Y, Imazato S, Kaneshiro AV, Ebisu S, Frencken JE, Tay FR (2006): Antibacterial effects and physical properties of glass-ionomer cements containing chlorhexidine for the ART approach. *Dent Mater* 22, 647-652

Tanaka K, Taira M, Shintani H, Wakasa K, Yamaki M (1991): Residual Monomers (Tegdma and Bis-Gma) of a Set Visible-Light-Cured Dental Composite Resin When Immersed in Water. *J Oral Rehabil* 18, 353-362

Tanner J, Carlen A, Soderling E, Vallittu PK (2003): Adsorption of parotid saliva proteins and adhesion of *Streptococcus mutans* ATCC 21752 to dental fiber-reinforced composites. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 66, 391-398

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

Taylor RL, Verran J, Lees GC, Ward AJ (1998): The influence of substratum topography on bacterial adhesion to polymethyl methacrylate. *J Mater Sci Mater Med* 9, 17-22

- Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M (2006): Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res* 17 Suppl 2, 68-81
- Thneibat A, Fontana M, Cochran MA, Gonzalez-Cabezas C, Moore BK, Matis BA, Lund MR (2008): Anticariogenic and antibacterial properties of a copper varnish using an in vitro microbial caries model. *Oper Dent* 33, 142-148
- Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H (2002): Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dental Materials* 18, 318-323
- Thorsteinsson T, Masson M, Kristinsson KG, Hjalmarsdottir MA, Hilmarsson H, Loftsson T (2003): Soft antimicrobial agents: synthesis and activity of labile environmentally friendly long chain quaternary ammonium compounds. *J Med Chem* 46, 4173-4181
- Thurnheer T, Gmur R, Guggenheim B (2004): Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. *J Microbiol Methods* 56, 37-47
- Tinanoff N, Siegrist B, Lang NP (1986): Safety and antibacterial properties of controlled release SnF₂. *J. Oral Rehabil* 13, 73-81
- Tobias RS, Browne RM, Wilson CA (1985): Antibacterial activity of dental restorative materials. *Int Endod J* 18, 161-171
- Tobias RS, Rippin JW, Browne RM, Wilson CA (1988): A further study of the antibacterial properties of dental restorative materials. *Int Endod J* 21, 381-392
- Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, Sasamoto K, Hamamoto T, Suzuki K, Watanabe M (1999): A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal Commun* 36, 47-50
- Trautwein A, Kreibitz U, Oberhausen E: Physik für Mediziner, Biologen, Pharmazeuten. De Gruyter, Berlin 2014
- Tsukatani T, Suenaga H, Higuchi T, Akao T, Ishiyama M, Ezoe K, Matsumoto K (2008): Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts. *J Microbiol Meth* 75, 109-116
- Tucker AS (2010): Salivary gland adaptations: modification of the glands for novel uses *Front. Oral Biol* 14, 21-31
- Turkun LS, Turkun M, Ertugrul F, Ates M, Brugger S (2008): Long-term antibacterial effects and physical properties of a chlorhexidine-containing glass ionomer cement. *J Esthet Restor Dent* 20, 29-44; discussion 45
- Twigg RS (1945): Oxidation-Reduction Aspects of Resazurin. *Nature* 155, 401-402

Tziafas D, Koliniotou-Koumpia E, Tziafa C, Papadimitriou S (2007): Effects of a new antibacterial adhesive on the repair capacity of the pulp-dentine complex in infected teeth. *Int Endod J* 40, 58-66

Ulker AE, Tulunoglu O, Ozmeric N, Can M, Demirtas S (2008): The evaluation of cystatin C, IL-1 beta, and TNF-alpha levels in total saliva and gingival crevicular fluid from 11- to 16-year-old children. *J Periodontol* 79, 854-860

Updegraff DM, Chang RW, Joos RW (1971): Antibacterial activity of dental restorative materials. *J Dent Res* 50, 382-387

Vacca Smith AM, Bowen WH (2000): In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Arch Oral Biol* 45, 277-291

Vaidyanathan M, Sheehy EC, Gilbert SC, Beighton D (2009): Antimicrobial properties of dentine bonding agents determined using in vitro and ex vivo methods. *J Dent* 37, 514-521

Van den Driessche F, Rigole P, Brackman G, Coenye T (2014): Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms. *J Microbiol Methods* 98, 31-34

van der Mei HC, Rustema-Abbing M, de Vries J, Busscher HJ (2008): Bond strengthening in oral bacterial adhesion to salivary conditioning films. *Appl Environ Microbiol* 74, 5511-5515

van der Waal SV, de Almeida J, Krom BP, de Soet JJ, Crielaard W (2016): Diffusion of antimicrobials in multispecies biofilms evaluated in a new biofilm model. *Int Endod J* 50, 367-376

van Houte J (1994): Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res* 73, 672-681

Van Landuyt KL, Nawrot T, Geebelen B, De Munck J, Snauwaert J, Yoshihara K, Scheers H, Godderis L, Hoet P, Van Meerbeek B (2011): How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dent Mater* 27, 723-747

van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, Schraa G, Zehnder AJ (1987): The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl Environ Microbiol* 53, 1893-1897

van Loosdrecht MC, Norde W, Zehnder AJ (1990): Physical chemical description of bacterial adhesion. *J Biomater Appl* 5, 91-106

Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JG, Veerman EC (2004): Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res* 38, 247-253

van Oss CJ (2003): Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions. *J Mol Recognit* 16, 177-190

- Vandijk J, Herkstroter F, Busscher H, Weerkamp A, Jansen H, Arends J (1987): Surface-Free Energy and Bacterial Adhesion - an In vivo Study in Beagle Dogs. *J Clin Periodontol* 14, 300-304
- Vickerman MM, Jones GW (1995): Sucrose-dependent accumulation of oral streptococci and their adhesion-defective mutants on saliva-coated hydroxyapatite. *Oral Microbiol Immunol* 10, 175-182
- Vickerman MM, Clewell DB, Jones GW (1991): Sucrose-promoted accumulation of growing glucosyltransferase variants of *Streptococcus gordonii* on hydroxyapatite surfaces. *Infect Immun* 59, 3523-3530
- Vorburger TV, Rhee HG, Renegar TB, Song JF, Zheng A (2007): Comparison of optical and stylus methods for measurement of surface texture International. *Journal of Advanced Manufacturing Technology* 33, 110-118
- Voß R, Meiners H: Fortschritte in der Zahnärztlichen Prothetik und Werkstoffkunde. Hanser Verlag, München 1989
- Wallman-Bjorklund C, Svanberg M, Emilson CG (1987): *Streptococcus mutans* in plaque from conventional and from non-gamma-2 amalgam restorations. *Scand J Dent Res* 95, 266-269
- Walter R, Duarte WR, Pereira PN, Heymann HO, Swift EJ, Jr., Arnold RR (2007): In vitro inhibition of bacterial growth using different dental adhesive systems. *Oper Dent* 32, 388-393
- Wang Z, Shen Y, Haapasalo M (2014): Dental materials with antibiofilm properties. *Dent Mater* 30, e1-16
- Warnes SL, Caves V, Keevil CW (2012): Mechanism of copper surface toxicity in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* involves immediate membrane depolarization followed by slower rate of DNA destruction which differs from that observed for Gram-positive bacteria. *Environ Microbiol* 14, 1730-1743
- Wataha JC (2000): Biocompatibility of dental casting alloys: A review. *J Prosthet Dent* 83, 223-234
- Wataha JC, Hanks CT, Sun ZL (1994): Effect of Cell-Line on in-Vitro Metal-Ion Cytotoxicity. *Dental Materials* 10, 156-161
- Wataha JC, Lockwood PE, Nelson SK, Bouillaguet S (1999): Long-term cytotoxicity of dental casting alloys International. *J Prosthodont* 12, 242-248
- Weerheijm KL, Kreulen CM, de Soet JJ, Groen HJ, van Amerongen WE (1999): Bacterial counts in carious dentine under restorations: 2-year in vivo effects. *Caries Res* 33, 130-134
- Wessel SW, Chen Y, Maitra A, van den Heuvel ER, Slomp AM, Busscher HJ, van der Mei HC (2014): Adhesion forces and composition of planktonic and adhering oral microbiomes. *J Dent Res* 93, 84-88

- Westall F (2005): Evolution. Life on the early Earth: a sedimentary view. *Science* 308, 366-367
- Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE (1996): Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol* 50, 513-552
- Wicht MJ, Haak R, Lummert D, Noack MJ (2003): Treatment of root caries lesions with chlorhexidine-containing varnishes and dentin sealants. *Am J Dent* 16 Spec No, 25A-30A
- Wicht MJ, Haak R, Schutt-Gerowitt H, Kneist S, Noack MJ (2004): Suppression of caries-related microorganisms in dentine lesions after short-term chlorhexidine or antibiotic treatment. *Caries Res* 38, 436-441
- Wicht MJ, Haak R, Kneist S, Noack MJ (2005): A triclosan-containing compomer reduces *Lactobacillus* spp. predominant in advanced carious lesions. *Dent Mater* 21, 831-836
- Wiegand A, Buchalla W, Attin T (2007): Review on fluoride-releasing restorative materials--fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent Mater* 23, 343-362
- Wilks SA, Michels H, Keevil CW (2005): The survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces. *Int J Food Microbiol* 105, 445-454
- Wilks SA, Michels HT, Keevil CW (2006): Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: implications for cross-contamination. *Int J Food Microbiol* 111, 93-98
- Wilson TG, Jr. (2009): The positive relationship between excess cement and peri-implant disease: a prospective clinical endoscopic study. *J Periodontol* 80, 1388-1392
- Wilson V (2013): An insight into peri-implantitis: a systematic literature review. *Prim Dent J* 2, 69-73
- Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U (2000): Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev* 24, 661-671
- Wimpenny JW (1997): The validity of models. *Adv Dent Res* 11, 150-159
- Windeler AS (1979): Powder enrichment effects on film thickness of zinc phosphate cement. *J Prosthet Dent* 42, 299-303
- Wink M, Klipp E, Liebermeister W, Kowald A, Lehrach H, Herwig R: *Molekulare Biotechnologie - Konzepte, Methoden und Anwendungen*. WileyVCH, Weinheim 2011
- Winkler C, Schafer L, Felthaus O, Allerdings J, Hahnel S, Behr M, Burgers R (2014): The bacterial adhesion on and the cytotoxicity of various dental cements used for implant-supported fixed restorations. *Acta Odontol Scand* 72, 241-250

- Witt JJ, Walters P, Bsoul S, Gibb R, Dunavent J, Putt M (2005): Comparative clinical trial of two antigingivitis mouthrinses. *Am J Dent* 18 Spec No, 15A-17A
- Wobrauschek P (2007): Total reflection x-ray fluorescence analysis - a review. *X-Ray Spectrometry* 36, 289-300
- Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C (2000): Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res* 79, 21-27
- Xia SH, Ben CR, Niu ZY, Kohchi T, Katayama I (1990): Studies on the influence of composite resin filling material (Command Ultra fine) on the dental pulp. *Meikai Daigaku Shigaku Zasshi* 19, 349-355
- Xiao YH, Chen JH, Fang M, Xing XD, Wang H, Wang YJ, Li F (2008): Antibacterial effects of three experimental quaternary ammonium salt (QAS) monomers on bacteria associated with oral infections. *J Oral Sci* 50, 323-327
- Yalcin M, Ahmetoglu F, Sisman R, Bozkurt B, Hakki S (2015): Cytotoxicity of low-shrink composites with new monomer technology on bovine dental pulp-derived cells. *Hum Exp Toxicol* 34, 93-99
- Yamamoto K, Ohashi S, Aono M, Kokubo T, Yamada I, Yamauchi J (1996): Antibacterial activity of silver ions implanted in SiO₂ filler on oral streptococci. *Dent Mater* 12, 227-229
- Yan W, Apweiler R, Balgley BM, Boontheung P, Bundy JL, Cargile BJ, Cole S, Fang X, Gonzalez-Begne M, Griffin TJ, et al. (2009): Systematic comparison of the human saliva and plasma proteomes. *Proteomics Clin Appl* 3, 116-134
- Yang F, Zeng X, Ning K, Liu KL, Lo CC, Wang W, Chen J, Wang D, Huang R, Chang X, et al. (2012): Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. *ISME J* 6, 1-10
- Yang XM, Beyenal H, Harkin G, Lewandowski Z (2000): Quantifying biofilm structure using image analysis. *J Microbiol Meth* 39, 109-119
- Yang Y, Lu Y, Wu QY, Hu HY, Chen YH, Liu WL (2015): Evidence of ATP assay as an appropriate alternative of MTT assay for cytotoxicity of secondary effluents from WWTPs. *Ecotoxicol Environ Saf* 122, 490-496
- Yao Y, Grogan J, Zehnder M, Lendenmann U, Nam B, Wu Z, Costello CE, Oppenheim FG (2001): Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. *Arch Oral Biol* 46, 293-303
- Yao Y, Berg EA, Costello CE, Troxler RF, Oppenheim FG (2003): Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. *J Biol Chem* 278, 5300-5308

- Yasuda Y, Inuyama H, Maeda H, Akamine A, Nor JE, Saito T (2008): Cytotoxicity of one-step dentin-bonding agents toward dental pulp and odontoblast-like cells. *J Oral Rehabil* 35, 940-946
- Yeo IS, Kim HY, Lim KS, Han JS (2012): Implant surface factors and bacterial adhesion: a review of the literature. *Int J Artif Organs* 35, 762-772
- Yli-Urpo H, Narhi T, Soderling E (2003): Antimicrobial effects of glass ionomer cements containing bioactive glass (S53P4) on oral micro-organisms in vitro. *Acta Odontol Scand* 61, 241-246
- Yoshida K, Tanagawa M, Matsumoto S, Yamada T, Atsuta M (1999): Antibacterial activity of resin composites with silver-containing materials. *Eur J Oral Sci* 107, 290-296
- Yoshikawa K, Clark DT, Brailsford SR, Beighton D, Watson TF, Imazato S, Momoi Y (2007): The effect of antibacterial monomer MDPB on the growth of organisms associated with root caries. *Dent Mater J* 26, 388-392
- Yoshinari M, Oda Y, Kato T, Okuda K (2001): Influence of surface modifications to titanium on antibacterial activity in vitro. *Biomaterials* 22, 2043-2048
- Zahradnik RT, Moreno EC, Burke EJ (1976): Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. *J Dent Res* 55, 664-670
- Zaura-Arite E, van Marle J, ten Cate JM (2001): Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res* 80, 1436-1440
- Zhang K, Ou M, Wang W, Ling J (2009): Effects of quorum sensing on cell viability in *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Biochem Biophys Res Commun* 379, 933-938
- Zhang YF, Zheng J, Zheng L, Zhou ZR (2015): Effect of adsorption time on the adhesion strength between salivary pellicle and human tooth enamel. *J Mech Behav Biomed Mater* 42, 257-266
- Zheng S, Chang W, Li C, Lou H (2016): Als1 and Als3 regulate the intracellular uptake of copper ions when *Candida albicans* biofilms are exposed to metallic copper surfaces. *FEMS Yeast Res* 16, fow029
- Zhou Y, Mah TF, Yu YT, Mogridge J, Olson ER, Greenblatt J, Friedman DI (2001): Interactions of an Arg-rich region of transcription elongation protein NusA with NUT RNA: implications for the order of assembly of the lambda N antitermination complex in vivo. *J Mol Biol* 310, 33-49
- Ziats NP, Miller KM, Anderson JM (1988): In vitro and in vivo interactions of cells with biomaterials. *Biomaterials* 9, 5-13
- Zogheib CM, Mokbel N, Naaman NB (2008): Amalgam, composites and compomers: a comparative histologic study of periodontal tissues (Part 2). *Rev Belge Med Dent* (1984) 63, 36-44

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Ralf Bürgers für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit! Der Dank schließt das entgegengebrachte Vertrauen bezüglich der „AG Biofilme und Orales Mikrobiom“ – die aus dieser Arbeit hervorgegangen ist und mit deren Leitung ich in eigenem Labor von ihm betraut wurde – ganz besonders ein. Weiterer großer Dank geht an Herrn Professor Rosentritt, Herrn Dr. rer. nat. Felthaus und Frau Held, die mich für die Dauer meiner Forschungsarbeiten in Regensburg herzlich aufgenommen, geduldig eingewiesen und betreut haben - und jetzt noch mit gutem Rat zur Seite stehen.

Ich danke außerdem Herrn Professor Miosge, Herrn Dr. rer. nat. Haupt und Frau Bernhard für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Laborversuche und Analysen.

Frau ZÄ Witt und Herrn Dr. med. dent. Malinski möchte ich für die engagierte Zusammenarbeit und gegenseitige Motivation danken.

Frau Schulz, M.Sc. danke ich für die Beratung während der statistischen Auswertung.

Herrn Dr. rer. nat. Wassmann und Frau StD´ Wassmann möchte ich abschließend für das kritische und konstruktive Lektorat dieser Arbeit danken – ebenso wie meinem Kollegen Herrn Dr. rer. nat. Cingöz.

Lebenslauf

Am 24.10.1983 wurde ich, Torsten Andreas Wassmann, als erstes Kind von Petra Wassmann, geb. Chalupnik und Dr. rer. nat. Ralf Wassmann in Salzgitter geboren. Von 1990 bis 1994 besuchte ich die Grundschule am Fredenberg in Salzgitter, von 1994 bis 1996 die Orientierungsstufe am Fredenberg und von 1996 bis 2003 das Gymnasium am Fredenberg, wo ich 2003 die allgemeine Hochschulreife erwarb.

Von 2003 bis 2004 absolvierte ich für zehn Monate meinen Zivildienst im Bereich der individuellen Schwerbehindertenbetreuung und der mobilen sozialen Hilfsdienste beim Paritätischen Wohlfahrtsverband in Salzgitter.

Von 2004 bis 2006 studierte ich Biologie und Germanistik für das Höhere Lehramt an der Georg-August-Universität in Göttingen. Ab 2006 studierte ich Zahnmedizin an der Universitätsmedizin Göttingen. Das Studium schloss ich 2011 mit dem Staatsexamen erfolgreich ab.

Seit 2012 bin ich als Zahnarzt in der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik der Universitätsmedizin Göttingen angestellt.

Seit 2016 leite ich die „AG Biofilme und Orales Mikrobiom“ der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik an der Universitätsmedizin Göttingen im Auftrag von Herrn Univ.-Prof. Dr. R. Bürgers.