

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik

(Prof. Dr. med. dent. R. Bürgers)

im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die in vivo antimikrobielle Wirkung von Kupfer in einem zahnärztlichen Zinkoxid-Phosphatzement

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Dr. Felix Malinski

aus

Wilhelmshaven

Göttingen 2016

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent: Prof. Dr. med. dent. R. Bürgers
Ko-Referentin : Prof. Dr. med. dent. A. Wiegand
Drittreferent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. G. Wiese
Datum der mündlichen Prüfung: 09.05.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die in vivo antimikrobielle Wirkung von Kupfer in einem zahnärztlichen Zinkoxid-Phosphatzement" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

Felix Malinski

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Literaturübersicht | 3 |
| 2.1 | Bakterieller Biofilm | 3 |
| 2.2 | Zinkoxid-Phosphatzemente und antimikrobielle Zemente | 10 |
| 2.3 | Antimikrobielle Wirkung von Kupfer | 12 |
| 2.4 | In-vivo- und In-situ-Modelle zur Biofilmbildung | 14 |
| 3 | Material und Methode | 19 |
| 3.1 | Zielsetzung der Arbeit | 19 |
| 3.2 | Studiendesign und klinischer Versuchsablauf | 19 |
| 3.3 | Ethikvotum | 20 |
| 3.4 | Klinische Voruntersuchung der Probanden | 21 |
| 3.4.1 | Anamnesebogen | 21 |
| 3.4.2 | Mundhygienestatus | 21 |
| 3.5 | Prüfzemente | 21 |
| 3.6 | Herstellung der Probekörper | 22 |
| 3.7 | Herstellung der Trägerschiene und Eingliederung | 25 |
| 3.8 | Beurteilung der Plaqueakkumulation | 27 |
| 3.8.1 | Rasterelektronenmikroskopie | 27 |
| 3.8.2 | Energie-Dispersive-Röntgenanalytik (EDX-Spektrum und EDX-Mapping) | 28 |
| 3.8.3 | Digitale Bildbearbeitung und Auswertung | 31 |
| 3.9 | Statistische Auswertung | 32 |
| 4 | Ergebnisse | 33 |
| 4.1 | Probandenkollektiv | 33 |
| 4.2 | Ergebnisse der klinischen Voruntersuchung | 34 |
| 4.3 | Ergebnisse der Plaqueakkumulation auf geteilten und ganzen Probekörpern (quantitativ) | 34 |
| 4.4 | Ergebnisse der Plaqueakkumulation im Gesamtkollektiv (quantitativ) | 38 |
| 4.5 | Ergebnisse der Plaqueakkumulation (qualitativ) | 40 |

| | | |
|----------|---------------------------------------|-----------|
| 4.6 | Ergebnisse der EDX-Analytik | 42 |
| 5 | Diskussion | 47 |
| 5.1 | Diskussion der Methoden | 47 |
| 5.2 | Diskussion der Ergebnisse | 53 |
| 5.3 | Schlussfolgerung | 59 |
| 6 | Zusammenfassung | 60 |
| 7 | Anhang | 62 |
| 7.1 | Abbildungsverzeichnis | 62 |
| 7.2 | Tabellenverzeichnis | 63 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 65 |

1 Einleitung

Im Laufe der Zeit haben Biomaterialien in der Medizin immer mehr an Bedeutung gewonnen und finden heutzutage in fast jeder medizinischen Fachrichtung Anwendung. Bereits 1000 vor Chr. wurde die Verwendung solcher Materialien beschrieben. So wurden beispielsweise Goldfäden als Nahtmaterial zur Versorgung von Wunden oder auch Gold- und Silberkronen als prothetischer Zahnersatz benutzt (Ratner *et al.* 1996).

Auf der National Institutes of Health Consensus Development Conference (1983) wurde der Begriff Biomaterial als *jede vom Arzneimittel zu unterscheidende Substanz oder Kombination von Substanzen natürlichen oder synthetisierten Ursprungs, die für unlimitierte Zeit als Ganzes oder als Teil des menschlichen Körpers verwendet werden kann, um ein Gewebe, ein Organ oder eine Funktion des menschlichen Körpers zu behandeln, zu verbessern oder zu ersetzen*, definiert. Biomaterialien sind also Fremdstoffe, die in direktem Kontakt zum Organismus stehen und dort auf unbestimmte Zeit verweilen. Sie sollten biokompatibel sein und keine toxischen Eigenschaften aufweisen, die eine mögliche Schädigung des Organismus verursachen können.

Ein Hauptproblem bei der Verwendung dieser Biomaterialien ist ein erhöhtes Infektionsrisiko für den Organismus in den umgebenden Geweben. An der Oberfläche der in den Körper eingebrachten Materialien liegen häufig Bedingungen vor, die eine Kolonisation mit Bakterien und anschließender Biofilmbildung begünstigen. Dies hat in vielen Bereichen der Medizin und Zahnmedizin, beispielsweise bei der Implantation künstlicher Gelenkprothesen, koronarer Stents, dentaler Implantate, aber auch zahnärztlicher prothetischer Versorgungen zu erhöhten Komplikationsraten durch Implantinfektionen geführt.

Speziell in der Zahnmedizin führt die Akkumulation von Plaque (dentaler Biofilm) auf der Oberfläche von Biomaterialien (Kronen, Implantaten, Füllungsmaterialien, Befestigungszementen etc.) zur Bildung von Kandidosen, Sekundärkaries und parodontalen bzw. periimplantären Entzündungen und kann somit ihren Langzeiterfolg limitieren. Befestigungszemente für dentale Restaurationen und der Übergang zwischen prothetischer Krone und natürlichem Zahn bieten ideale Voraussetzungen zur Kolonisation und zum Wachstum oraler Bakterien. Denn in diesem Bereich entsteht auch bei sehr präziser Anfertigung des Zahnersatzes eine Diskontinuität der eigentlich glatten Zahnoberfläche. Es bilden sich Schlupfwinkel für Bakterien, die auch durch entsprechende

Mundhygienemaßnahmen nur schwer zugänglich sind. Deshalb wären antiadhäsive oder antimikrobielle Eigenschaften dieser Zemente wünschenswert. Sie könnten das Risiko von Sekundärkaries und parodontalen bzw. periimplantären Entzündungen reduzieren und damit die Lebensdauer zahnärztlicher Restaurationen erhöhen. Einige Hersteller dieser Zemente versuchen deshalb, durch die Beimengung von spezifischen Additiven die antibakteriellen Eigenschaften zu verbessern. Ein bereits kommerziell umgesetzter Ansatz ist es, Kupfer-Ionen in Befestigungszemente zu integrieren. Die antimikrobielle Wirkung von Kupfer-Ionen ist schon lange bekannt und findet in einigen medizinischen Fachrichtungen Anwendung. Der genaue Wirkungsmechanismus ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Das Ziel der vorgelegten Untersuchung war es, ein realistisches In-situ-Modell zur Untersuchung der bakteriellen Adhäsion auf konventionellen und modifizierten Befestigungszementen zu etablieren. An diesem sollte die Biofilmbildung auf Zinkoxid-Phosphatzementen quantitativ und qualitativ evaluiert werden. Des Weiteren sollte die potentielle Ursache für die Wirksamkeit bzw. Unwirksamkeit der Kupferadditive in Zinkoxid-Phosphatzementen überprüft werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Bakterieller Biofilm

Bakterien liegen in der Natur, vereinfacht gesagt, in zwei verschiedenen Formen vor. Einerseits kommen sie frei in Flüssigkeiten „schwimmend“ als nichtadhärente Bakterien in einer sogenannten Planktonphase, zum anderen adhärent auf Oberflächen in Biofilmen organisiert vor. Die letztere ist dabei wesentlich häufiger, so dass man heutzutage davon ausgeht, dass nahezu 99% der weltweit vorkommenden Bakterien in dieser hochkomplexen Form existieren (Costerton *et al.* 1987, Costerton *et al.* 1995).

Bereits im 17. Jahrhundert wurden von dem niederländischen Naturforscher Van Leeuwenhoek erstmals einzelne Bakterien als sogenannte *animalcules* in der eigenen dentalen Plaque beschrieben (Smit und Heniger 1975). Wirklich anerkannt wurde die Existenz von Biofilmen allerdings erst wesentlich später um 1940 (Roberts *et al.* 1999). Heutzutage werden Biofilme definiert als eine mikrobiell entstandene festgewachsene Gemeinschaft, charakterisiert durch Zellen, die irreversibel auf einer Oberfläche, einem Interface oder miteinander verbunden sind (Costerton *et al.* 1999, Stoodley *et al.* 2002, Usha 2009). Sie sind eingebettet in einer Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), die sie selbst synthetisiert haben (Paes Leme *et al.* 2006). Dabei weisen sie einen veränderten Phänotyp in Bezug auf ihre Wachstumsrate und Gentranskription auf (Donlan und Costerton 2002).

Biofilme stellen also ein eigenes Ökosystem dar, das in der Lage ist, auf äußere Einflüsse und Reize zu reagieren, und sich so veränderten Umweltbedingungen anpassen zu können (Liljemark *et al.* 1997). Ermöglicht wird diese Flexibilität und Dynamik durch die Kommunikation der verschiedenen Bakterienspezies innerhalb des Biofilmes (Weimer *et al.* 2011). Diese interbakterielle Kommunikation wird auch als *quorum sensing* bezeichnet (Waters und Bassler 2005). Bakterien können durch das Ausscheiden bestimmter Signalmoleküle ihre von der Zelldichte abhängige Genexpression regulieren (Li und Nair 2012, Miller und Bassler 2001). Genetische Informationen der Mikroorganismen können untereinander kombiniert und geteilt werden (Madsen *et al.* 2012). Dies führt dazu, dass beim einzelnen Mikroorganismus nicht alle Gene aktiviert vorliegen müssen, um vollständig funktionsfähig zu sein (Wolcott *et al.* 2013). Durch das

Aufteilen der gesamten Gene einer Spezies auf viele Mikroorganismen muss das einzelne Bakterium weniger Energie aufwenden, um seinen Anteil am gesamten Genpool aufrechtzuerhalten, während den Bakterien als Gemeinschaft der gesamte Genpool zur Verfügung steht (Hogg *et al.* 2007). Des Weiteren wird durch Kanäle zwischen den Zellnestern eine sogenannte metabolische Kooperation ermöglicht (Lewandowski *et al.* 1992). Nährstoffe können entlang eines pH-Gradienten zwischen den Bakterien ausgetauscht werden und gelangen so auch in tiefere Schichten des Biofilmes (Elias und Banin 2012).

Diese mikromolekularen Mechanismen haben zu einem Umdenken in der Mikrobiologie geführt. Ein Biofilm wird als eine funktionelle Einheit gesehen, die eine zentrale Kontrolle über die einzelnen Mikroorganismen ausübt, um die notwendigen Prozesse und Aktivitäten zum Überleben der gesamten Kolonie aufrechtzuerhalten (Kuramitsu *et al.* 2007). Diese komplexe Organisation als Biofilm bietet den Bakterien Schutz vor zellulären und humoralen Komponenten des Immunsystems (Lam *et al.* 1987) und erhöht deren Resistenz gegenüber toxischen Substanzen wie z.B. Antibiotika und Desinfektionsmitteln (Leid *et al.* 2005, Stewart und Costerton 2001). Diese Mechanismen und Kommunikationsprozesse verdeutlichen die Vorteile der Organisation der Bakterien innerhalb eines Biofilms im Gegensatz zur freien planktonischen Form.

Bisher gibt es in der aktuellen Literatur kein Modell, das bezüglich der bakteriellen Adhäsion an Oberflächen die biochemischen und physiologischen Aspekte vollständig berücksichtigt und beschreibt. Verschiedene Autoren haben versucht, die relevanten und wichtigen Aspekte des Adhäsionsprozesses in einem Modell zusammenzufassen. Demzufolge kann die Entstehung eines Biofilmes in fünf verschiedene Stadien (siehe Abbildung 1) gegliedert werden (Van Loosdrecht *et al.* 1990, Marsh und Bradshaw 1995, Teughels *et al.* 2006) und lässt sich unter anderem auf die Bildung der dentalen Plaque übertragen:

1. Transport der Mikroorganismen zur Materialoberfläche
2. Primäre Adhäsion
3. Sekundäre Adhäsion
4. Kolonisation/Plaquereifung
5. Ablösung von Tochterkolonien

1. Der initiale Transport planktonischer Bakterien zur Oberfläche ist eher als zufällig zu betrachten und kann durch Brown'sche Bewegung, Sedimentation und Strömung in der Flüssigkeit oder aktive Eigenbewegung der Mikroorganismen geschehen (Bos *et al.* 1999, Busscher und Weerkamp 1987, Scheie 1994, Teughels *et al.* 2006).

2. Zunächst lagern sich irreversibel Proteine, Polysaccharide, Enzyme und Immunglobuline an einer Oberfläche an und bilden eine azelluläre Membran, die auch *conditio-*

ning film oder Pellikel genannt wird (Hannig 1997). Diese nahezu bakterienfreie Schicht ist für die spätere Adhäsion der Bakterien an der Oberfläche von entscheidender Bedeutung, da erst durch ihre adhäsionsvermittelnden Wechselwirkungen eine Bindung zwischen Bakterium und Oberfläche möglich ist (Hannig und Hannig 2007, Lendemann *et al.* 2000). Eine wichtige Rolle spielen dabei unter anderem die Oberflächenladung und das Nährstoffangebot im umgebenden Milieu (Wimpenny und Colasanti 1997). Nach Bildung des *conditioning film* kommt es zwischen Oberfläche und Bakterium zu physikalisch-chemischen Interaktionen, die zu einer schwachen und reversiblen Bindung führen (Busscher und van der Mei 1997, Marsh und Bradshaw 1995). Obwohl die Bakterien und sauren Proteine des *conditioning film* eine negative Ladung aufweisen (Marsh und Martin 2003), kann es durch thermodynamisch günstige Verhältnisse und das Zusammenwirken von anziehenden (van der Waals-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen), abstoßenden (elektrostatische Wechselwirkungen) oder beiden Kräften (Säure-Base-Wechselwirkungen) zu einer insgesamt schwachen Nettoanziehung kommen, die eine Adhäsion ermöglicht (Teughels *et al.* 2006).

3. Bei der sekundären Adhäsion kommt es zur Ausbildung einer extrazellulären polymeren Matrix, die für den interbakteriellen Zusammenhalt und die weitere Reifung des Biofilms von großer Bedeutung ist (Flemming *et al.* 2007). Diese extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) werden von den Bakterien selbst produziert und bestehen hauptsächlich aus Wasser, Polysacchariden, Glykoproteinen, Lipiden sowie Nukleinsäuren (Ahn *et al.* 2007). Sie füllen den Raum zwischen den Bakterien aus und verbessern die Stabilität und Funktionalität des Biofilms (Romani *et al.* 2008). Die Bakterien besitzen zudem auf ihrer Oberfläche sogenannte Adhäsine (spezielle extrazelluläre Proteinkomponenten), die mit komplementären Rezeptoren (Glykoproteine und Polysaccharide) innerhalb des *conditioning film* eine irreversible Anheftung ermöglicht (Sanderink *et al.* 2004).

4. Nachdem eine feste und irreversible Bindung zwischen Bakterien und Oberfläche vorliegt, kommt es zur Reifung des Biofilms. Einerseits vermehren sich die im Biofilm enthaltenen Bakterien mittels Zellteilung und bilden Mikrokolonien aus, zum anderen kommt es durch die Koadhäsions- und Koaggregationsprozesse zum Anlagern weiterer Bakterien (Kolenbrander *et al.* 1993). Unter Koadhäsion und Koaggregation versteht man im Allgemeinen die interbakterielle Haftung von Bakterien an mikrobiellen Oberflächen. Sanderink *et al.* (2004) definierten diese Begriffe genauer, so dass die Koadhäsion das Erkennen und Haften von genetisch identischen Bakterienspezies beschreibe, während sich die Koaggregation auf genetisch unterschiedliche Bakterienarten beziehe. Damit die Bakterien nicht nur an die zu besiedelnde Oberfläche oder die gleiche Zellspezies binden können, exprimieren sie neben den eigenen Adhäsinen auch Rezeptoren für die Bindung anderer Bakterienadhäsine (Marsh und Martin 2003).

Bei der Besiedlung und Ausreifung des oralen Biofilms hat sich gezeigt, dass bestimmte Bakterien vornehmlich in der initialen Phase auftreten und andere erst später den Biofilm besiedeln (Kolenbrander und London 1993). Die Frühkolonisierer, zu denen im oralen Biofilm hauptsächlich Streptokokken gehören, binden vor allem an die speziellen Rezeptoren (z.B. Muzine, Statherine und Agglutinine) des *conditioning film* (Kolenbrander *et al.* 2002). Im Verlauf können sich dann weitere unterschiedliche frühkolonisierende Bakterien untereinander binden. Spätkolonisierenden Bakterien ist dies jedoch nicht möglich, weshalb dem *Fusobacterium nucleatum* diesbezüglich eine besondere Rolle zukommt (Kolenbrander *et al.* 2002, Rickard *et al.* 2003). Dieses Bakterium, das zu den häufigsten gramnegativen oralen Keimen gehört (Moore und Moore 1994), fungiert als Brücke zwischen den Früh- und Spätkolonisierern und kann mit beiden Bakteriengruppen koaggregieren (Kolenbrander *et al.* 2002). Die Spätkolonisierer binden vor allem an diese Bakterien, jedoch kaum untereinander (Yao *et al.* 2003).

5. Schließlich kommt es nach dem Ausreifen des Biofilms zum Loslösen von Bakterien, die zu freien Siedlungsflächen gelangen und so eine Ausbreitung des Biofilms ermöglichen (Costerton *et al.* 1999). Dabei können einzelne Bakterien durch Erosion sowie größere Bakterienkonglomerate durch Abschilferung losgelöst werden (Stoodley *et al.* 2001). Dieser Prozess des Ausbildens von Tochterverbänden unterliegt biophysikalischen, genetischen und kommunikativen Regulationsmechanismen (Li *et al.* 2001).

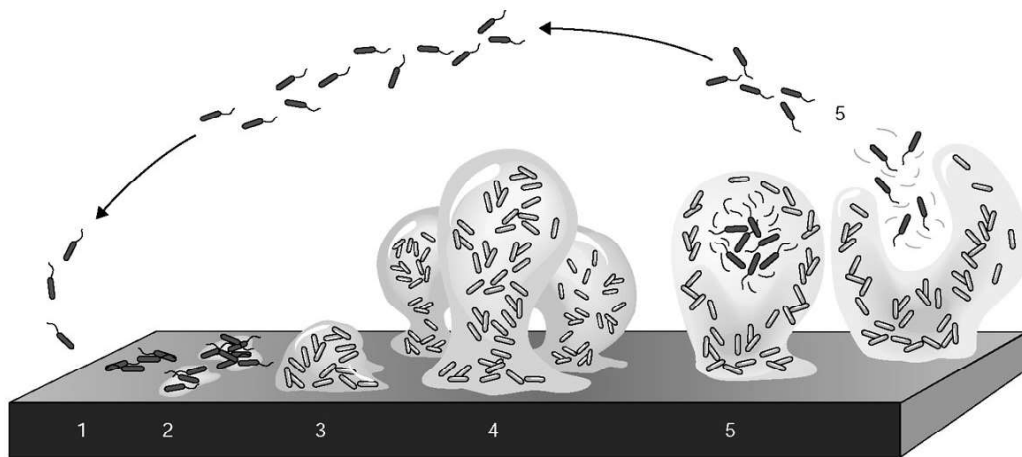


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Biofilmbildung in fünf Stadien (Sauer 2003 S.2)

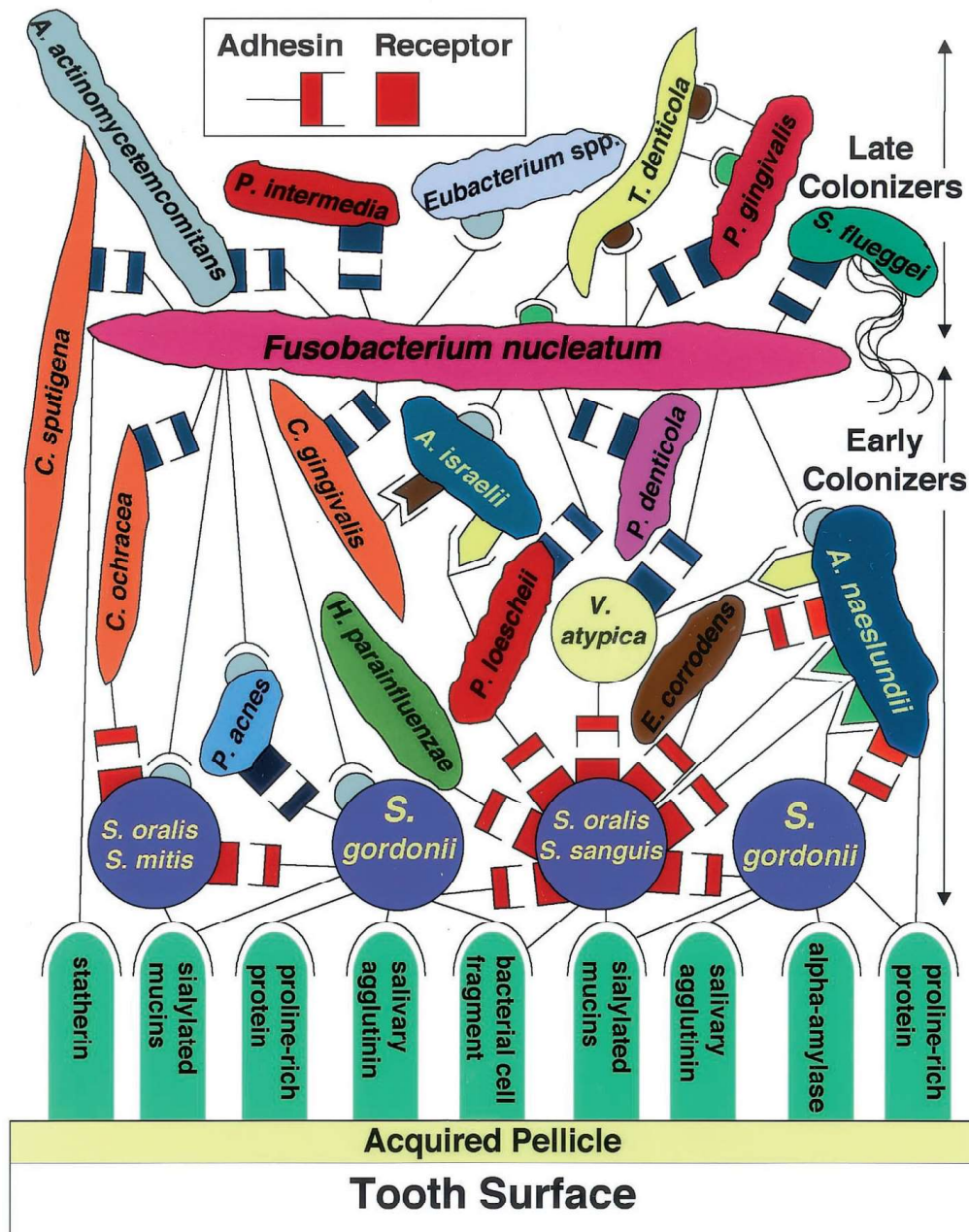


Abbildung 2: Raum-Zeit-Modell der oralen bakteriellen Kolonisation nach Kolenbrander *et al.* (2002) S.488

In der Literatur gibt es zahlreiche Studien, die speziell die Biofilmbildung und bakterielle Adhäsion auf dentalen Befestigungszementen untersucht haben. Daugela *et al.* (2008) überprüften in einer In-vitro-Studie die antimikrobielle Wirkung sieben verschiedener Befestigungszemente. Unter den getesteten Zementen befand sich auch der Zinkoxid-Phosphatzement dieser Studie (Hoffmanns Cement normalhärtend, Hoffmann Dental Manufaktur GmbH, Berlin, Deutschland). Anhand eines Agar-Diffusionstests wurde die antibakterielle Wirkung vor allem in Bezug auf das Wachstum des Bakteriums *Streptococcus mutans* evaluiert. Direkt nach dem Anmischen zeigte vor allem der Zinkoxid-Phosphatzement eine starke antibakterielle Wirkung, vergleichbar mit der

von Penicillin. Nach dem Aushärten ließ diese Wirkung jedoch stark nach. Die starke antibakterielle Aktivität direkt nach dem Anmischen des Zements wurde durch das stark saure Milieu (pH-Wert < 2) begründet. Das Nachlassen dieser Wirkung nach dem Aushärten hingegen wurde durch den deutlichen pH-Anstieg ($> 5,4$) sowie die geringere Diffusionskapazität der antibakteriellen Stoffe erklärt.

Winkler et al. (2014) untersuchten in einer In-vitro-Studie die bakterielle Adhäsion und Zytotoxizität acht verschiedener Befestigungszemente (Harvard (Harvard, Berlin, Deutschland), Ketac cem (3M ESPE, Seefeld, Deutschland), TempBond, (Kerr, West Collins, USA), TempBond NE (Kerr, West Collins, USA), Aqualox Carboxylate (VO-CO, Cuxhaven, Deutschland), Panavia F 2.0 (Kuraray, Osaka, Japan), Rely X Unicem (3M ESPE, Neuss, Deutschland) und Implantlink (DETAX, Ettlingen, Deutschland)) und prüften deren Eignung zur Befestigung implantatgetragener prothetischer Restaurationen. Neben der freien Oberflächenenergie und -rauheit wurden die bakteriellen adhäsiven Eigenschaften mittels Fluoreszenzmikroskopie und Zytotoxizität durch einen WST-1-Test überprüft. Dafür wurden Probekörper aus den acht verschiedenen Testzementen entsprechend der Herstellerangaben sowie ein Referenzprobekörper aus reinem Titan hergestellt. Zur Beurteilung der initialen Biofilmbildung und bakteriellen Adhäsion wurden die Probekörper mit zwei bakterielle Suspensionen (*Staphylococcus epidermidis* und *Streptococcus sanguinis*) beschickt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zytotoxizität der verschiedenen Testzemente wurde mittels dentaler Follikelzellen und eines WST-1-Test untersucht. Bezüglich der Oberflächenrauheit und freien Oberflächenenergie konnten zwischen den acht verschiedenen Testzementen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Ergebnisse der bakteriellen Adhäsion und Biofilmbildung zeigten bei zwei Testzementen (TempBond und TempBond NE) eine signifikant niedrige Bakterienzahl sowohl für *Streptococcus sanguinis* als auch *Staphylococcus epidermidis*. Die höchste Zytotoxizität wurde für Harvard, TempBond, Temp Bond NE und Aqualox festgestellt. Zusammenfassend konnte keiner der untersuchten Testzemente - aus mikrobiologischer Sicht - zur Befestigung implantatgetragener prothetischer Restaurationen uneingeschränkt empfohlen werden. Zwar zeigten einige Testzemente (TempBond und TempBond NE) nur geringe Tendenzen zur bakteriellen Adhäsion und Biofilmbildung, dennoch wurde ihre gleichzeitig hohe Zytotoxizität als kritisch betrachtet. Korsch et al. (2014) untersuchten ebenfalls in einer klinischen Studie die Biofilmbildung und das bakterielle Wachstum auf Zementen zur Befestigung von Implantataufbauten. Bei zehn Patienten mit periimplantären Beschwerden wurde überschüssiger Zement, der im periimplantären Sulkus zu finden war, auf die bakterielle In-situ-Kolonisation mittels 16S rDNA-Sequenzierung untersucht. Es sollte die Neigung zur Biofilmbildung auf den Zementoberflächen evaluiert werden. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Tendenz zur bakteriellen Besiedlung bei methacrylathaltigen Zementen. Lewinstein et al. (2005) untersuchten in einer weiteren In-vitro-Studie drei dentale

Befestigungszemente in Bezug auf ihre antibakteriellen Eigenschaften. Dafür wurden die Bohrlöcher von Mikrotiterplatten mit den entsprechenden Testzementen (Harvard Cement, Duralon und Ketac Cem) beschichtet und anschließend mit einer *Streptococcus mutans* Suspension inkubiert. Im Anschluss wurden anhand eines Direkt-Kontakt- und Agar-Diffusions-Tests das bakterielle Wachstum und die antibakterielle Aktivität bestimmt. Die Untersuchungen zeigten für Duralon und Harvard Cement eine gewisse antibakterielle Aktivität, die für Ketac-Cem hingegen nicht nachgewiesen werden konnte. In einer Studie von Raval *et al.* (2014) sollte das Wachstum von Periimplantitis-assoziierten Keimen auf Befestigungszementen für Implantat-getragene Restaurationen bestimmt werden. Dafür wurde jeder Prüfkörper der fünf Testzemente (Zinkoxid-Eugenol, Zinkoxid-Eugenolfrei, Zinkoxid-Phosphat sowie zwei Glasionomorzemente) in eine Suspension mit jeweils einem bestimmten oralen Keim (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* und *Porphyromonas gingivalis*) getaucht. Anschließend wurde die optische Dichte der Suspensionen gemessen, um so Rückschlüsse auf das planktonische Wachstum der Bakterien ziehen zu können. Die Ergebnisse zeigten ein signifikant gehemmtes Wachstum der Keime *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* bei den drei zinkoxidhaltigen sowie einem der Glasionomorzemente. Im Gegensatz dazu konnte beim methacrylathaltigen Glasionomorzement für alle getesteten Keime keine Wachstumshemmung festgestellt werden. Zusammenfassend zeigten die untersuchten Zemente einen unterschiedlich starken Einfluss auf das bakterielle Wachstum, wobei die stärkste Hemmung bei Zinkoxid-Eugenol- und Zinkoxid-Phosphatzementen festgestellt wurde. Papavasileiou (2013) untersuchte in einer In-vivo-Studie die subgingivale Biofilmbildung auf vier verschiedenen zahnärztlichen Befestigungszementen (Zinkoxid-Eugenol, Zinkoxid-Phosphat sowie ein selbstadhäsiver und ein dualhärtender Composit-Zement). An der Untersuchung nahmen insgesamt 17 Probanden mit bereits osseointegrierten und freigelegten dentalen Implantaten teil. Diese wurden mit zwei oder mehr Test-Gingivaformern, die mittels einer Bohrung für die Applikation der Prüfzemente modifiziert worden waren, versorgt. Nach einer durchschnittlichen Tragedauer von 9,7 Tagen wurde die Biofilmmakkumulation auf den insgesamt 116 Zementproben mittels rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen im Übergangsbereich zwischen Zement und Titan untersucht. Alle untersuchten Zementproben waren im Mittel über 80% mit Biofilm bedeckt. Keiner der untersuchten Zemente zeigte eine signifikant niedrigere Biofilmmakkumulation. Die Biofilmbesiedelung auf der Titanoberfläche des Gingivaformers zeigte hingegen im Mittel eine signifikant niedrigere Biofilmbedeckung (ca. 50%). Zusammenfassend wurde für die untersuchten Testzemente und deren Oberflächen ein begünstigender Einfluss auf eine vermehrte periimplantäre bakterielle Biofilmbildung festgestellt.

2.2 Zinkoxid-Phosphatzemente und antimikrobielle Zemente

Die zwei Prüfzemente der vorliegenden Untersuchung sind Befestigungszementente. Diese Dentalzemente dienen der Verankerung von indirekt hergestellten Restaurationen (z.B. Einlagefüllungen, Teilkronen, Kronen und Brücken) sowie als Unterfüllungsmaterial und temporärer Füllungswerkstoff (Voß und Meiners 1989). Zudem sollen sie den Randspalt zwischen einer prothetischen Restauration und dem Zahnstumpf auffüllen und damit ein Eindringen von Bakterien aus der Mundhöhle verhindern (Buchmann *et al.* 1992). Neben dem Zinkoxid-Phosphatzement werden auch Silikatzement, Steinzement, Zinkoxid-Eugenolzement, Ethoxybenzoesäurezement, Carboxylatzement und Glasionomerezement den Befestigungszementen zugeordnet (Hellwig *et al.* 2007). Eine Übersicht über die Einteilung der Dentalzemente und Zusammensetzung ihrer Hauptbestandteile wird in Abbildung 3 gezeigt.

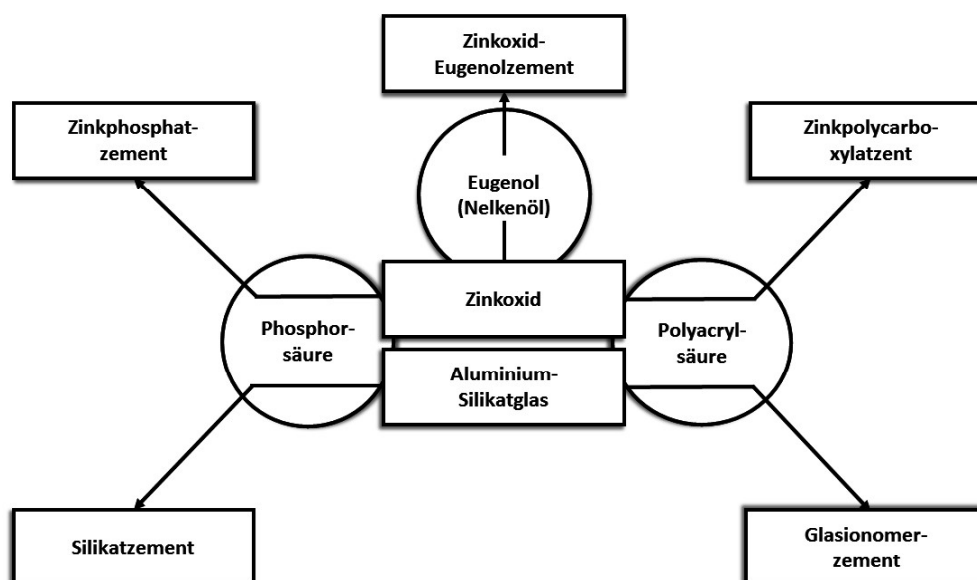
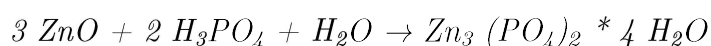


Abbildung 3: Einteilung der Dentalzemente in ihre Hauptbestandteile (Pawlig 2001 S.5)

Anders als bei Befestigungskunststoffen, die durch eine Polymerisation im hydrophoben Milieu aushärten, kommt es bei Befestigungszementen zu einer Säure-Base-Reaktion in wässriger Umgebung (Breustedt 1964). Auch die Verankerungs- und Hafteigenschaften der Zemente unterscheiden sich grundlegend von denen der Befestigungskunststoffe. Die Retentionswirkung der Zemente beruht auf einer Verkeilung von Krone und Zahnstumpf durch die einzelnen Zementkörner (Tuntiprawon 1997). Der Zement selbst hat im Gegensatz zu den Kunststoffen eine nur sehr geringe Klebkraft. Erst durch ei-

ne gewisse Rauheit der zu verbindenden Oberflächen wird eine Parallelverschiebung gegeneinander verhindert (Öilo 1978, Rosales *et al.* 1999).

Zinkoxid-Phosphatzemente sind selbsthärtende Zemente, die aus einem festen Pulver- und flüssigen Säureanteil bestehen. Das Pulver besteht bis zu 90 % aus Zinkoxid (ZnO). Zur Verbesserung der Materialeigenschaften, insbesondere der Festigkeit und Mundbeständigkeit, werden je nach Hersteller weitere Zusätze (MgO, SiO₂, CaF₂) hinzugefügt (Breustedt 1964). Die Flüssigkeit ist eine ca. 35 % wässrige Lösung der Phosphorsäure (H₃PO₄) (Marxkors und Meiners 2005). Die exotherme Säure-Base-Reaktion verläuft über mehrere Stufen, so dass der Endzustand das tertiäre Phosphat (Zn₃ (PO₄)₂ * 4 H₂O) erst nach 7 Tagen in kleineren Mengen vorliegt (Kappert *et al.* 2008). Summarisch bis zum Endzustand der Matrix lässt sich die Reaktionsgleichung wie folgt darstellen (Komrska und Satava 1970):



Die Materialeigenschaften des Zinkoxid-Phosphatzements sind wesentlich von der Verarbeitung abhängig (Welker 1970). Entscheidend ist dabei das Pulver-Flüssigkeit-Verhältnis, das die Konsistenz, Abbindezeit biologische Verträglichkeit und mechanische Festigkeit bestimmt. Die Festigkeit und Mundbeständigkeit können durch Erhöhung des Pulveranteils verbessert werden (Windeler 1979). Dennoch weisen sie im Vergleich zu anderen dentalen Zementen eine hohe Löslichkeit im oralen Milieu auf (Rosenstiel 1998). Dies ist hauptsächlich auf die Säuren in Nahrung und Plaque, jedoch nicht den Speichel zurückzuführen (Dupuis *et al.* 1992, Murakami *et al.* 1990). Diese Tatsache ist auch Grund dafür, dass Zinkoxid-Phosphatzemente gegenwärtig als definitive Füllungsmaterialien keine Anwendung finden.

Bezüglich der Biokompatibilität wurden zahlreiche Studien durchgeführt. Grund und Raab (1990) untersuchten den Einfluss verschiedener Befestigungszemente auf die Mikrozirkulation der Pulpa, mittels Laser-Doppler Flowmetry. Dieses Verfahren wird zur Untersuchung der Histokompatibilität eingesetzt. Zinkoxid-Phosphatzemente zeigten hier nur einen sehr geringer Einfluss auf die Mikrozirkulation der Pulpa. Dennoch ist das Auftreten von Pulpairritationen und Hypersensibilitäten am vitalen Zahn durch die saure Abbindereaktion (pH =3,5) beim Aushärten des Zements bekannt (Pameijer 2012). Diese chemische Reizung der Pulpa wurde in mehreren Studien nachgewiesen (Hiraishi *et al.* 2003, Smith und Ruse 1986, Sonoda *et al.* 2001). Dennoch wird in der Literatur eine gute Biokompatibilität der Zinkoxid-Phosphatzemente beschrieben. Dies wird durch die lange und erfolgreiche klinische Anwendung seit über 100 Jahren bestätigt (Gorodovsky und Zidan 1992).

Neben der Biokompatibilität sind auch die antimikrobiellen Eigenschaften von Dentalzementen wichtig, da der Randspalt zwischen Krone und Zahnstumpf mikrobiell

besiedelt werden kann und eine mikroökologische Nische darstellt (Buchmann *et al.* 1992). Deshalb wurde in verschiedenen Studien die antimikrobielle Wirkung der Dentalzemente überprüft und außerdem versucht, durch Beimengung von Additiven diese Eigenschaften zu verbessern. Prabhakar *et al.* (2013) testen in einer klinischen Studie die Wirkung von Antibiotikaadditiven (Ciprofloxacin und Metronidazol) sowie die Flouridfreisetzung in Glasionomorzementen. In der Testgruppe wurde eine deutliche antibakterielle Wirkung mit gleichzeitig erhöhter Flouridfreisetzung im Vergleich zu Kontrollgruppe festgestellt. In einer Studie von Moreira *et al.* (2014) wurde die antimikrobielle Wirkung von Nanosilber in Zementen zur Befestigung kieferorthopädischer Apparaturen untersucht. Auch hier zeigte sich eine signifikant bessere antibakterielle Wirkung der Testgruppe bei gleichzeitig guter Biokompatibilität und guten mechanischen Eigenschaften im Vergleich zur Kontrollgruppe.

2.3 Antimikrobielle Wirkung von Kupfer

Medizingeschichtlich betrachtet ist die bakterizide Wirkung von Kupfer schon sehr lange bekannt. Der älteste dokumentierte medizinische Gebrauch geht auf die Zeit zwischen 2600 bis 2200 v. Chr. zurück. Im Papyrus Edwin Smith, der zu den ältesten schriftlichen Dokumenten medizinischer Heilverfahren gehört, wurde bereits die Desinfektion von Wunden und Trinkwasser mittels Kupfer beschrieben (Grass *et al.* 2011). Ein erster Nachweis der bakteriziden Wirkung gelang dem Schweizer Botaniker Carl Nägeli im Jahre 1893. Mit dem oligodynamischen Effekt beschrieb er die schädigende Wirkung von in Lösung gegangenen Metall-Kationen auf lebende Zellen (Nägeli 1893).

In der aktuellen Literatur gibt es zahlreiche Studien, die die antibakterielle und antivirale Wirksamkeit von Kupfer belegen. Vor allem Oberflächen aus Kupfer zeigten - im Vergleich zu anderen Materialien - eine Reduktion der bakteriellen Besiedlung um bis zu 90% (Bleichert *et al.* 2014, Salgado *et al.* 2013, Schmidt *et al.* 2013). In Krankenhäusern, aber auch anderen Einrichtungen des Gesundheitswesens wurde versucht, diese Eigenschaften zur Eindämmung nosokomialer Infektionen zu nutzen. In verschiedenen Fallstudien konnte durch die Ausstattung der Türgriffe, Lichtschalter und Armaturen in Bädern mit speziellen Kupferlegierungen eine deutliche Reduktion der Keim-Zahl auf diesen Oberflächen erreicht werden (Casey *et al.* 2010, Schmidt *et al.* 2012). Es wurde festgestellt, dass die Verwendung kupferhaltiger Materialien die Krankenhaushygiene verbessern und die bakterielle Keimlast senken kann (O’Gorman und Humphreys 2012). Auch die antimikrobielle Wirkung von Kupfer-Ionen war Gegenstand vieler Studien. Es konnte sowohl bei In-vivo- (Foley und Blackwell 2003a) als auch bei In-vitro-Studien (Duguid 1983, Morrier *et al.* 1998) eine bakterizide Wirkung von Kupfer-Ionen nachgewiesen werden. Drake *et al.* (1993) beschrieben zudem *in vitro*

einen synergistischen hemmenden Effekt von Chlorhexidin und Kupfer-Ionen auf das Wachstum von *Streptococcus mutans* und *Actinomyces naeslundii*.

Gosau *et al.* (2013) untersuchten in einer In-vitro-Studie den antibakteriellen Effekt von Kupferbeschichtungen auf Silikonimplantaten. Dafür wurden konventionelle (Cu0) sowie kupferbeschichtete Silikonproben mit unterschiedlichen Kupferkonzentrationen (Cu1 und Cu2) künstlich gealtert und mit einer *Staphylococcus epidermidis*-Suspension inkubiert. Anschließend wurden die Oberflächeneigenschaften der Implantate sowie die Anzahl der toten und vitalen adhärenen Bakterien mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Bezüglich der Oberflächenrauheit und freien Oberflächenenergie zeigten sich in der Kontroll- und den Testgruppen (Cu1 und Cu2) keine signifikanten Unterschiede. Das Altern der Proben hatte keinen Einfluss auf die Oberflächeneigenschaften und bakterielle Adhäsion. Jedoch war die Anzahl der noch vitalen Bakterien in der Kontrollgruppe mit herkömmlichem Silikonmaterial (Cu0) signifikant höher als in den Testgruppen (Cu1 und Cu2). Es konnte zusammenfassend eine anti-adhärenente und bakterizide Wirkung von Kupferadditiven auf Silikonimplantaten beobachtet werden. In einer Studie von Foley und Blackwell (2003b) wurde der Einfluss von Black Copper Cement (einem kupferhaltigem Glasionomermaterial), konventionellem Glasionomermaterial sowie einem Zinkoxidphosphat- und Polycarboxylatzements auf das In-vitro-Wachstum von *Streptococcus mutans* sowie die Freisetzung von Ionen aus den jeweiligen Prüfzementen verglichen. Alle Prüfzemente zeigten initial den größten hemmenden Einfluss auf das bakterielle Wachstum, der jedoch mit der Zeit deutlich nachließ. Insgesamt konnte für den Black Copper Cement die größte antibakterielle Aktivität gemessen werden. Beeton *et al.* 2014 überprüften in einer Studie die antimikrobielle Aktivität verschiedener Metallkomplexe $[M(IL)(AL)](2+)$ (IL steht für 1, 10-phenanthrolin und AL für 1S, 2S- oder 1R, 2R-diaminocyclohexan) sowie $[Cu(IL)_3](2+)$. Die antimikrobielle Aktivität wurde an verschiedenen Bakterienstämmen (u.a. auch Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*) untersucht. Die getesteten Kupferkomplexe zeigten eine signifikant erhöhte Aktivität gegenüber der Biofilmbildung und waren zudem effektiver in der Biofilmbeseitigung als das ebenfalls getestete Antibiotikum Vancomycin. In einer weiteren Studie von Agarwala *et al.* (2014) wurde auch die antimikrobielle Wirkung von Nanopartikeln der Metalloxide Fe_2O_3 und CuO gegenüber multiresistenten Biofilmbildenden Bakterien untersucht. Für die CuO Nanopartikel konnte die stärkste antibakterielle Aktivität gemessen werden. Diese war auch deutlich größer im Vergleich zu den ebenfalls getesteten Eisenoxiden.

Trotz dieser eindeutigen Studienergebnisse konnte bis heute der genaue Wirkungsmechanismus des Kupfers nicht ausreichend geklärt werden und ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschungen. Ein vermuteter Wirkungsmechanismus wurde von Rosalen *et al.* (1996a) sowie Wunder und Bowen (1999) beschrieben, bei dem eine Abnah-

me der Saccharose-abhängigen bakteriellen Adhäsion durch Hemmung der bakteriellen Glykosyltransferase-Enzymaktivität festgestellt werden konnte. In einer weiteren Studie von Rosalen *et al.* (1996b) wurde angenommen, dass Kupfer das bakterielle Wachstum limitiere und die glykolytische Sequenz durch Oxidation von Thiolgruppen verschiedener Enzyme hemme. Dies führe schließlich zu einer verminderten Säureproduktion der Bakterien. Weiterhin wurde vermutet, dass Kupfer-Ionen wichtige metabolische Reaktionen oraler Bakterien hemmen würden, beispielsweise durch die Umwandlung von Harnstoff in Ammoniak (Oppermann *et al.* 1980). Fasst man die Ergebnisse zusammen, so geht man nach derzeitigem Kenntnisstand von drei verschiedenen Angriffspunkten des Kupfers an der prokaryonten Zelle aus (Warnes *et al.* 2012):

1. Perforation der Zellmembran
2. Schädigung/Abbau der DNA
3. Inaktivierung von Proteinen.

In welcher Reihenfolge diese Mechanismen zeitlich verlaufen und welcher von ihnen der entscheidende ist, wird weiterhin in der Literatur diskutiert. Man nimmt jedoch an, dass der Verlauf vom jeweiligen Mikroorganismus abhängig ist und daher unterschiedlich verlaufen kann (Warnes *et al.* 2012).

2.4 In-vivo- und In-situ-Modelle zur Biofilmbildung

In-vivo-Untersuchungsmethoden zur Biofilmbildung werden am lebendigen Organismus vollzogen. Diese Tatsache schränkt die Untersuchungsmöglichkeiten ein, da für den Menschen potentiell schädliche Substanzen, wie z.B. antibakterielle Stoffe wie Silber und Kupfer oder auch radioaktive Marker nur eingeschränkt bzw. überhaupt nicht verwendet werden können. Bevor In-vivo-Untersuchungen durchgeführt werden können, müssen gesundheitliche Risiken und eine mögliche Schädigung der Probanden ausgeschlossen werden. Eine weitere Herausforderung bei dieser Art der Untersuchung stellen die unterschiedlichen individuellen Gegebenheiten dar, die jeder Proband *per se* mit sich bringt. Das bedeutet, dass die mikrobielle Flora abhängig vom Alter, Geschlecht und allgemeinen Gesundheitszustand innerhalb eines Probandenkollektives deutlich variieren kann (Hall-Stoodley und Stoodley 2002). Auch die Mundhygienemaßnahmen und die Compliance können innerhalb eines Kollektivs Unterschiede aufweisen. Diese verschiedenen Einflüsse führen dazu, dass die Biofilmbildung jedes Individuums sehr unterschiedlich sein kann (Sissons 1997). Die daraus resultierenden Ergebnisse können zu verfälschten Aussagen führen.

Vor allem der Nachweis von Erregern in Biofilmen erfordert eine möglichst genaue und kontaminationsfreie Entnahme. Da Biofilme eine sehr dünne und fragile Struktur auf-

weisen, stellt sich dies bei der einer In-vivo-Untersuchung als schwierig dar (Robinson *et al.* 1997). Der zu untersuchende Biofilm kann bei der Entnahme z.B. beim Ablösen von der Zahnoberfläche, leicht beschädigt werden (Sandig *et al.* 1988). Deshalb haben verschiedene Autoren Methoden zur Gewinnung von Biofilmen entwickelt. Man unterscheidet diesbezüglich zwischen In-vivo- und In-vitro-Modellen, die je nach Indikation und Fragestellung unterschiedlich eingesetzt werden können (Wimpenny 1997). In der Vergangenheit wurden in der medizinischen Mikrobiologie vornehmlich In-vitro-Untersuchungen durchgeführt, um so isoliert Mikroorganismen anzuzüchten und diese in Hinblick auf ihre Pathogenität und mikrobiologischen Eigenschaften zu untersuchen. Die heutigen Erkenntnisse über die Organisation von Mikroorganismen in Biofilmen und deren komplexe Kommunikationswege haben allerdings zu einem Umdenken geführt, so dass die Bedeutung der In-vivo-Modelle zugenommen hat (Sissons 1997).

Eine einfache Methode zur Biofilmentnahme wurde bereits von Mc Dougall *et al.* (1963) durch die Plaque Gewinnung an extrahierten Zähnen beschrieben. Da diese Methode jedoch nur sehr eingeschränkt anwendbar ist, wurden von verschiedenen Autoren Trägersysteme entwickelt (sogenannte In-situ-Modelle), die eine intakte Entnahme der intraoral gebildeten Biofilme ermöglichten. Theilade (1964) verwendete beispielsweise MYLAR-Folien als Trägersystem, die intraoral auf den Zähnen befestigt wurden. Eine ähnliche Methode wurde von Brex *et al.* (1981) entwickelt, bei der mittels eines Plast-Sprays ein dünner Film auf der Zahnoberfläche aufgesprüht wurde. Dieser konnte nach Biofilmmakkumulation unversehrt entnommen werden. Eine andere Möglichkeit zur Gewinnung und Entnahme von in situ gebildeten Biofilmen wurden von Macpherson *et al.* (1990) beschrieben. In diesem Zusammenhang erwiesen sich Glas und bovine Schmelzplättchen als intraorale Anlagefläche für Biofilme als sehr geeignet. Diese konnten sowohl auf Teilprothesen (Zaura-Arite und ten Cate 2000) als auch auf Kunststoffschienen (Auschill *et al.* 2001) befestigt und später problemlos wieder entnommen werden. Ein ähnlicher Ansatz zur Gewinnung von Biofilmen wurde von Liljemark *et al.* (1993), Meyerowitz *et al.* (1991) und Wood *et al.* (2000) durch die Verwendung eines Bracket-Systems, das auf den bukkalen Zahnflächen adhäsiv befestigt wurde, beschrieben. Baier und Glantz (1978) benutzen zur Gewinnung von In-vivo-Biofilmen herausnehmbare Kunststoffschienen, die an die Ober- und Unterkieferzahnreihen der Probanden angepasst wurden. Die Schienen wurden zur Aufnahme der Biofilmprouben erweitert. Abgesehen von der vollständigen intakten Entnahme eines *in situ* gebildeten Biofilms besteht auch die Möglichkeit natürlich gewonnenes Zellmaterial zu kultivieren (Pratten *et al.* 1998, Wimpenny 1997). Walker und Sedlacek (2007) veröffentlichten diesbezüglich ein In-vivo-Modell, bei der Biofilme von der Zahnoberfläche mechanisch entfernt wurden. Durch die mechanische Entfernung kam es zunächst zu einer Zerstörung der Struktur und Morphologie des Biofilms (Wecke *et al.* 2000). Im Anschluss erfolgte auf einem entsprechenden Nährmedium und entsprechender Oberfläche die

Anzucht und Bildung des neuen Biofilms aus dem *in situ* gewonnenen Zellmaterial.

Zur Untersuchung von *in vitro* oder *in vivo* gewonnenen Biofilmproben gibt es verschiedene Verfahren, die je nach Fragestellung und Untersuchungsziel unterschiedlich Anwendung finden. Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung (REM) eignet sich vor allem zur Darstellung der Morphologie von Mikroorganismen und komplexen Strukturen in Biofilmen. Es können bei entsprechender Vergrößerung sowohl die Matrix als auch bakterielle Morphotypen wie z.B. „Maiskolben“ oder „Stoppelbürsten“ dargestellt werden (siehe Abbildung 4) (Kolenbrander 2000, Wecke *et al.* 2000). Um einzelne Bakterien rasterelektronenmikroskopisch zu untersuchen und diese artefaktfrei darstellen zu können, ist in den meisten Fällen eine Vorbehandlung des Biofilms (z.B. Dehydrierung, Fixierung, Imprägnierung) notwendig, die jedoch zu einer Zerstörung seiner ursprünglichen räumlichen Anordnung führt (Hannig 1999, Hope und Wilson 2004). Deshalb wird die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Biofilmen hauptsächlich zur Visualisierung oberflächlicher Strukturen angewendet (Friedman *et al.* 1992).

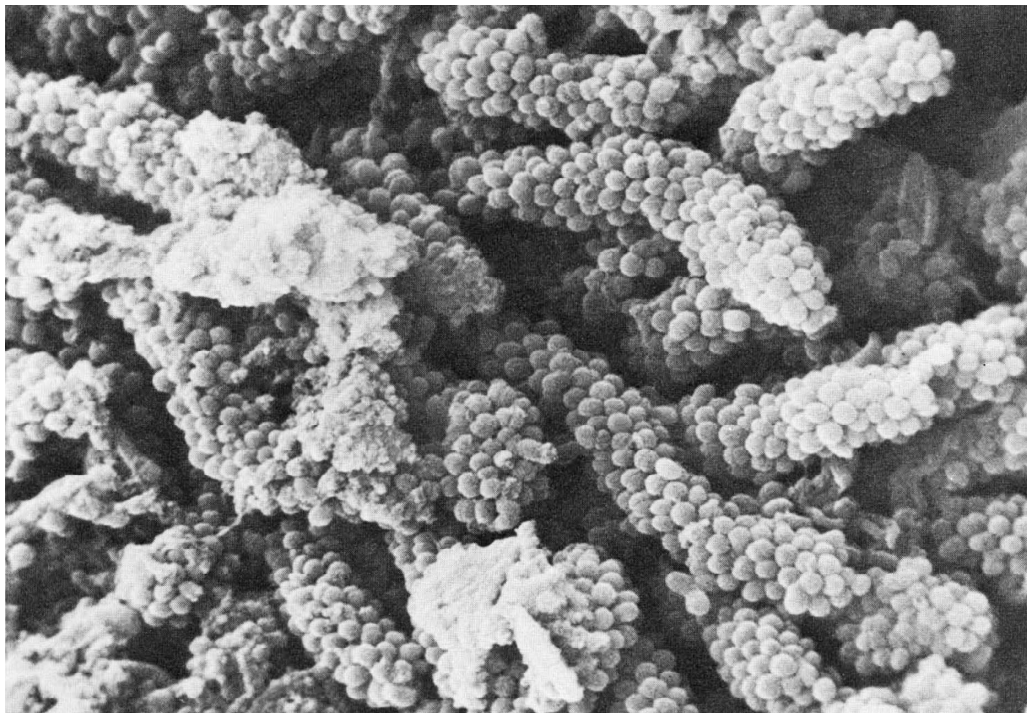


Abbildung 4: REM-Aufnahme eines dentalen Biofilms: Kokkenbakterien haften an filamentartigen Bakterien und bilden sogenannte „Maiskolbenstrukturen“ (Gibbons und van Houte 1973 S. 352)

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM), die ebenfalls zur Untersuchung von Biofilmen benutzt wird, erfordert hingegen keine Vorbehandlungen der Präparate. Dadurch ist es möglich, intakte und vitale Biofilmproben zu untersuchen (Lawrence *et al.* 1991). Bei diesem indirekten Verfahren der Bildentstehung rastert ein Laserstrahl

die zu untersuchende Präparatfläche ab. Die Rückstrahlung wird durch eine konfokale Blende von einem Detektor registriert und deren Intensität gemessen. Durch die konfokale Blende gelangen nur Intensitäten einer bestimmten Ebene des Präparats zum Detektor, so dass dieses in einzelnen Schichten abgebildet wird (siehe Abbildung 5) (Grötz *et al.* 1996). Die entstandenen Schnittbilder können durch eine entsprechende Datenverarbeitung zu dreidimensionalen Bildern rekonstruiert werden.

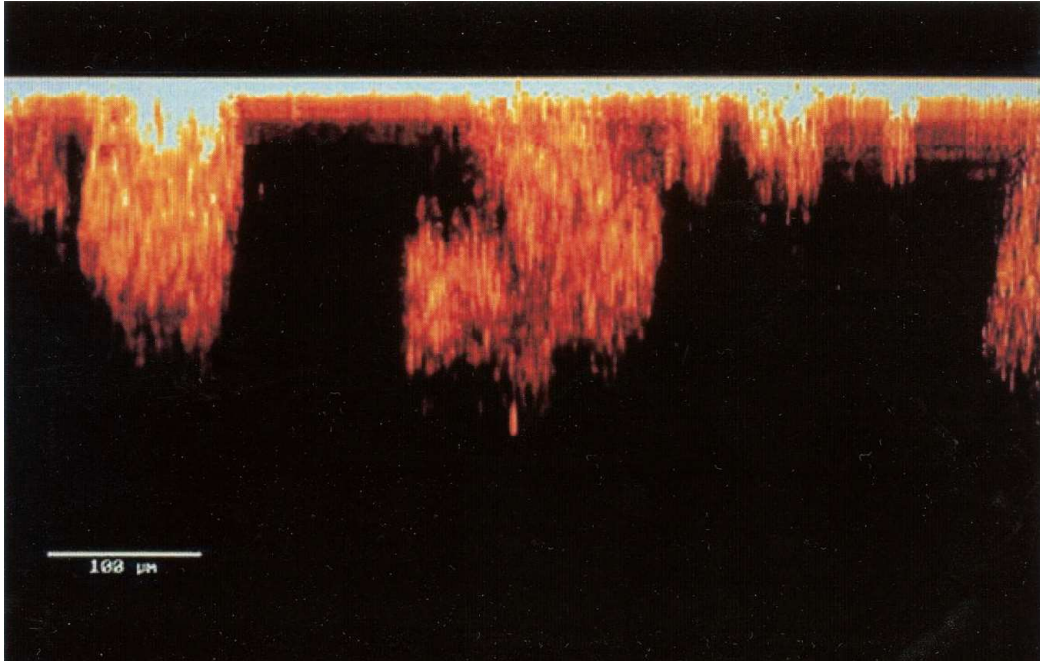


Abbildung 5: Beispiel einer Aufnahme eines Biofilms mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (Donlan und Costertan 2002 S.171)

Eine weitere Methode, mit der Mikroorganismen in Biofilmen untersucht werden können, ist die Vitalfluoreszenztechnik (VF). Dieses Verfahren wurde erstmals von Netuschil 1983 zur Untersuchung oraler Biofilme beschrieben. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, die Vitalität der Mikroorganismen in Biofilmen sichtbar zu machen (Netuschil 1983). Bei dieser Technik wird eine Substanz (Fluoresceindiaceat) benutzt, die in Zellen aufgenommen wird. In vitalen Zellen kommt es durch enzymatische Stoffwechselprozesse zu einem Umbau dieser Substanz in einen grün fluoreszierenden Farbstoff. Da toten Zellen diese Stoffwechselaktivität fehlt, bleibt die enzymatische Reaktion aus. Die farblosen toten Zellen werden in einem weiteren Schritt mit einer Gegenfärbung (Ethidiumbromid), der speziell an Nukleinsäuren bindet, rot angefärbt (siehe Abbildung 6). Die Vitalfluoreszenztechnik ist ein anerkanntes Verfahren, tote von lebenden Bakterien differenzieren zu können, und wurde in zahlreichen Studien angewendet (Netuschil *et al.* 1998, Herles *et al.* 1994, Netuschil *et al.* 1996, Bürgers *et al.* 2009). In einigen Studien werden die Vitalfluoreszenztechnik (VF) und Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) kombiniert, so dass eine dreidimensionale Darstellung der vitalen und toten Zellen im

Biofilm ermöglicht wird (Auschill *et al.* 2002, Zaura-Arite *et al.* 2001).

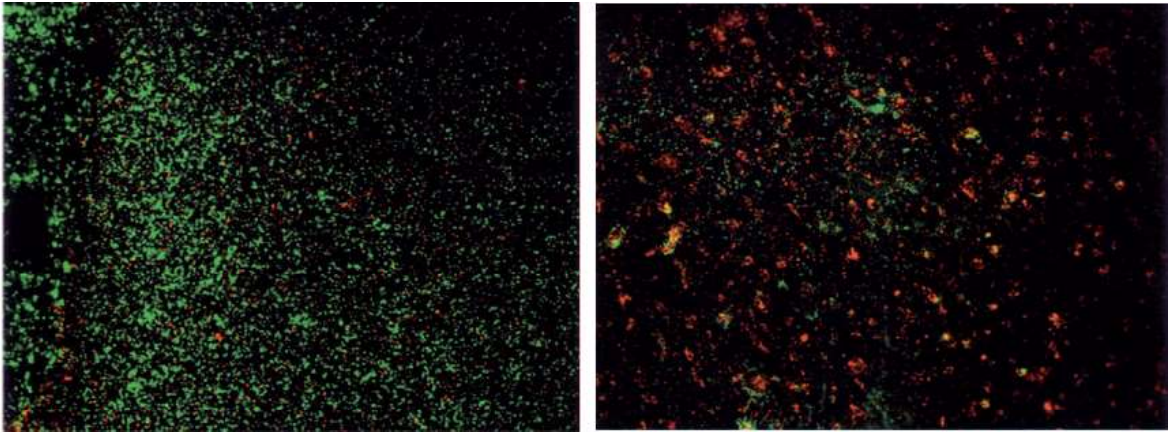


Abbildung 6: Vitalfluoreszenzmikroskopische-Aufnahme: vitale (grün) und tote (rot) Staphylokokken auf einer reinen Silikonoberfläche (links) sowie mit zusätzlicher Kupferbeschichtung (rechts) (Gosau *et al.* 2013)

3 Material und Methode

3.1 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die antimikrobielle Wirkung von Kupferadditiven in Zinkoxid-Phosphatzementen zu überprüfen. Hierzu wurde die Bildung von In-vivo-Biofilmen in der Mundhöhle von Probanden auf einem kupfergefüllten sowie einem herkömmlichen Zinkphosphatzement verglichen. Als Prüfzemente wurden Hoffmann's Kupfer Cement[®] (Hoffmann Dental Manufaktur GmbH, Berlin, Deutschland) sowie Hoffmann's Cement normalhärtend[®] (Hoffmann Dental Manufaktur GmbH, Berlin, Deutschland) verwendet. Diese zahnärztlichen Zemente sind für den Einsatz am Patienten zugelassen und werden in der klinischen Praxis weltweit verwendet. Die Beurteilung und Quantifizierung der Biofilme auf den Materialoberflächen sollte mittels Rasterelektronenmikroskopie erfolgen. Abschließend sollte ein möglicher präventiver Effekt gegen die Entstehung von Biofilmen mittels antimikrobiellen Additiven in dentalen Zementen auf ihre Wirksamkeit geprüft und diskutiert werden.

3.2 Studiendesign und klinischer Versuchsablauf

Bei der vorliegenden Untersuchung handelt es sich um eine prospektive klinische Studie. Insgesamt wurden 20 Probanden in die Studie aufgenommen, um die antibakteriellen Eigenschaften der zwei Prüfzemente zu beurteilen. Folgende Ein-/Ausschlusskriterien wurden vor Studienbeginn festgelegt:

Einschlusskriterien:

- Volljährigkeit
- Vollbezahnung (Minimum: Zähne 16-26 und 36-46)

Ausschlusskriterien:

- Alter < 18 Jahre
- Antibiose in den letzten 2 Monaten
- bekannte Xerostomie oder Bestrahlung im Hals-Kopf-Bereich

Vor Beginn der Studie wurde ein konkreter Tages-Zeitplan zum Ablauf der Untersuchung festgelegt, über den jeder Proband informiert und aufgeklärt wurde. Die Untersuchung der Studienteilnehmer erfolgte in zwei Gruppen. Die Probanden der ersten Gruppe erhielten jeweils vier Probekörper, die zur Hälfte aus Hoffmann´s Kupfer Cement und Hoffmann´s Cement normalhärtend hergestellt wurden. Die zweite Gruppe erhielt jeweils 4 Probekörper, die vollständig aus einem Zement gefertigt wurden (2X Hoffmann´s Kupfer Cement / 2X Hoffmann´s Cement normalhärtend).

Im Folgenden ist das Untersuchungsprotokoll zusammengefasst. Für jede Gruppe waren 3 Untersuchungstage notwendig:

Tag 1:

- Abdrucknahme für Herstellung eines Oberkiefersituationsmodells, Mundhygienekontrolle und Voruntersuchung
- Herstellen eines Oberkiefersituationsmodells sowie
- Herstellen der Probekörper und Politur
- Sterilisation der Probekörper, Tiefziehen einer Oberkieferträgerschiene im Dentallabor und Einbringen der Probekörper in Schienen

Tag 2:

- Eingliedern der Schienen mit Probekörpern sowie Anleitung der Probanden zur Ausgliederung der Trägerschiene zu den Mahlzeiten und zu Mundhygienemaßnahmen

Tag 3:

- Entnehmen der Schiene nach einer Tragezeit von 12 Stunden
- Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Probekörper

3.3 Ethikvotum

Die Durchführung der Studie wurde erst nach Erhalt des positiven Votums der Ethikkommission (Antragsnummer 12/9/13) der Medizinischen Fakultät Göttingen begonnen. Jeder der Teilnehmer wurde mündlich und schriftlich über den Studieninhalt und -ablauf sowie Datenschutz aufgeklärt. Eine Einverständniserklärung jedes Probanden lag vor.

Für diese klinische Studie stellten sich 20 Probanden (10 Frauen, 10 Männer) zur Verfügung. Die Rekrutierung der Studienteilnehmer erfolgte über Informationsblätter, welche in den Räumlichkeiten der ZMK der Universität Göttingen ausgehungen wurden. Die Probanden meldeten sich selbständig und freiwillig zur Teilnahme an der Studie.

Sie konnten zu jeder Zeit ohne Angabe von Gründen die Teilnahme an der Studie abbrechen. Jeder Proband erhielt eine Schiene mit jeweils vier Prüfkörpern und wurde angewiesen, bei möglichen Nebenwirkungen die Schiene selbstständig zu entfernen. Während der Tragezeit von 12 Stunden sollten keine antibakteriellen Mundspüllösungen verwendet werden. Zu Nahrungsaufnahme und Mundhygienemaßnahmen sollte die Schiene aus- bzw. wieder eingegliedert werden.

3.4 Klinische Voruntersuchung der Probanden

3.4.1 Anamnesebogen

Vor Studienbeginn wurde bei allen teilnehmenden Probanden eine Anamnese erhoben, um festzustellen, ob die entsprechenden Einschlusskriterien für die Studie erfüllt werden. Es wurde das Alter und Geschlecht dokumentiert sowie eine mögliche Xerostomie, Tumorerkrankungen im Hals-/Kopfbereich und eine antibiotische Therapie in den zurückliegenden letzten zwei Monate vor Studienbeginn ausgeschlossen.

3.4.2 Mundhygienestatus

Zur Beurteilung der Mundhygiene wurden alle Probanden zahnärztlich untersucht. Dafür wurde ein Blutungs- und Plaqueindex (SBI und API) erhoben sowie die Speichelflussrate bestimmt. Die Befunde jedes Probanden wurden auf dem Untersuchungsbogen dokumentiert.

3.5 Prüfzemente

Die verwendeten zahnärztlichen Zemente (siehe Abbildung 7) sind zur zahnmedizinischen Anwendung zugelassen und werden in der zahnärztlichen Praxis zum Befestigen von prothetischen Kronen aus goldhaltigen oder Nichtedelmetall-Legierungen verwendet. Folgende Zemente wurden in der Studie überprüft:

HOFFMANN'S KUPFER CEMENT[®]

Zusammensetzung (Herstellerangaben): Pulver enthält: Zinkoxid, Magnesiumoxid, Kupferferrovanat; Flüssigkeit enthält: o-Phosphorsäure

Zubereitungsform (Herstellerangaben): Pulver und Flüssigkeit werden in folgendem Verhältnis gemischt: 1,5 g Pulver : 1,0 g Flüssigkeit

Hersteller Etikettierung: Hoffmann's Kupfer Cement[®], ISO 9917, CE 0482

HOFFMANN'S CEMENT NORMALHÄRTEND®

Zusammensetzung (Herstellerangaben): Pulver enthält: Zinkoxid, Magnesiumoxid, Flüssigkeit enthält: o-Phosphorsäure

Zubereitungsform (Herstellerangaben): Pulver und Flüssigkeit werden in folgendem Verhältnis gemischt: 1,5 g Pulver : 1,0 g Flüssigkeit

Hersteller Etikettierung: Hoffmann's Cement normalhärtend®, ISO 9917,CE 0482



(a) Hoffmann's Kupfer Cement®



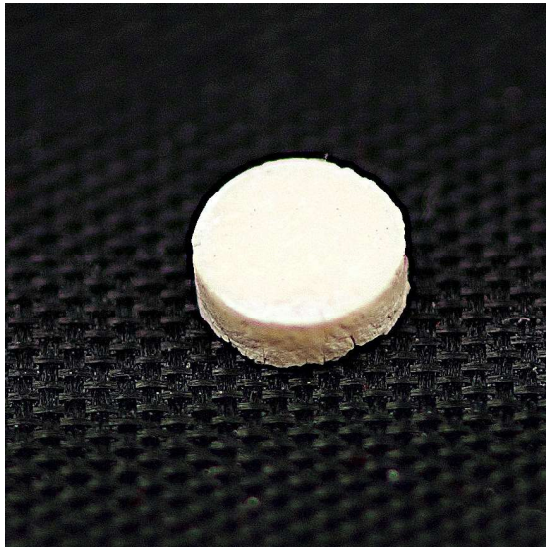
(b) Hoffmann's Cement normalhärtend®

Abbildung 7: Prüfzemente: jeweils Flüssigkeit (links) und Pulver (rechts)

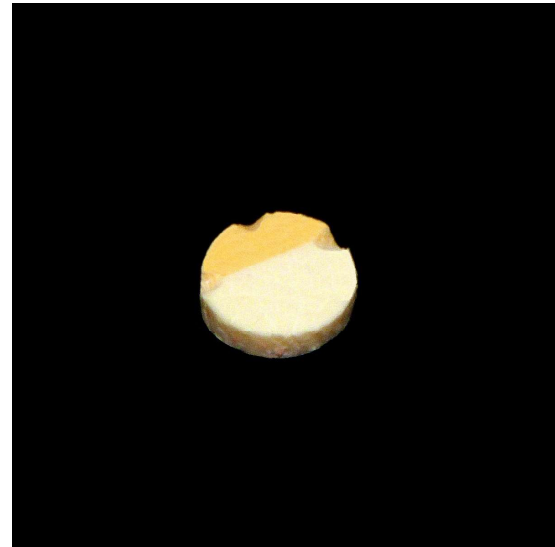
3.6 Herstellung der Probekörper

Für diese Studie wurden zwei verschiedene Arten von Probekörpern hergestellt. Für eine bessere visuelle Darstellung und Vergleichbarkeit der Biofilmbildung auf den jeweiligen Prüfzementen wurden geteilte Probekörper verwendet. Eine Hälfte des Probekörpers wurde dabei aus kupferhaltigem, die andere aus konventionellem Zinkphosphat-Zement hergestellt. Des Weiteren wurden Probekörper vollständig aus jeweils kupferhaltigem bzw. konventionellem Zinkphosphat-Zement hergestellt. Dadurch sollte die Plaqueakkumulation auf einer größeren Zementfläche als auf den geteilten Probekörpern beurteilt und zusätzlich mögliche lokale Einflussfaktoren minimiert werden. Jeder

Probekörper wurde als kreisrunde Scheibe mit 4 mm Durchmesser und 1 mm Schichtdicke definiert. Diese Maße erlaubten einen guten Tragekomfort in der Mundhöhle der Probanden und boten gleichzeitig ausreichend Fläche zur Biofilmmakkumulation und späteren Analyse (siehe Abbildung 8a und 8b).



(a) ganzer Probekörper: hier exemplarisch aus Hoffmann's Kupfer Zement®



(b) geteilter Probekörper: gelbe Hälfte mit drei Markierungen aus Hoffmann's Zement normalhärtend®, weiße Hälfte aus Hoffmann's Kupfer Zement®

Abbildung 8: Probekörper

Zur Herstellung wurde zunächst eine Schablone mit 49 Probekörpern aus Plexiglas mittels einer CNC-Fräse hergestellt (siehe Abbildung 9). Diese konnte dann beliebig oft mit einem Silikon dupliziert werden, um so eine entsprechende Negativ-Form zu erhalten (siehe Abbildung 10). Anschließend wurde die Form mit dem jeweiligen Zement, der nach einem Misch- und Aushärteprotokoll (siehe unten) zur Gewährleistung der Herstellerangaben angerührt wurde, befüllt. Die geteilten Probekörper wurden jeweils zur Hälfte mit den beiden Prüfzementen ausgegossen. Damit eine eindeutige Unterscheidung der beiden Prüfzemente im Rasterelektronenmikroskop möglich war, wurde die Hälfte des konventionellen Zinkphosphatzements mit drei Markierungen versehen. Alle Probekörper wurden abschließend poliert, um Silikonreste und Unreinheiten zu entfernen und eine möglichst glatte Oberfläche zu erhalten.

1. Abwiegen des Pulver- / Flüssigkeitsanteils im Verhältnis 1,5 : 1 mit einer Feinwaage (Cubis MSA, Sartorius, Deutschland)
2. Anmischen der Komponenten auf einer 20 °C temperierten Glasplatte für 90 Sekunden
3. Abbindezeit des Zements für 10 Minuten
4. Entnahme aus der Form

5. Politur mit einem Nassschleifgerät (Motopol 8, Buehler Ltd., Coventry, Großbritannien) und Nassschleifpapier 1000 Körnung (Buehler, Lake Bluff, IL, USA)

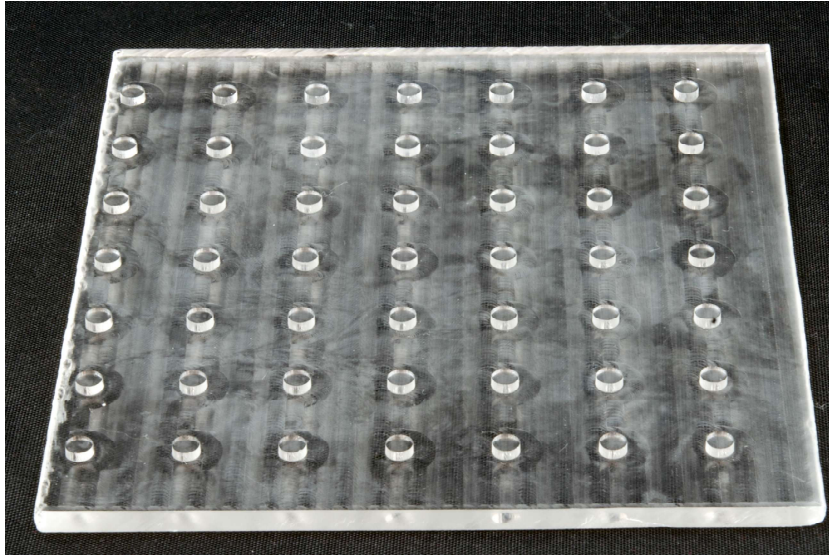


Abbildung 9: Gefräste Schablone aus Plexiglas

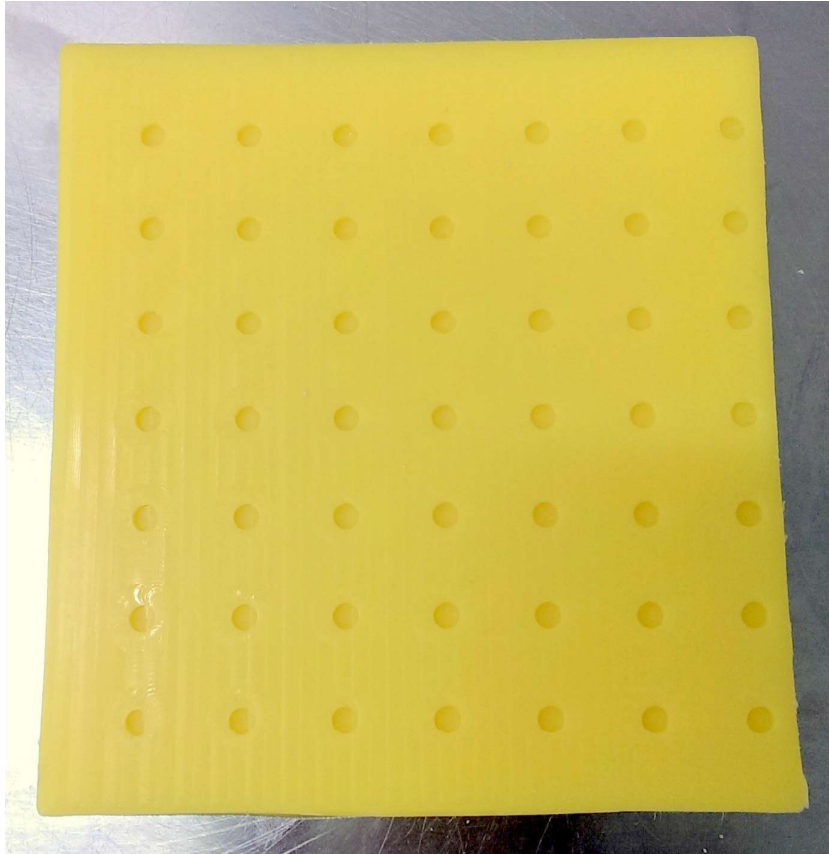


Abbildung 10: Silikongußform

3.7 Herstellung der Trägerschiene und Eingliederung

Nach der Abformung des Oberkiefers mit einer Alginat-Abformmasse (Palgat Plus[®], 3M ESPE, Deutschland) konnten die Abdrücke mit Superhartgips (GC Fujirock EP[®], GC Europe, Belgien) ausgegossen werden. Auf den getrimmten Modellen wurden zunächst die Unterschnitte im Bereich der Zahnreihen mit Silikon (Silaplast Futur[®], Detax GmbH & Co. KG, Deutschland) ausgeblockt. Anschließend wurden die Probekörper vestibulär auf den Prämolaren und Molaren mit Klebewachs (Deiberit[®], Böhme & Schöps Dental GmbH, Deutschland) befestigt. Zur Herstellung der Trägerschienen wurden die Folien aus einem thermoplastisch verformbaren Kunststoff (Erkodur[®], Erkodent, Deutschland) auf den Modellen tiefgezogen (siehe Abbildung 11). Anschließend wurden die Trägerschienen mit einer Schere auf dem Modell zugeschnitten und die Prüfkörperoberflächen mit einem Skalpell freigelegt (siehe Abbildung 12). Die fertiggestellten Schienen wurden schließlich den Probanden eingesetzt, ggf. individuell angepasst und mögliche Druckstellen entfernt (siehe Abbildung 13).



Abbildung 11: Herstellung der Trägerschiene



Abbildung 12: Fertiggestellte Schiene mit Probekörpern auf dem Modell



Abbildung 13: Trägerschiene mit Probekörpern in situ

3.8 Beurteilung der Plaqueakkumulation

3.8.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die Probekörper wurden zur Darstellung des Biofilms im Rasterelektronenmikroskop (Quanta FEG 200, FEI Company, USA siehe Abbildung 14) untersucht. Vor Beginn der Untersuchungen des Probandenkollektivs wurden REM-Testaufnahmen angefertigt. Dafür wurden vier ungetragene Probekörper (ohne Biofilm) mit denen, die 12 Stunden in situ waren, verglichen. Die Probekörper für diese Testreihe wurden dabei vom Prüfzahnarzt selbst intraoral getragen. Es sollte evaluiert werden, inwiefern sich der Biofilm auf den Probekörpern durch eine Übersichtsaufnahme im Rasterelektronenmikroskop darstellen lässt. Biofilmbedeckte Areale sollten sich eindeutig von biofilmfreien Arealen abgrenzen lassen.



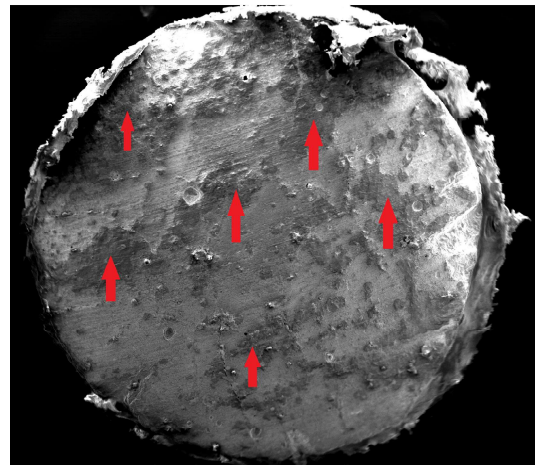
Abbildung 14: Rasterelektronenmikroskop (Quanta FEG 200, FEI Company, USA)

Um eine übersichtliche Darstellung der Prüfkörper zu erhalten, wurden Sekundärelektronenabbildungen mit einer 50 bis 60-fachen Vergrößerung angefertigt. Diese Betriebsart ist gut zur Anfertigung topographischer Oberflächenaufnahmen geeignet. Die Aufnahmen wurden im High-Vacuum-Modus (HV) bei einem Umgebungsdruck von 10^{-5} mbar mit Hilfe eines Large Field Detectors (LFD) durchgeführt. Die Anregungsspannung (HV) wurde mit 1-3 kv möglichst niedrig gewählt, um das Risiko einer Artefaktbildung und Oberflächenschädigung, die vornehmlich bei höheren Spannungen auftritt,

zu vermeiden. Um eine bessere Tiefenschärfe zu erhalten, wurde ein geringer Arbeitsabstand (WD) von ca. 10 mm gewählt. Bei der Auswertung der Testaufnahmen konnten mit Biofilm besiedelte von biofilmfreien Bereichen deutlich unterschieden werden (siehe Abbildung 15). Der Biofilm stellte sich in der REM-Übersichtsaufnahme kontrastreicher und dunkler als die freie Zementoberfläche dar (siehe Abbildung 15b). Nachdem diese Differenzierung sichergestellt werden konnte, erfolgte die Untersuchung der Prüfkörper des Probandenkollektivs in gleicher Art und Weise.



(a) Probekörper ohne Biofilm



(b) Probekörper nach 12 Stunden intraoraler Verweildauer (biofilmbesiedelte Bereiche durch Pfeile markiert)

Abbildung 15: Vergleich biofilmfreier/-belegter Probekörper

Des Weiteren sollte anhand der REM-Aufnahmen auch Aussagen über die Qualität des Biofilms gemacht werden. Dafür wurden REM-Aufnahmen mit einer höheren Vergrößerung (bis zu 12000-fach) angefertigt, so dass eine Darstellung einzelner Bakterien im μm -Bereich sowie anderer Strukturen und Bestandteile des oralen Biofilms möglich war.

3.8.2 Energie-Dispersive-Röntgenanalytik (EDX-Spektrum und EDX-Mapping)

Mittels Energie-Dispersiver-Röntgenanalytik (EDX-Analytik) sollte außerdem die Elementzusammensetzung des Pulveranteils beider Prüfzemente sowie deren Kupferanteil bestimmt werden. Bei dieser Untersuchung wird die elementspezifische, charakteristische Röntgenstrahlung gemessen, die bei der Anregung eines Atoms durch einen Elektronenstrahl abgegeben wird. Durch das Auftreffen des Elektronenstrahls auf ein kernnahes Elektron im Atom wird dieses herausgeschlagen und die entstandene Lücke durch

ein energiereicheres Elektron einer äußeren Schale geschlossen (siehe Abbildung 16). Bei diesem Vorgang wird Röntgenstrahlung frei, die für jedes Element unterschiedlich und somit spezifisch ist. Durch geeignete Detektoren (Halbleiterdetektoren) können die Strahlungsintensitäten gemessen und so auf das jeweilige Element geschlossen werden (Goldstein 2003).

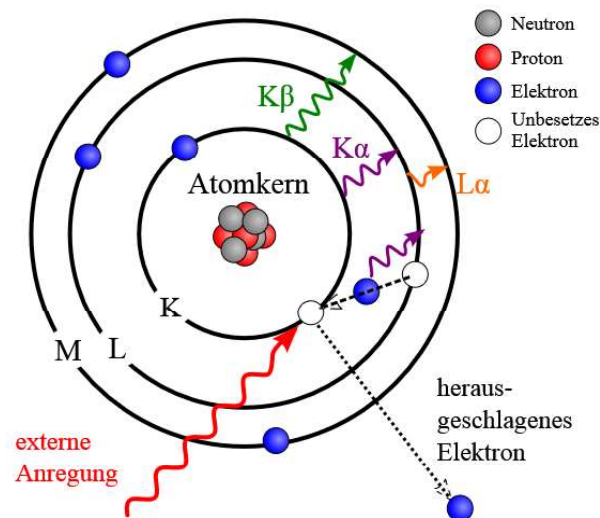


Abbildung 16: Schematisches Atommodell zur Erklärung der Entstehung der Röntgenemission (EDX) aus <http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:EDX-Atommodell.gif>

Im EDX-Spektrum (siehe Abbildung 17) wird die Elementzusammensetzung der jeweiligen Probe dargestellt. Es wird die Signalintensität (in Abhängigkeit von der Energie der Röntgenquanten) aufgetragen. Es zeigt sogenannte elementspezifische „Peaks“ auf einem unspezifischen Untergrund (Goldstein 2003). In dieser Studie sollten die EDX-Spektren für beide Prüfzemente erhoben und hinsichtlich ihrer Elementzusammensetzung und Kupferanteils verglichen werden. Dafür wurden EDX-Flächen- und Punktanalysen der zuvor angefertigten Sekundärelektronenbilder gemacht. Bei einer Flächenanalyse wird der gesamte Probenbereich abgerastert und die elementare Zusammensetzung des gesamten Probenbereichs ermittelt. Bei einer Punktanalyse wird hingegen mit einem scharf fokussierten Elektronenstrahl ein μm^2 -Bereich untersucht. Anhand der Punktanalyse sollte stichprobenartig überprüft werden, inwiefern sich die elementare Zusammensetzung einzelner Zementpartikel unterscheidet.

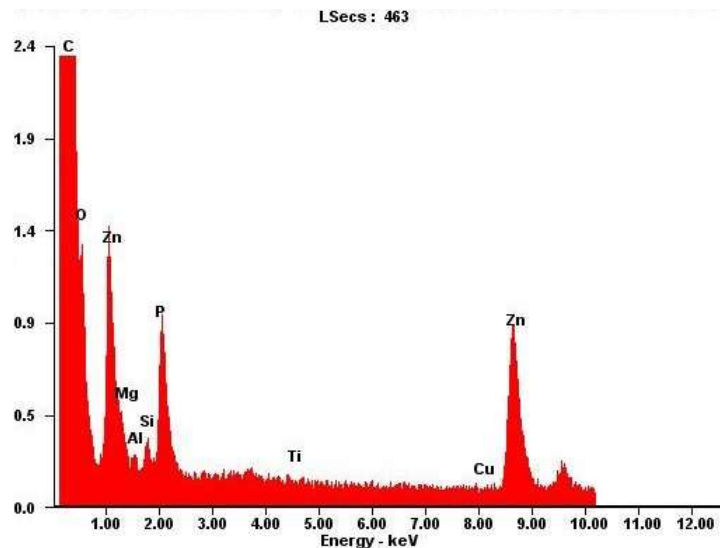


Abbildung 17: Exemplarische Darstellung eines EDX-Spektrums

Durch ein EDX-Mapping (siehe Abbildung 18) sollten zusätzlich Bilder der Elementverteilung auf den Oberflächen der Prüfzemente angefertigt werden. Dieses Verfahren beruht auf der Analyse von Linien gleicher Schwärzung/Intensität (Äquidensiten) für jeweils ein Element und deren Zuordnung zu Falschfarben. Auf diese Weise werden für die Verteilung jedes Hauptelements über die untersuchte Fläche Einzelbilder erstellt. Durch Übereinanderlegen der Einzelbilder entsteht das fertige Mapping (Pritzel 2012). Zunächst wurden Sekundärelektronenbilder gemacht, um topographische Informationen über die Zementpartikelverteilung und Korngrößen zu erhalten. Anschließend wurden Mapping-Bilder bezüglich der Elemente Zink und Kupfer für die beiden Prüfzemente erstellt und deren Verteilung den Sekundärelektronenbildern gegenübergestellt.

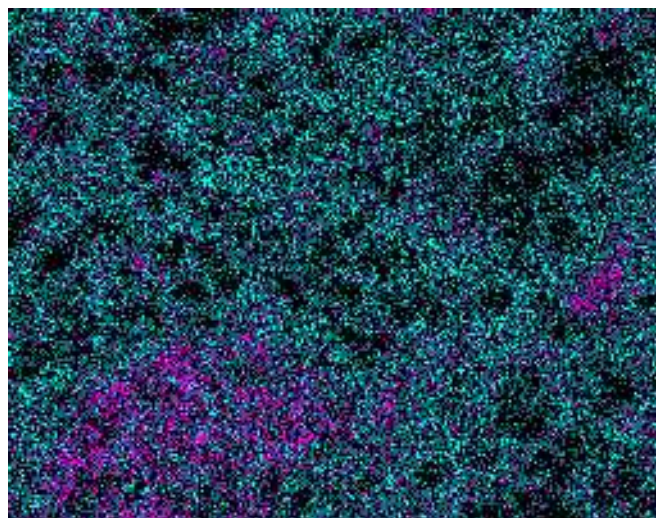
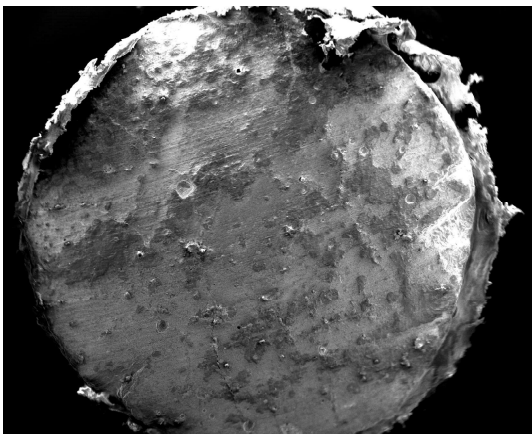


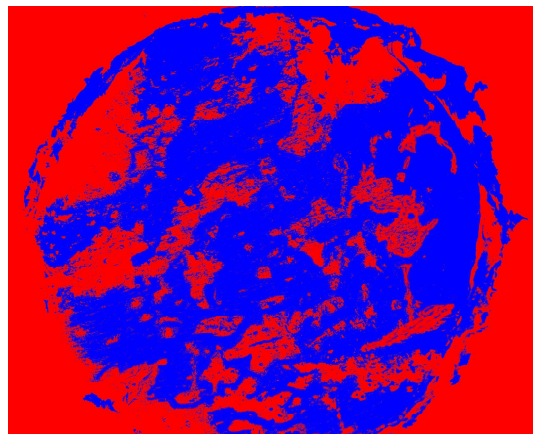
Abbildung 18: Beispiel eines EDX-Mapping: Verteilung zweier verschiedener Elemente (violett/türkis)

3.8.3 Digitale Bildbearbeitung und Auswertung

Die Biofilmbesiedlung auf den Prüfkörpern wurde mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramm Photoshop CS5 (Adobe Systems Incorporated, Californien, USA) sowie der Oberflächenanalysesoftware ImageJ 1.48 (National Institutes of Health, Maryland, USA) quantitativ berechnet. Um eine Erkennung der mit Biofilm besiedelten Bereiche von den freien Zementoberflächen für die Bildverarbeitungssoftware ImageJ 1.48 (National Institutes of Health, Maryland, USA) zu ermöglichen, wurden zunächst die Graustufen der REM-Aufnahmen mittels der Bildbearbeitungssoftware Photoshop CS5 (Adobe Systems Incorporated, Californien, USA) in Falschfarben konvertiert. Durch diesen Vorgang wurden die verschiedenen Graustufen ab einem definierten Grenzwert einer Falschfarbe zugeordnet. Dunklere Grauwerte, die vor allem in Biofilm besiedelten Bereichen vorkamen, wurden durch die Farbe Rot ersetzt. Hellere Graustufen hingegen, die vor allem die freien Zementoberflächen repräsentierten, wurden durch die Farbe Blau ersetzt (siehe Abbildung 19).



(a) Original REM-Aufnahme (Graustufen)



(b) Falschfarbendarstellung der mit Biofilm besiedelten Areale (rot) und freien Zementoberfläche (blau)

Abbildung 19: Falschfarbenkonvertierung

Die Biofilmbesiedlung konnte anschließend auf den konvertierten Aufnahmen mit der Oberflächenanalysesoftware ImageJ 1.48 (National Institutes of Health, Maryland, USA) quantitativ bestimmt werden. Dazu wurden die zu untersuchenden Flächen manuell markiert und der prozentuale Anteil roter bzw. blauer Pixel an der markierten Gesamtfläche berechnet. Der prozentuale Anteil roter Pixel konnte mit dem Anteil biofilmbedeckter Flächen gleichgesetzt werden. Der Prozentwert für den Anteil blauer Pixel repräsentierte die biofilmfreie Zementoberfläche. Abschließend wurden diese Werte für die beiden Prüfkörper miteinander verglichen und statistisch ausgewertet.

3.9 Statistische Auswertung

Die Verteilung der Parameter Alter und Plaque (Flächenangabe in Prozent von der Gesamtfläche) wurden durch die Mittelwerte und Standardabweichung beschrieben und getrennt vom Prüfzement, dem Geschlecht, den geteilten und ganzen Probekörpern sowie dem Gesamtkollektiv dargestellt. Bezüglich des Parameters Plaque wurde mittels eines allgemeinen linearen Modells für wiederholte Messungen der Einfluss der Zementart, des Alters, Geschlechts und deren Wechselwirkungen mit den geteilten, ganzen und allen Probekörpern untersucht. Die Reihenfolge der Parameter im multivariaten Modell war von den Ergebnissen der univariaten Analyse abhängig. Die Parameter mit den niedrigsten p-Werten wurden dem multivariaten Modell zuerst zugeführt. Das Signifikanzniveau wurde für alle statistischen Tests bei $\alpha = 5\%$ festgelegt. Alle Analysen wurden mit der Statistiksoftware R (version 3.0.2, www.r-project.org) durchgeführt und wiederholte Messungen durch Mittelwerte der „Generalized Estimating Equations“ mittels des R-package „geepack“ modelliert (Prentice und Zhao 1991).

4 Ergebnisse

4.1 Probandenkollektiv

Das Probandenkollektiv dieser Studie bestand aus 10 Männern und 10 Frauen. Davon erhielten jeweils fünf Männer und fünf Frauen vier ganze Probekörper, die andere Hälfte des Kollektivs hingegen geteilte Probekörper. Die Probanden waren zwischen 23 (Minimum) und 34 (Maximum) Jahren alt. Das Durchschnittsalter der Studienteilnehmer betrug 26 Jahre mit einer Standardabweichung von 3,42 Jahren. Eine Übersicht über die Verteilung der Mittelwerte \pm Standardabweichungen des Probandenalters differenziert nach dem Geschlecht und den ganzen oder geteilten Probekörpern sowie dem Gesamtkollektiv wird in Tabelle 1 dargestellt. Insgesamt war das Alter in beiden Probandengruppen gleichmäßig verteilt. Die männlichen Probanden waren im Durchschnitt etwas älter (26,3 Jahre) als die weiblichen Studienteilnehmer (25,7). Außerdem war die Altersdifferenz bei den Männern größer als bei den Frauen.

| Probekörper | Geschlecht | Alter |
|----------------------|------------|-----------------|
| ganze Probekörper | ♂ | 27.8 ± 5.67 |
| | ♀ | 25 ± 2 |
| geteilte Probekörper | ♂ | 24.8 ± 0.84 |
| | ♀ | 26.4 ± 3.36 |
| Gesamtkollektiv | ♂ | 26.3 ± 4.14 |
| | ♀ | 25.7 ± 2.71 |

Tabelle 1: Verteilung der Mittelwerte und \pm Standardabweichungen des Probandenalters abhängig vom Geschlecht innerhalb der ganzen und geteilten Probekörper sowie für das Gesamtkollektiv

4.2 Ergebnisse der klinischen Voruntersuchung

Bei der Auswertung der Anamnesebögen wurde darauf geachtet, dass jeder der 20 Studienteilnehmer die Einschlusskriterien der Studie erfüllt. Bei allen Studienteilnehmern konnte anamnestisch eine Tumorerkrankung im Hals-/Kopfbereich, eine Xerostomie sowie eine Antibiotika-Gabe in den letzten 2 Monaten vor Studienbeginn ausgeschlossen werden. Außerdem wurden von jedem Probanden die erhobenen Untersuchungsbefunde des Mundhygienestatus ausgewertet. Bei allen Studienteilnehmern wurde sowohl ein Sulkus-Blutungs-Index (SBI) $< 10\%$ als auch ein Approximalraum-Plaque-Index (API) $< 35\%$ festgestellt. Die Ergebnisse der Speichelflussrate waren ebenfalls bei jedem Probanden mit $> 1,5$ ml/min im physiologischen Bereich. Somit konnte zu Studienbeginn bei allen Probanden ein gesundes Parodontium und eine gute Mundhygiene festgestellt werden.

4.3 Ergebnisse der Plaqueakkumulation auf geteilten und ganzen Probekörpern (quantitativ)

In Tabelle 2 werden die Mittelwerte und \pm Standardabweichungen für die Messergebnisse der plaquebedeckten Flächen auf den ganzen und geteilten Probekörpern sowie dem Geamtkollektiv präsentiert. Die Ergebnisse wurden nach dem jeweiligen Prüfzement (konventionell oder kupferhaltig) und dem Geschlecht differenziert, um einen möglichen Einfluss dieser Parameter auf die Plaqueakkumulation feststellen zu können. Die Boxplots (siehe Abbildungen 20 und 21) zeigen die Verteilung der Messergebnisse für die Plaqueakkumulation (in %) auf den geteilten und ganzen Probekörpern. Die Messwerte werden auch separat für Geschlecht und Prüfzement (Kupfer/Konventionell) dargestellt. Insgesamt zeigte sich auf den geteilten Probekörpern unabhängig vom Prüfzement eine höhere Plaqueakkumulation als auf den ganzen Probekörpern (siehe Abbildungen 20 und 21). Zudem waren die ganzen und geteilten Probekörper der männlichen Probanden tendenziell mehr mit Plaque bedeckt als bei den weiblichen Studienteilnehmern (siehe Abbildungen 22, 23 und 25).

| Probekörper | Prüfzement | Geschlecht | Plaque (%) | Plaque ($\varphi + \sigma$ %) |
|-----------------|---------------|------------|-------------------|--------------------------------|
| Ganze | Kupfer | ♂ | 44.7 ± 6.52 | $40,8 \pm 9,72$ |
| | | ♀ | 36.9 ± 11.1 | |
| | Konventionell | ♂ | 45.72 ± 8.49 | $40,32 \pm 13,53$ |
| | | ♀ | 34.93 ± 15.86 | |
| Geteilte | Kupfer | ♂ | 53.88 ± 22.13 | $50,87 \pm 22,1$ |
| | | ♀ | 47.87 ± 22.23 | |
| | Konventionell | ♂ | 51.8 ± 27.29 | $47,27 \pm 23,45$ |
| | | ♀ | 42.75 ± 18.56 | |
| Gesamtkollektiv | Kupfer | ♂ | 50.82 ± 18.8 | $47,52 \pm 19,4$ |
| | | ♀ | 44.22 ± 19.74 | |
| | Konventionell | ♂ | 49.77 ± 22.78 | $44,96 \pm 20,85$ |
| | | ♀ | 40.14 ± 17.83 | |

Tabelle 2: Mittelwert und \pm Standardabweichung differenziert nach Prüfzement, Geschlecht, geteilten und ganzen Probekörpern sowie dem Gesamtkollektiv

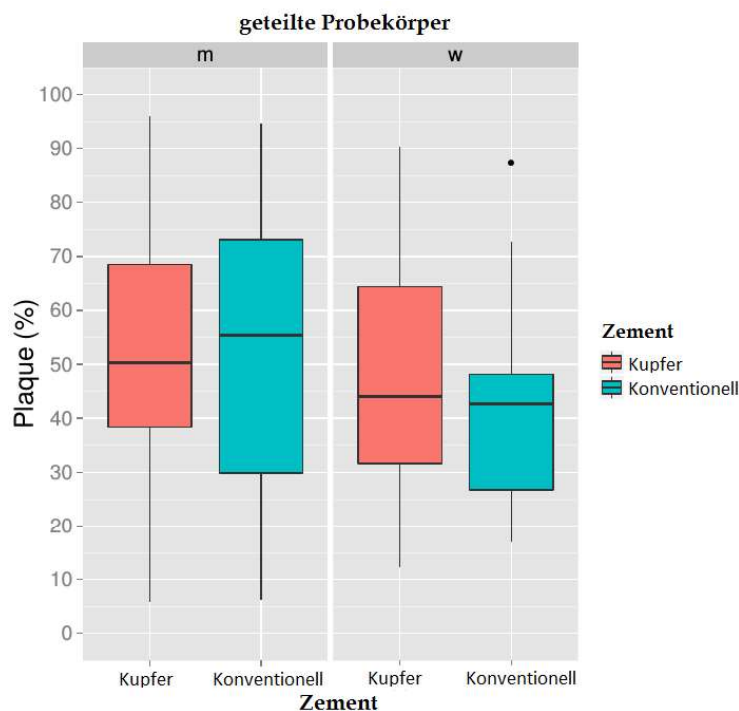


Abbildung 20: Verteilung des Parameters Plaque (in %) bei Männern und Frauen auf geteilten Probekörpern mit kupferhaltigem und konventionellem Zement

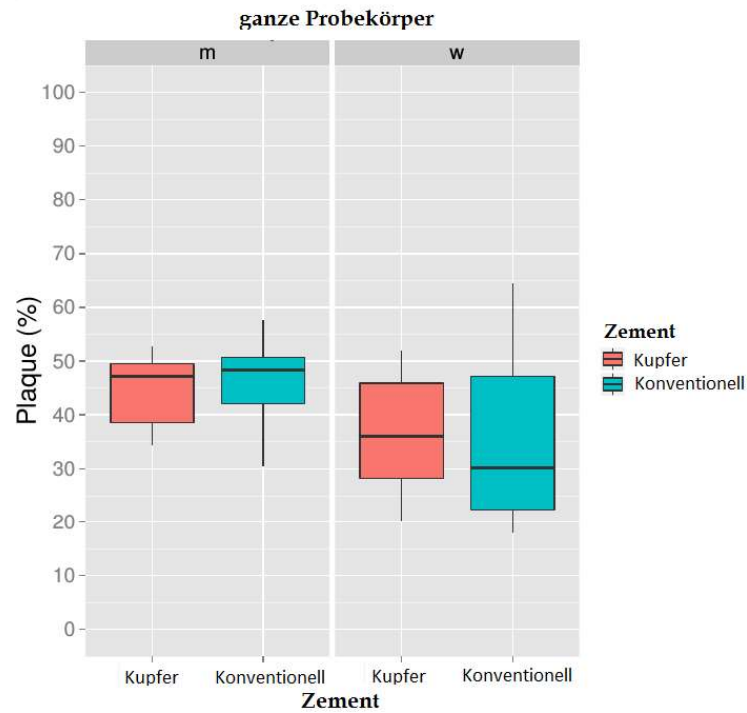


Abbildung 21: Verteilung des Parameters Plaque (in %) bei Männern und Frauen auf ganzen Probekörpern mit kupferhaltigem und konventionellem Zement

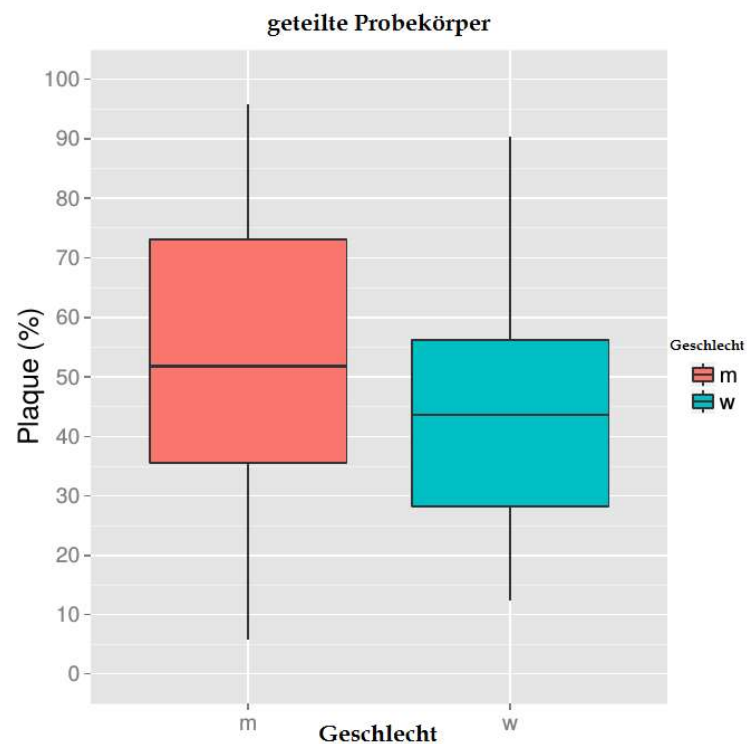


Abbildung 22: Verteilung des Parameters Plaque (in %) für Männer und Frauen auf geteilten Probekörpern unabhängig vom Prüfzement

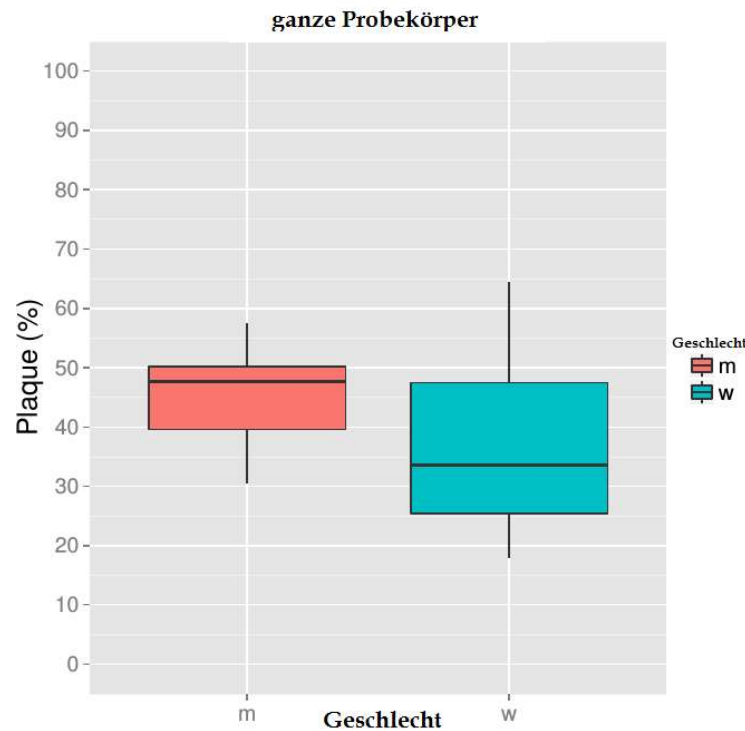


Abbildung 23: Verteilung des Parameters Plaque (in %) für Männer und Frauen auf den ganzen Probekörpern unabhängig vom Prüfzement

Der signifikante Einfluss des Geschlechts auf die Plaqueakkumulation bestätigte sich auch im Allgemeinen Linearen Modell für die ganzen Probekörper (siehe Tabelle 3b Geschlecht $p=0,02$). Außerdem konnte sowohl für die ganzen als auch die geteilten Probekörper eine signifikanter synergistischer Einfluss des Probandenalters und -geschlechts auf die Plaqueakkumulation festgestellt werden, so dass das jüngere weibliche Probanden allgemein eine geringere Plaqueakkumulation aufwiesen (siehe Tabelle 3a und 3b Alter x Geschlecht $p<0,001$). Bei den geteilten Probekörpern zeigte sich zudem ein signifikanter kombinierter synergistischer Einfluss des Alters, Prüfzements und Geschlechts auf den Parameter Plaque (siehe Tabelle 3a Alter x Prüfzement x Geschlecht $p= 0,003$). Zudem fällt bei der Betrachtung der Tabellen 3a und 3b auf, dass der jeweilige Prüfzement (Kupfer/Konventionell) weder bei den ganzen noch geteilten Probekörpern einen Einfluss auf die Plaqueakkumulation hatte.

| Parameter | p |
|---------------------------------|------------------|
| Alter | 0.1406 |
| Prüfzement | 0.4102 |
| Geschlecht | 0.6890 |
| Alter x Prüfzement | 0.3108 |
| Alter x Geschlecht | <0.001 |
| Prüfzement x Geschlecht | 0.2109 |
| Alter x Prüfzement x Geschlecht | 0.0036 |

(a) geteilte Probekörper

| Parameter | p |
|---------------------------------|---------------|
| Alter | 0.5200 |
| Prüfzement | 0.7068 |
| Geschlecht | 0.0222 |
| Alter x Prüfzement | 0.1936 |
| Alter x Geschlecht | 0.0095 |
| Prüfzement x Geschlecht | 0.3849 |
| Alter x Prüfzement x Geschlecht | 0.3024 |

(b) ganze Probekörper

Tabelle 3: Ergebnisse des allgemeinen linearen Modells: Einfluss (p-Werte) des Alters, Prüfzements und Geschlechts sowie deren Wechselwirkungen auf den Parameter Plaque für geteilte und ganze Probekörper

4.4 Ergebnisse der Plaqueakkumulation im Gesamtkollektiv (quantitativ)

In den Boxplots (siehe Abbildung 24 und 25) wird die Verteilung der Messwerte für die Plaqueakkumulation für das Gesamtkollektiv (geteilte und ganze Probekörper zusammengefasst) dargestellt. Die Tendenzen, die zuvor bei der getrennten Auswertung der Probekörper in den Boxplots (siehe Abbildungen 22 und 23) beobachtet wurden, trafen auch für das Gesamtkollektiv zu. Es zeigte sich eine tendenziell vermehrte Plaqueakkumulation bei den männlichen Probanden (siehe Abbildung 25). Allerdings konnte dieser Einfluss des Geschlechts im allgemeinen linearen Modell nicht bestätigt werden (siehe Tabelle 4 Geschlecht $p=0,23$). Insgesamt konnte bei keinem der getesteten Parameter ein signifikanter Einfluss auf die Plaqueakkumulation festgestellt werden (siehe Tabelle 4).

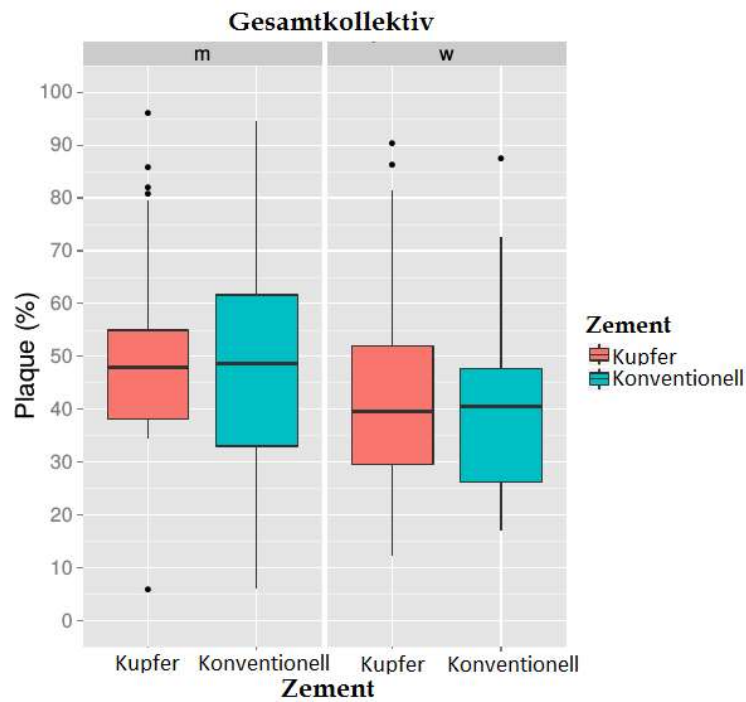


Abbildung 24: Verteilung des Parameters Plaque (in %) bei Männern und Frauen im Gesamtkollektiv auf kupferhaltigem und konventionellem Zement

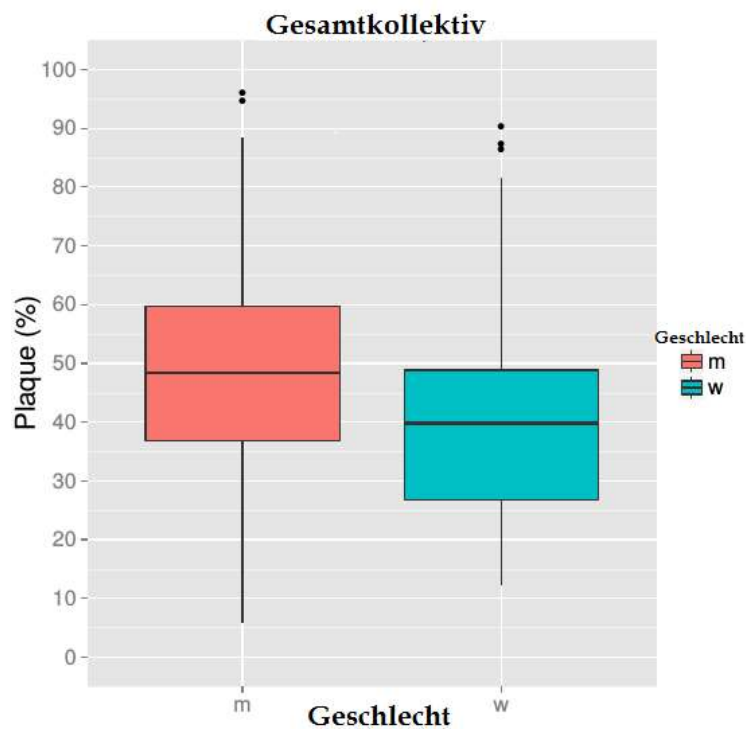


Abbildung 25: Verteilung des Parameters Plaque (in %) für Männer und Frauen im Gesamtkollektiv

| Parameter | p |
|---------------------------------|----------|
| Alter | 0.9088 |
| Prüfzement | 0.7323 |
| Geschlecht | 0.2323 |
| Alter x Prüfzement | 0.6831 |
| Alter x Geschlecht | 0.2557 |
| Prüfzement x Geschlecht | 0.2554 |
| Alter x Prüfzement x Geschlecht | 0.9417 |

Tabelle 4: Ergebnisse des allgemeinen linearen Modells: Einfluss (p-Werte) des Alters, Prüfzements und Geschlechts sowie deren Wechselwirkungen auf den Parameter Plaque für das Gesamtkollektiv

4.5 Ergebnisse der Plaqueakkumulation (qualitativ)

Um Aufschluß über die Morphologie und Strukturen innerhalb des intraoral gebildeten Biofilms zu bekommen, wurden Aufnahmen mit bis zu 12000-facher Vergrößerung von jedem Probekörper angefertigt. Alle Probekörper waren mit Biofilm bedeckt, wobei die Besiedlungsdichte und Dicke der Plaque entsprechend der getesteten Einflussparameter Geschlecht und Alter (siehe Tabelle 3a und 3b) variierte. Anhand der angefertigten REM-Bilder konnten keine Unterschiede in der Plaqueakkumulation auf beiden Testzementen dargestellt werden. Die Abbildungen 27 und 26 zeigen exemplarisch zwei Ausschnitte aus den angefertigten REM-Aufnahmen. Auf Abbildung 26 ist ein Ausschnitt einer mit Plaque besiedelten Oberfläche eines Probekörpers mit 2589-facher Vergrößerung dargestellt. Auf der Oberfläche des Probekörpers ist ein heterogener Belag zu erkennen. Dieser bedeckt die Oberfläche nicht vollständig, so dass freie Areale der Zementoberfläche zusehen sind. Des weiteren sind Trocknungsriss innerhalb der Oberfläche zu erkennen. Auf Abbildung 27 ist bei 11242-facher Vergrößerung ein Ausschnitt des heterogenen Belags aus Abbildung 27 dargestellt. Man erkennt deutlich Stäbchen- sowie Kokken-Bakterien, die in einer Matrix eingebettet sind. Weitere Angaben hinsichtlich der verschiedenen bakteriellen Morphotypen sowie genauere Angaben zu Plaquedicke können anhand dieser Aufnahmen nicht getroffen werden.



Abbildung 26: REM-Aufnahme (2589-fache Vergrößerung): Bakterienaggregation, eingebettet in einer Matrix aus extrazellulären Polysacchariden

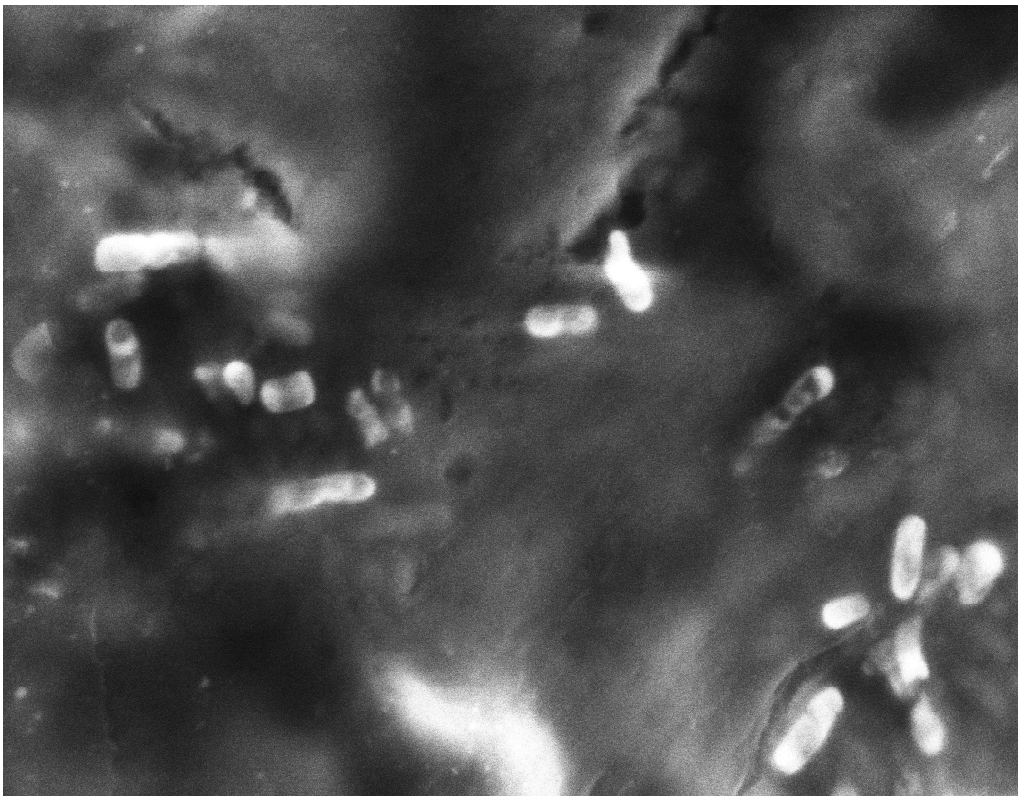


Abbildung 27: REM-Aufnahme (11242-fache Vergrößerung): Bakterienaggregation, vornehmlich aus Kokken- und Stäbchenbakterien

4.6 Ergebnisse der EDX-Analytik

Die Sekundärelektronenbilder der beiden Prüfzementpulver wurden zur besseren Darstellung der Zementpartikel mit 1000-facher Vergrößerung angefertigt (siehe Abbildungen 28 und 29). Sie zeigen die unterschiedlichen Pulverkörner, die am ehesten als ein heterogenes Kristallkonglomerat beschrieben werden können. Die Korngrößen variieren dabei zwischen $1\mu\text{m}$ - $40\mu\text{m}$. Die Kornverteilung und -dichte variiert innerhalb der Aufnahmen. Zwischen den Zementkörnern sind teilweise schwarze Areale der kohlenstoffhaltigen Trägerfolie des Probenhalters sichtbar. Auf beiden REM-Aufnahmen mit 1000-facher Vergrößerung sind zwischen den beiden Prüfzementen morphologisch keine Unterschiede zu erkennen. Lediglich die Korndichte ist auf Abbildung 28 höher als bei 29.

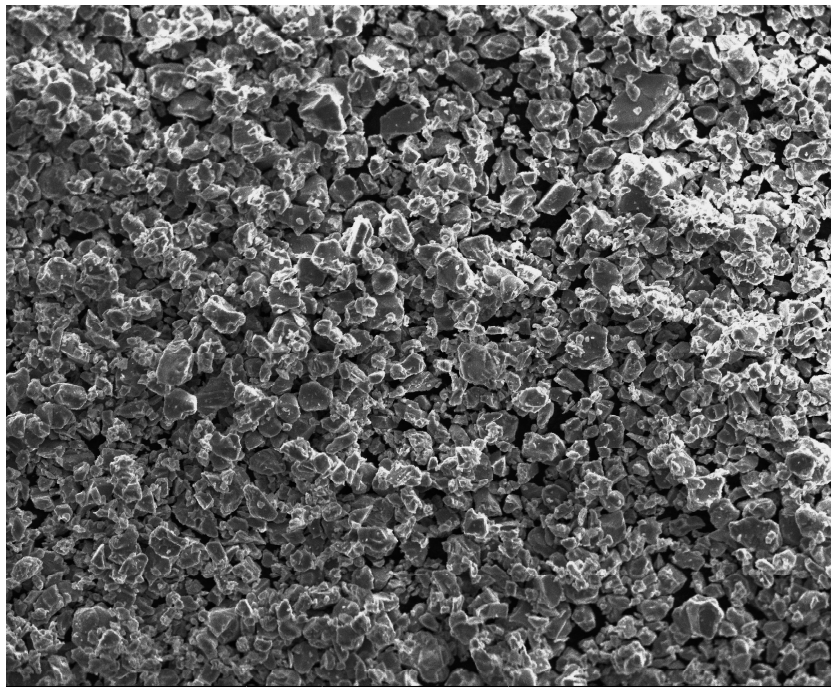


Abbildung 28: REM-Aufnahme (1000-fache Vergrößerung): Hoffmann's Cement normalhärtend Pulveranteil

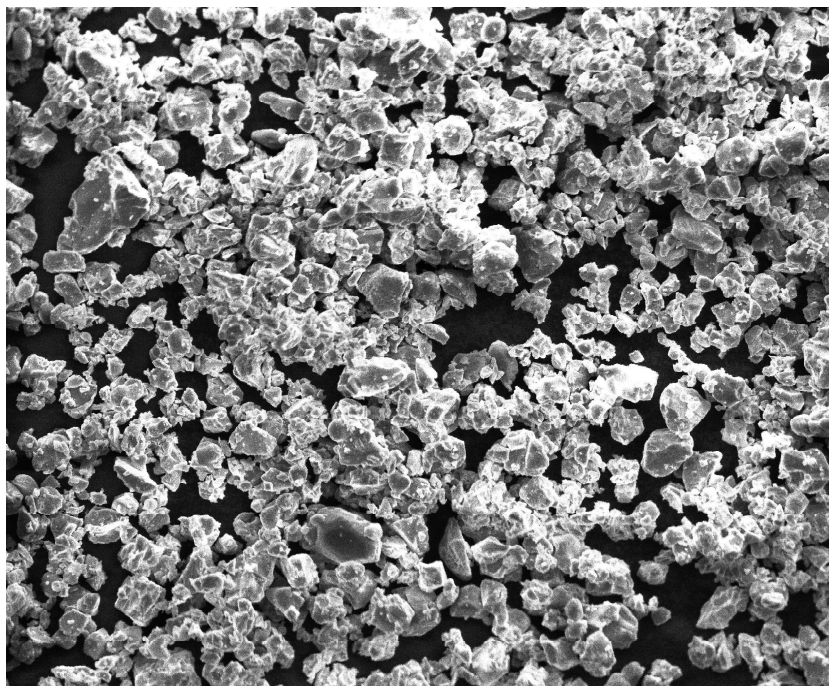


Abbildung 29: REM-Aufnahme (1000-fache Vergrößerung): Hoffmann's Kupfer Cement Pulveranteil

Die EDX-Spektren der Flächenanalyse werden in Abbildung 30 und 31 dargestellt. In beiden Prüfzementen sind ausgeprägte Zink-, Sauerstoff- und Kohlenstoffpeaks zu erkennen. Der hohe Anteil an Kohlenstoff ist vor allem durch die kohlenstoffhaltige Trägerfolie zu erklären. Außerdem konnte ein geringerer Magnesiumpeak gemessen werden. Es fällt auf, dass sowohl im Hoffmann's Cement normalhärtend als auch Hoffmann's Kupfer Cement kein eindeutiger Kupferpeak vom breiten unspezifischen Untergrund der Bremsstrahlung abgrenzbar ist. Insgesamt sind sich die beiden Prüfzemente in ihrer elementaren Zusammensetzung sehr ähnlich.

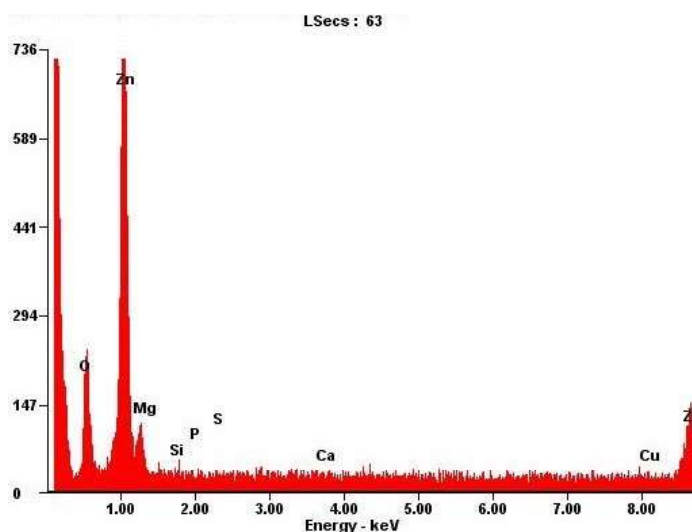


Abbildung 30: EDX-Spektrum der Flächenanalyse: Hoffmann's Cement normalhärtend[®]

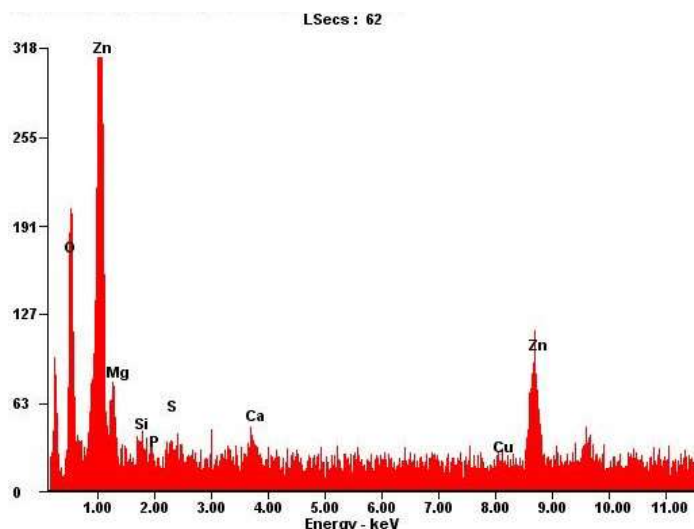


Abbildung 31: EDX-Spektrum der Flächenanalyse: Hoffmann's Kupfer Cement

In den Abbildungen 32 und 33 sind die entsprechenden Elementverteilungsbilder (Mappings) für das Element Kupfer zu den beiden REM-Aufnahmen der Prüfzemente (siehe Abbildung 28 und 29) zu sehen. In der Probe des Hoffmann's Cement normalhärtend (siehe Abbildung 32) ist keine vermehrte Anreicherung von Kupfer erkennbar. Es werden lediglich unspezifisch und heterogen verteilte Strahlungen detektiert. Im Gegensatz dazu ist auf dem Mapping für Hoffmann's Kupfer Cement (siehe Abbildung 33) innerhalb einiger Bereiche ein erhöhter Kupfergehalt feststellbar. Diese Areale sind eindeutig bestimmten Zementpartikeln zuzuordnen.



Abbildung 32: Der Abbildung 28 zugehöriges EDX-Mapping für das Element Kupfer

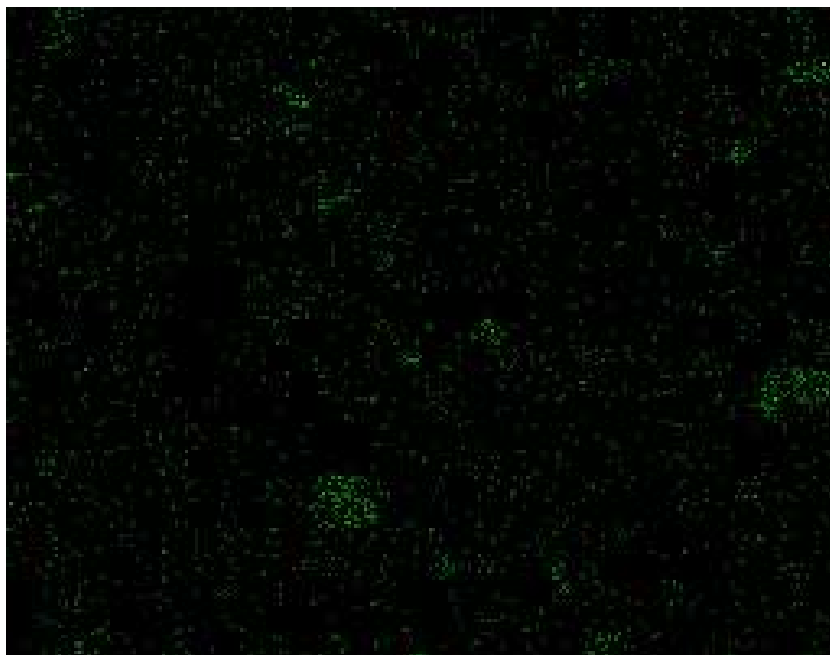
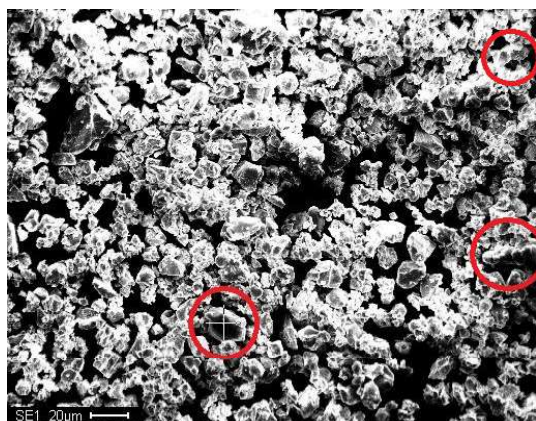
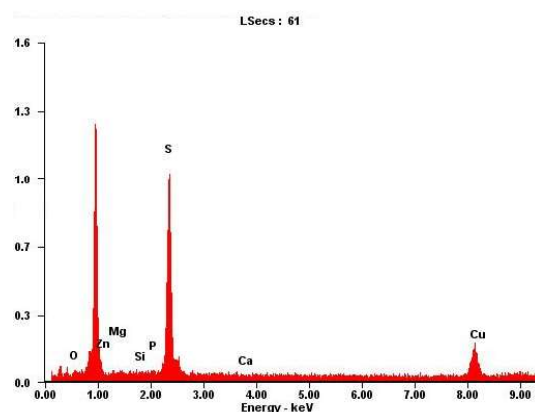


Abbildung 33: Der Abbildung 29 zugehöriges EDX-Mapping für das Element Kupfer

Zur genaueren Analyse der elementaren Zusammensetzung dieser kupferreichen Partikel wurde neben dem Mapping eine EDX-Punktanalyse durchgeführt und mit benachbarten Bereichen verglichen. Auf den Abbildungen 34a und 35a sind die Messbereiche rot markiert. Daneben sind in den Abbildungen 34b und 35b die dazugehörigen EDX-Spektren für diese Bereiche dargestellt.



(a) REM-Aufnahme (siehe auch Abbildung 29): Kreuz markiert zu untersuchendes Partikel

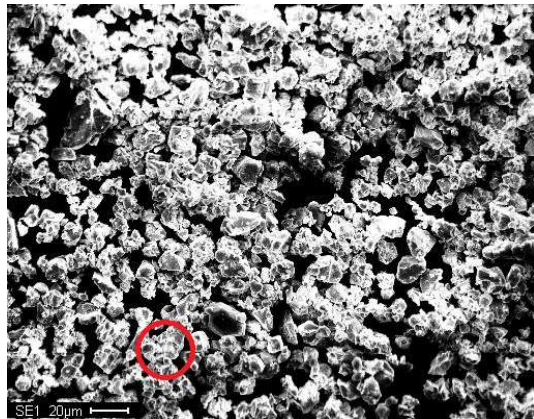


(b) EDX-Spektrum des markierten Zementpartikel

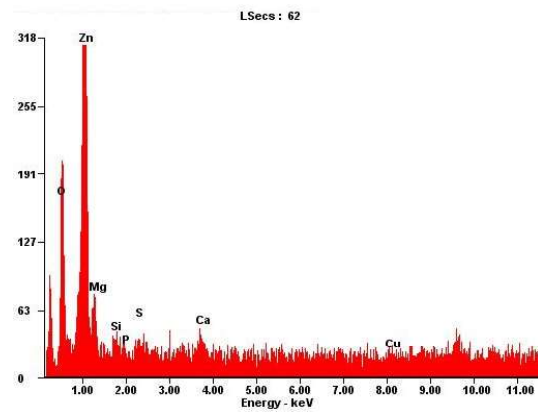
Abbildung 34: Punktanalyse eines Zementpartikels aus Abbildung 29

In Abbildung 34b sind deutliche Peaks für Zink, Schwefel und Kupfer zu erkennen. Im Vergleich zu den EDX-Flächenanalysen konnte kein Peak für Magnesium und Sauerstoff gemessen werden. Diese Zusammensetzung weicht deutlich von den Ergebnissen

der EDX-Flächenanalyse beider Prüfzemente ab und ist nur in den schon im Mapping gezeigten kupferreichen Regionen zu finden. Das EDX-Spektrum des angrenzenden Bereichs in Abbildung 35b zeigt hingegen erhöhte Peaks für Zink, Sauerstoff und Magnesium. Diese Zusammensetzung ist mit den Ergebnissen der EDX-Flächenanalyse beider Prüfzemente vergleichbar (siehe Abbildung 30 und 31).



(a) REM-Aufnahme (siehe auch Abbildung 29): Kreuz markiert zu untersuchendes Partikel



(b) EDX-Spektrum des markierten Zementpartikels

Abbildung 35: Punktanalyse eines Zementpartikels aus Abbildung 29

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

In der Literatur gibt es zahlreiche Studien, die sich mit Biofilmen und der bakteriellen Adhäsion auf verschiedenen medizinischen Biomaterialien (Kathetern, künstlichen Gelenkprothesen, Knochenzementen, dentalen Materialien) beschäftigen (Song *et al.* 2015, Veerachamy *et al.* 2014, Zhang *et al.* 2011, McConoughey *et al.* 2014, Yousif *et al.* 2015, Jacqueline und Caillon 2014). Ein besonderer Fokus vieler Autoren liegt in diesem Zusammenhang auf der Überprüfung von möglichen antimikrobiellen Substanzen, die eine Biofilmbildung reduzieren oder verhindern können (Kowalczyk *et al.* 2012, Ellenrieder *et al.* 2012, Perez *et al.* 2014, Gosau *et al.* 2013, Hachem *et al.* 2009). Zur Erforschung der Biofilmbildung und mikrobiellen Prozesse wurden in der Vergangenheit eine Vielzahl von In-vivo-Modellen entwickelt (Rupp und Fey 2001, Harraghy *et al.* 2006, Bjarnsholt *et al.* 2013, Coenye und Nelis 2010, Seth *et al.* 2012). Dennoch gibt es gegenwärtig keinen „Goldstandard“, da jedes Modell - abhängig vom individuellen Immunsystem des Wirts, der Oberflächenbeschaffenheit des Untersuchungsmaterials und der jeweiligen Fragestellung - unterschiedlich gut geeignet ist (Lebeaux *et al.* 2013).

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, unter möglichst physiologischen Bedingungen die Biofilmbildung auf einem konventionellen und einem mit Kupfer angereicherten dentalen Befestigungszement zu evaluieren und in diesem Zusammenhang die antimikrobielle Wirksamkeit von Kupfer auf den oralen Biofilm zu überprüfen. Für die vorliegende Fragestellung wurde ein spezielles In-vivo-Modell verwendet. Dieses stellt die direkteste und natürlichste Art der Untersuchung von Biofilmen dar (Wimpenny 1997), da dieser *in situ*, das heißt physiologisch im Mund des Probanden, gebildet wird. Jedoch führt genau dies zu Schwierigkeiten bei der Durchführung der Studie sowie der Auswertung und Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Zunächst kann die Erprobung antibakterieller Substanzen ein gesundheitliches Risiko für die Probanden darstellen. Da es sich bei den Prüfzementen dieser Studie um bereits seit Jahren zugelassene Produkte handelt (Gorodovsky und Zidan 1992), konnte ein gesundheitliches Risiko der Probanden nahezu ausgeschlossen werden. Des Weiteren liegen bei *in vivo* durchgeführten Untersuchungen durch interindividuelle Unterschiede (wie z.B. mikrobielle Ausgangsflora, Mundhygiene, Erkrankungen, Speichelflussrate, Medikamente etc.) ver-

schiedene Ausgangsbedingungen vor (Sissons 1997). Daher wird von vielen Autoren bei der Untersuchung von oralen Biofilmen eine klinische Voruntersuchung der Probanden durchgeführt, um so diese individuellen Einflussfaktoren zu minimieren und annähernd gleiche Bedingungen für eine bessere Vergleichbarkeit der Resultate zu schaffen (Faust 2010, Nascimento *et al.* 2013, Papavasileiou 2013, Jentsch *et al.* 2014). Bei der vorliegenden Studie wurde daher ebenfalls eine klinische Voruntersuchung (Anamnese, Mundhygiene-Indizes, Speichelflussrate) der Probanden in Anlehnung an die Studie von Papavasileiou (2013) durchgeführt und entsprechende Ein- und Ausschlusskriterien definiert.

An der vorliegenden Studie nahmen insgesamt 20 Probanden, jeweils 10 Männer und 10 Frauen, teil. Eine größere Anzahl an Studienteilnehmern wäre wünschenswert und statistisch sicherlich aussagekräftiger gewesen. Auf Grund des relativ komplexen Herstellungsprozesses der dentalen Trägerschienen und des aufwendigen Studienprotokoll wurde die Anzahl auf 20 Probanden begrenzt. Dennoch ist diese Kollektivgröße mit denen aktueller Untersuchungen in der Literatur vergleichbar. In vielen Studien war die Probandenzahl sogar deutlich kleiner gewählt worden. Prada-López *et al.* (2015b) verglichen in einer In-vivo-Untersuchung die Wirkung zweier antisptischer Mundspüllösungen auf die orale Biofilmmakkumulation. An der Studie nahmen 15 Probanden teil. In einer Untersuchung von Bürgers *et al.* (2010) wurde in einer In-vitro- und In-vivo-Untersuchung die initiale Biofilmmakkumulation auf zwei verschiedenen Implantatoberflächen untersucht. An dieser Untersuchung nahmen 6 Probanden teil. Arweiler *et al.* (2004) untersuchten die dreidimensionale Struktur und Vitalität dentaler Biofilme, die simultan an verschiedenen Stellen in der Mundhöhle innerhalb von 48 Stunden gewachsen waren. In diese Untersuchung wurden 8 Probanden einbezogen.

Die intraoral gebildete Plaque besitzt eine sehr dünne und fragile Struktur (Robinson *et al.* 1997). In früheren In-vivo-Studien wurden *in situ* gebildete Biofilme von der Zahnoberfläche mit Papierspitzen oder Scalern für eine spätere Untersuchung entnommen (Al-Ahmad *et al.* 2010). Allerdings wurde dabei die dreidimensionale Struktur des Biofilms, die für die interzellulären Kommunikationswege unter den einzelnen Mikroorganismen sowie deren metabolische Kooperation von großer Bedeutung ist, zerstört (Kuramitsu *et al.* 2007). In der aktuellen Literatur werden daher verschiedene Trägermaterialien benutzt, um eine schonende Entnahme des dreidimensionalen Biofilmgefüges zu ermöglichen. Die Varianten und Gestaltung der Trägersysteme sind sehr unterschiedlich und wurden bereits in Abschnitt 2.4 beschrieben. Sie umfassen unter anderem Kunststofffolien (Theilade 1964), Plast-Spray-Filme (Brex *et al.* 1994), Bracket-Systeme (Meyerowitz *et al.* 1991), Glas- /Schmelzplättchen (Macpherson *et al.* 1990), Splintsysteme (Nyvad und Kilian 1987), metallische Bügel/Bögen (Krekeler *et al.* 1990) und Kunststoffschienen (Auschill *et al.* 2004, 2005, Eckelmann 1995). Diese

verschiedenen Trägersysteme haben das gemeinsame Ziel, den Biofilm in der Mundhöhle zu sammeln und dessen mögliche Zerstörung bzw. Interferenzen bei der physiologischen Biofilmmak-kumulation zu verhindern (Wehle 2004). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Gestaltung gibt es, abhängig vom Ziel der Untersuchung, Vor- und Nachteile in ihrer Anwendung. Kunststofffolien (Theilade 1964) und dünne Plast-Spray-Filme (Brex *et al.* 1994), die der Zahnoberfläche direkt anliegen, sind Zungen- und Mundschleimhautbewegungen ungeschützt ausgesetzt. Dadurch kann es einerseits zu deren Ablösung kommen, andererseits kann die Biofilmbildung beeinträchtigt werden (Wehle 2004). Ähnliches gilt für adhäsiv befestigte Bracketsysteme, an denen der Biofilm durch die Zungen- und Schleimhautbewegungen zerstört werden kann. Durch die Säure-Ätz-Technik beim Festkleben der Brackets kommt es zudem zu einer Entmineralisierung des Zahnschmelzes, so dass für diese Art der Biofilmgewinnung auch eine gewisse Invasivität zu berücksichtigen ist. Dadurch, dass die adhäsiv befestigten Systeme sich nicht aus der Mundhöhle ausgliedern lassen, ist auch eine adäquate Mundhygiene für die Probanden während der Tragezeit nicht möglich. Auf Grund dieser Problematiken werden in jüngeren Studien vor allem Trägersysteme verwendet, die eine Ein- und Ausgliederung des Trägersystems für den Probanden ermöglichen (Prada-López *et al.* 2015a, Quintas *et al.* 2015).

Für diese klinische Studie wurden tiefgezogene Kunststoffschienen als Trägersystem benutzt, die in Anlehnung an Studien von Gosau *et al.* (2010) und Wehle (2004) gestaltet wurden. Bei dieser Methode handelt es sich um eine systematisch reproduzierbare und kostengünstige Variante, die Probekörper intraoral in entsprechender Position zu fixieren. Die zuvor angesprochenen Problematiken anderer Trägersysteme können durch diese Art der intraoralen Befestigung minimiert bzw. ausgeschlossen werden. So ist es für die Probanden jederzeit möglich, die Schiene zur Durchführung von Mundhygienemaßnahmen einfach aus der Mundhöhle zu entfernen und im Anschluss wieder zu integrieren, ohne dabei den gebildeten Biofilm zu zerstören. Des Weiteren können irreversible Schäden an Hart- und Weichgeweben, wie z.B. durch das Anätzen von Zähnen bei adhäsiven Systemen, ausgeschlossen werden. Außerdem wurde versucht den Abrieb der Plaque durch die Zunge zu verhindern, indem die Probekörper jeweils bukkal im Oberkiefer in der Prä-/Molarenregion platziert wurden. Ein gewisser Abrieb des gebildeten Biofilms durch die Wangenschleimhaut konnte hingegen nicht ausgeschlossen werden. Dieser ist jedoch auch als physiologisch zu betrachten, da an den Zahnoberflächen in der Mundhöhle immer ein natürlicher mechanischer Abrieb sowohl durch die Wangenschleimhaut von vestibulär als auch von palatinal und lingual durch Zungenbewegungen vorliegt (Zanatta *et al.* 2011).

Abgesehen von einem geeigneten Trägersystem zur Biofilmgewinnung wurde vor der Durchführung dieser Studie die intraorale Verweildauer der Probekörper festgelegt. In

der Literatur gibt es diesbezüglich keine einheitlichen Angaben. Je nach Fragestellung und Autor sind diese sehr unterschiedlich, mit zeitlichen Differenzen von wenigen Sekunden (Baier und Glantz 1978) bis hin zu mehreren Tagen (Auschill *et al.* 2002) aufgeführt. Diese unterschiedlichen Zeiten lassen sich dadurch erklären, dass die Plaquebildung ein Prozess ist, der bereits nach wenigen Minuten durch die Erstbesiedlung der Zahnoberfläche mit frühkolonisierenden Streptokokken einsetzt (Rosan *et al.* 1982) und bis zur Ausreifung einer reifen Plaque zwei Wochen andauern kann (Hellwig *et al.* 2007). Deshalb sind zur Untersuchung der Biofilmstruktur und Morphologie, die größere Plaquemengen erfordert, eher längere Tragezeiten empfehlenswert. Zur Untersuchung von initialen Adhäsionsprozessen der Biofilmbildung hingegen sollten kürzere Tragezeiten angestrebt werden (Wehle 2004). In den meisten aktuellen Studien wurde vornehmlich die initiale Plaquebildung untersucht, so dass sich die dortigen Angaben auf eher kürzere Zeiten beziehen (Al-Ahmad *et al.* 2013: 30 min bis 120 min, Bürgers *et al.* 2010: 12 Stunden, Wehle 2004: 16 Stunden, Nascimento *et al.* 2013 und Nascimento *et al.* 2014: 24 Stunden). Da in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls primäre Adhäsionsprozesse von Interesse waren, wurde eine intraorale Verweildauer von 12 Stunden festgelegt. Diese Tragedauer wurde in Studien von Bürgers *et al.* (2010) und Papavasileiou (2013) bezüglich der Biofilmmakkumulation als ausreichend betrachtet. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung bestätigen dies, da die Probekörper im Mittel 35-55% mit Biofilm bedeckt waren.

Die in der Literatur beschriebenen Untersuchungsmethoden zur Biofilmbildung und mikrobiellen Adhäsion wurden in Abschnitt 2.4 vorgestellt. Jede dieser Methoden hat ihren Indikationsbereich und ist abhängig vom Fokus der Untersuchung einer anderen über- bzw. unterlegen. Zurzeit ist die Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) sicherlich eine der geeignetsten Methoden, um einen In-vivo gebildeten Biofilm in seiner Gesamtheit mit all seinen Schichten zu untersuchen (Zaura-Arite und ten Cate 2004, Zaura-Arite *et al.* 2001). Diese Technik liefert Schichtbilder und ermöglicht es so, auch tiefergelegene Regionen innerhalb des Biofilms darzustellen, ohne diesen dabei zerstören zu müssen (Netuschil *et al.* 1998). Durch die Verwendung zusätzlicher Marker und Fluoreszenzfarbstoffe (Vitalfluoreszenztechnik) ist es zudem möglich, Informationen über Zusammensetzung, biochemische Vorgänge und Vitalität der Mikroorganismen innerhalb des Biofilms zu erhalten (Faust 2010). In dieser Studie waren allerdings solche Informationen nicht von primärem Interesse. Vielmehr sollte die Biofilmmakkumulation (prozentuale Anteil der mit Biofilm bedeckten Flächen) auf den beiden Prüfzementen insgesamt und quantitativ bestimmt werden, um so Rückschlüsse auf die antibakterielle Wirksamkeit des Kupfers ziehen zu können. In der vorliegenden Untersuchung wurde deshalb eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Biofilme verwendet. Die Darstellung von Biofilmen mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) ist in der Literatur häufig beschrieben und eignet sich besonders gut zur Visualisierung ober-

flächlicher Strukturen. Vor allem in Studien, die Substanzen auf ihre antibakteriellen Eigenschaften untersuchten, wurde die Rasterelektronenmikroskopie zur Darstellung der bakteriellen Morphologie und der quantitativen oberflächlichen Verteilung des Biofilms verwendet (Albuquerque *et al.* 2015, Du *et al.* 2012, Bürgers *et al.* 2010, Hannig 1999, Jentsch *et al.* 2002). Des Weiteren besteht bei der Rasterelektronenmikroskopie die Möglichkeit, bei entsprechender Vergrößerung und zusätzlicher Vorbehandlung (Dehydrierung, Fixierung, Imprägnierung) Aussagen zur Qualität des Biofilms (Morphotypen der Bakterien, Matrixbestandteile) machen zu können (Wecke *et al.* 2000). Auf eine derartige aufwendige Vorbehandlung wurde jedoch in dieser Studie verzichtet, da es hierbei zu einer Zerstörung des ursprünglichen Biofilmgefüges kommen kann (Donlan und Costerton 2002). Eine anschließende Beurteilung der Plaqueverteilung auf den Probekörpern wäre dann nicht möglich gewesen. Dennoch wurde versucht, gewisse Informationen zur Qualität des Biofilms und der Mikroorganismen zu erhalten, so dass neben den REM-Übersichtsaufnahmen auch Aufnahmen mit höherer Vergrößerung angefertigt wurden. Auf Grund der fehlenden Vorbehandlung der Biofilmproben wurden die Ergebnisse der qualitativen Biofilmuntersuchung rein deskriptiv dargestellt und keine weitere statistischen Auswertung durchgeführt. Fasst man die Ergebnisse zusammen, so kann die elektronenmikroskopische Untersuchung in dieser Studie als geeignete Methode zur Beurteilung der Biofilmmakkumulation gesehen werden. Sie ermöglichte eine einfache und systematisch reproduzierbare Anfertigung von Übersichtsaufnahmen der einzelnen Probekörperoberflächen. Mittels dieser gelang es, die Oberflächen der Probekörper vollständig darzustellen. Im Anschluss war es möglich, die Biofilmmakkumulation digital zu berechnen. Andere Untersuchungsmethoden, wie die bereits erwähnte Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM), sind ihr diesbezüglich unterlegen (Wecke *et al.* 2000), weil hier nur sehr kleine Oberflächenabschnitte beurteilt werden können. Jedoch gehen im Gegensatz dazu auch viele Informationen über die Qualität des Biofilms und dessen Zusammensetzung verloren. Jegliche Aussagen zur Art der Mikroorganismen, deren Vitalität, Pathogenität und Anordnung im Biofilm lassen sich nicht treffen und müssen bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Daher könnte in zukünftigen Untersuchungen zu diesem Thema die Verwendung der CLSM-Darstellung eine wichtige Rolle spielen.

Die Biofilmmakkumulation (prozentualer Anteil der mit Biofilm bedeckten Flächen) auf den REM-Übersichtsaufnahmen wurde mit der Computersoftware ImageJ 1.48 (National Institutes of Health, Maryland, USA) bestimmt und anschließend statistisch ausgewertet. Die Vermessung erfolgte in Anlehnung an die Studien von Papavasileiou (2013) und Chen *et al.* (2015). Das Erkennen und Markieren der Biofilm-bedeckten Flächen auf den REM-Aufnahmen konnte mit Hilfe der beiden digitalen Bildverarbeitungsprogramme Photoshop CS5 (Adobe Systems Incorporated, Kalifornien, USA) und ImageJ 1.48 (National Institutes of Health, Maryland, USA) präzise durchgeführt werden. Bei

dieser Methode können jedoch insbesondere bei zwei Arbeitsschritten potentielle Ungenauigkeiten bzw. Messfehler auftreten. Einerseits könnten bei der Konvertierung der Graustufen der REM-Aufnahmen mittels der Bildbearbeitungssoftware Photoshop CS5 (Adobe Systems Incorporated, Kalifornien, USA) in Falschfarben Biofilm-bedeckte Flächen mit helleren Grauwerten von der Software nicht korrekt erkannt worden sein. Dies wäre dadurch zu erklären, dass für die dunkleren Biofilm-bedeckten Flächen ein gewisser Grenzwert als Graustufe definiert wurde, der möglichst alle Plaqueareale korrekt erfassen sollte. Dennoch kann ein solcher Wert der realen Situation nur sehr nahe kommen, jedoch dieser nie vollständig gerecht werden. Denn Plaqueareale, die diesen Wert möglicherweise unterschritten haben, könnten von der Software als freie Zementfläche erkannt worden sein. Zudem könnten im Umkehrschluss dunklere freie Zementstellen, wie beispielsweise Risse oder Löcher innerhalb der Zementoberfläche, irrtümlicherweise als Biofilm identifiziert worden sein. Eine zweite mögliche Ungenauigkeit könnte bei der manuellen Markierung der zu analysierenden Oberfläche aufgetreten sein. Es wurde versucht die zu untersuchenden Oberflächen so exakt wie möglich zu kennzeichnen. Dazu wurde diese von mehreren Untersuchern unabhängig voneinander durchgeführt und die Ergebnisse verglichen. Allerdings können individuelle Ungenauigkeiten nicht gänzlich ausgeschlossen werden, da diese manuell durchgeführt wurden. Dennoch erwies sich die digitale Auswertung der REM-Übersichtsaufnahmen in der zuvor beschriebenen Form als einfache und zuverlässige Untersuchungsmethode, der nach derzeitigem Stand der Wissenschaft entsprechende überlegene Alternativen fehlen.

Abgesehen von der Untersuchung des gebildeten Biofilms auf den Probekörpern wurden auch die beiden Prüfzemente selbst mittels Energie-Dispersiver-Röntgenanalytik (EDX-Analytik) untersucht. Dieses Untersuchungsverfahren wurde hinzugezogen, da die antimikrobielle Wirkung des im Prüfzement enthaltenen Kupfers von dessen Dosis und Verteilung abhängig ist. Es eignet sich gut zur ortsauffösenden qualitativen und semi-quantitativen Untersuchung der chemischen Zusammensetzung eines bestimmten Materials und wurde bereits oft zur Analyse von dentalen Werkstoffen eingesetzt (Grech *et al.* 2013, Aguiar *et al.* 2012, Kasraei und Azarsina 2012). Mit dieser Methode konnte durch die EDX-Spektren die Zusammensetzung der einzelnen Elemente angegeben werden und die Mengenverhältnisse durch die unterschiedlichen Peaks der Elemente im EDX-Spektrum abgeschätzt werden. Eine genaue quantitative Angabe der einzelnen Mengen war mit diesem Verfahren in der vorliegenden Untersuchung jedoch nicht möglich.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die quantitative Bewertung der Biofilmbildung zeigte zwischen den beiden untersuchten Prüfzementen keine signifikanten Unterschiede auf. Im Mittel waren die Oberflächen der Probekörper zwischen 35-55% mit Biofilm bedeckt. Bei einer zu erwartenden antimikrobiellen Wirkung des kupferhaltigen Prüfzements hätte hier ein deutlicher Unterschied auf den REM-Aufnahmen erkennbar sein müssen. Jedoch wurde beim kupferhaltigen Zement eine zwar statistisch unauffällige, aber dennoch vermehrte Biofilmmakkumulation im Vergleich zum konventionellen Zement festgestellt. Weder bei der separaten Auswertung der Probekörper (geteilt/ganz) noch für das Gesamtkollektiv konnte ein signifikanter Einfluss des Kupfers auf die Biofilmmakkumulation festgestellt werden (siehe Tabellen 3a, 4). Demzufolge konnte ein hemmender Einfluss des Hoffmann's Kupfer Zement auf die bakterielle Biofilmbildung nicht nachgewiesen werden.

In der Literatur gibt es nur vereinzelt Studien, die die antimikrobielle Wirkung eines kupferhaltigen dentalen Befestigungszements untersucht haben. Die Ergebnisse einer ähnlichen klinischen Studie wurden 2003 von Foley und Blackwell (2003a) veröffentlicht. In dieser wurden die kariostatischen bzw. antibakteriellen Eigenschaften eines kupferhaltigen Zinkoxid-Phosphatzements (Black Copper Cement[®], BCC, Vevey, Schweiz) untersucht. Insgesamt nahmen 45 Patienten an der Untersuchung teil, die in drei Gruppen unterteilt wurden. Bei jedem Patienten lagen zwei kariöse Milchmolarläsionen in zwei verschiedenen Quadranten vor, die nach Entnahme einer Probe unterschiedlich versorgt wurden. Die erste Gruppe erhielt in beide Kavitäten eine Glasionomerzementfüllung, wobei eine Läsion zusätzlich mit einer Unterfüllung aus kupferhaltigem Zinkoxid-Phosphatzement versorgt wurde. Die zweite Gruppe erhielt in einer Kavität eine Füllung aus kupferhaltigem Zinkoxid-Phosphatzement, während die andere unversorgt blieb. In einer dritten Gruppe wurde eine Läsion mit einer Glasionomerzementfüllung versorgt und die zweite Läsion ebenfalls nicht gefüllt. 30 Zahnpaare wurden nach einem Monat extrahiert und ausgewertet, 15 Paare erst nach sechs Monaten. Nach einem Monat konnte beim kupferhaltigen Zinkoxid-Phosphatzement eine bedeutende Abnahme der Anzahl anaerober Bakterien sowie speziell der Lactobazillen festgestellt werden, nach sechs Monaten war die signifikante Minderung zusätzlich auch bei *Streptococcus mutans* zu beobachten ($p=0,038$). Bei Glasionomerzement zeigte sich bezüglich der Abnahme der Bakterienzahl kein signifikanter Unterschied zur unversorgten Kontrollgruppe. Die Autoren vermuteten den antimikrobiellen bzw. kariostatischen Effekt durch die Freisetzung von Kupfer- und Zinkionen aus dem Zement. Die Ergebnisse von Foley und Blackwell (2003a) bestätigen die Wirksamkeit eines Kupferadditivs in einem Zinkphosphatzement und weichen daher deutlich von denen der vorliegenden Arbeit ab. Denn in unserer Untersuchung konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede der beiden Prüfzemente im Hinblick auf die Biofilmbildung

festgestellt werden ($p=0.7323$). Allerdings sind die Ergebnisse von Foley und Blackwell (2003a) nicht direkt mit denen unserer Studie vergleichbar, da sie sich in Bezug auf die Methodik und das Studiendesign deutlich unterscheiden. Foley und Blackwell (2003a) beschränkten sich in ihrer Untersuchung vor allem auf die antibakterielle Wirkung des Zements gegenüber kariogenen Keimen (*Streptococcus mutans*, *Laktobazillen*). Die allgemeine Biofilmbildung auf dem Prüfzement (Black Copper Cement[®], Vevey, Schweiz) war nicht von primärem Interesse. Es wurde die antibakterielle Wirkung mittels Bakterienzählung (colony-forming-units) untersucht. In unserer Studie wurde hingegen die Plaqueakkumulation (Biofilmbedeckung in %) bestimmt. Außerdem unterschied sich bei Foley und Blackwell (2003a) der Zement der Kontrollgruppe (Glasionomerezement, Chemfil Superior[®], Dentsply, Konstanz, Deutschland) sehr vom verwendeten Prüfzement (Zinkoxid-Phosphatzement, Black Copper Cement[®], Vevey, Schweiz). Auf Grund deutlicher Unterschiede in der Zusammensetzung der beiden Zemente, konnte die antibakterielle Wirkung dem Kupfer nicht eindeutig zugesprochen werden. Prinzipiell hätten auch andere Inhaltsstoffe des kupferhaltigen Zink-Phosphatzementes, die im Glasionomerezement nicht enthalten sind (z.B Zink), für die antibakterielle Wirkung verantwortlich gewesen sein können. In unserer Studie wurden hingegen zwei Zink-Phosphatzemente verglichen, die sich lediglich durch den Kupferzusatz in ihrer Zusammensetzung unterschieden, so dass viel eher ein Zusammenhang zwischen der antibakteriellen Wirkung und des Kupferzusatzes hergestellt werden konnte.

Im gleichen Jahr veröffentlichten dieselben Autoren Daten zu einer Studie, welche sich mit der Ionenfreisetzung in verschiedenen Restaurationsmaterialien sowie deren Wirkung auf das Wachstum von *Streptococcus mutans* befasste. Die Versuche umfassten unter anderem die Untersuchung des kupferhaltigen Zinkoxid-Phosphatzements (Black Copper Cement[®], Vevey, Schweiz). Dieser zeigte den stärksten hemmenden Einfluss aller Testmaterialien auf das Wachstum des *Streptococcus mutans*. Die Autoren resümierten, dass sowohl die saure Abbindereaktion als auch die Kupfer- und Zinkionenfreisetzung mit der Hemmung des bakteriellen Wachstums assoziiert war (Foley und Blackwell 2003b). Schmalz und Rotgans (1977) überprüften in einer In-vitro-Untersuchung die antibakteriellen Eigenschaften eines kupferhaltigen und konventionellen Zinkoxid-Phosphatzements. Anhand einer Bakteriensuspension des Testkeims *Streptococcus mutans* wurden Dosisreaktionskurven für die Prüfzemente erstellt. Dafür wurden Probekörper unterschiedlicher Größen hergestellt und in die Suspension gelegt. Diese wurden nach drei Minuten, 30 Minuten, einer Stunde bzw. 24 Stunden aus der Suspension entfernt. Die Dosiswirkungskurven zeigten eine signifikante Abhängigkeit des antibakteriellen Effekts von der Oberflächengröße der Probekörper für beide Prüfzemente. Beim kupferhaltigen Zement wurde eine stärkere antibakterielle Wirkung festgestellt. Diese nahm bei beiden Prüfzementen mit der Zeit ab, war jedoch bei den kupferhaltigen weniger stark ausgeprägt. Insgesamt folgerten die Autoren, dass das Kupferadditiv die

antibakterielle Aktivität signifikant steigern.

Die oben genannten Studien belegen einen antibakteriellen Effekt von Kupferzusätzen in Zinkoxid-Phosphatzementen und weichen somit von den Resultaten der vorliegenden Arbeit ab. In der Literatur gibt es zahlreiche Publikationen, die auch die antimikrobiellen Eigenschaften von Kupfer in anderen dentalen Werkstoffen (Amalgamen, Lacken und Kunststoffen) überprüften (Bundy *et al.* 1980, Morrier *et al.* 1998, Gama-Teixeira *et al.* 2007). Dabei fällt auf, dass sich die Ergebnisse bezüglich der antimikrobiellen Wirksamkeit von Kupfer widersprechen. In einer Literaturübersicht von Jakob (2012) über antibakterielle Zusätze in dentalen Füllungswerkstoffen wird dies verdeutlicht. So konnte in einigen klinischen Studien zu konventionellen Amalgamen mit erhöhter Kupferfreisetzung kein signifikanter antibakterieller Effekt festgestellt werden (Wallman-Bjorklund *et al.* 1987, Glasman und Miller 1984). Studien von Bundy *et al.* (1980), Morrier *et al.* (1998) und Netuschil *et al.* (1996) hingegen bestätigen die antimikrobielle Wirkung von Kupfer in Amalgamen. Ein Grund für die unterschiedlichen Daten sind sicherlich die verschiedenen Versuchsabläufe und Analysemethoden, die eine Vergleichbarkeit der Studienresultate erschweren. Abgesehen von grundsätzlich unterschiedlichen In-vivo- bzw. In-vitro-Studienmodellen bestehen auch bei der Angabe der Plaquemenge unter den Autoren deutliche Differenzen. So wurde in einigen Studien die Bakterienzahl als Maß für die Plaquemenge angegeben, während andere Autoren die prozentuale Plaquebedeckung der Oberfläche favorisierten (Wehle 2004). In der vorliegende Arbeit wurde sich auf die Plaqueakkumulation (Biofilmbedeckung in %) bezogen. Diese Methode ist gut geeignet, um allgemeine Aussagen zur Quantität des gebildeten Biofilms machen zu können, und so indirekt die hemmende Wirkung des Kupfers auf die Biofilmbildung beurteilen zu können. Hier lassen sich signifikante, also klinisch relevante, Unterschiede ausreichend darstellen. Von Vorteil ist dabei, dass alle Bestandteile des gebildeten Biofilms berücksichtigt werden (verschiedene Mikroorganismen, extrazelluläre polymere Substanzen). Aussagen zur Vitalität und Pathogenität der Mikroorganismen im Biofilm sind allerdings nicht möglich mit dieser Methode. In diesem Fall wäre die Angabe der Bakterienzahl besser geeignet gewesen. Als weiterer Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse in den oben genannten Studien wird ein variabler Kupfergehalt sowie unterschiedliche Kupferionenfreisetzungen aus den Materialien diskutiert (Jakob 2012). Dabei scheint Letzteres einen größeren Einfluss auf die antibakterielle Wirkung zu haben. In einer Untersuchung von Hans *et al.* (2013) wurde ebenfalls die Freisetzung von verschiedenen Kupferionen aus elementarem Kupfer analysiert und auf deren antimikrobielle Eigenschaften untersucht. Es wurde festgestellt, dass bei elementarem Kupfer im wässrigen Milieu eine vermehrte CuO-Freisetzung vorläge. In trockener Umgebung hingegen käme es zu einer vermehrten Cu₂O-Freisetzung. Bezüglich der antibakteriellen Eigenschaften wurde Cu₂O deutlich potenter als CuO eingeschätzt. Die Ursache für die unterschiedlich starke antimikrobielle Wirkung der beiden

Verbindungen wurden durch die zuvor entstandenen Zellwandschäden der Bakterien, beim direkten Kontakt mit Kupfer in trockener Umgebung erklärt. Dadurch könnten die toxischen Cu_2O -Ionen leichter in das Zellinnere eindringen, und dort die bakterielle DNA schädigen. In wässriger Lösung käme es zu keinem direkten Kontakt zwischen Kupfer und Zellwand, so dass die Ionen zunächst die Zellwand durchdringen müssten. In einer Untersuchung von Mathews *et al.* (2013) wurde dieser antibakterielle Mechanismus des Kupfers ebenfalls untersucht. Auch hier zeigte sich, dass zunächst ein direkter Kontakt der Bakterien mit der Kupferoberfläche nötig sei, um einen Zellwandschaden zu verursachen. Im Anschluss käme es dann, durch das Eindringen der Kupfer-Ionen in die Zellen und der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, zu einer irreversiblen Schädigung der DNA und weiterer verschiedener Zellbestandteile. Es gibt weitere Studien die ebenfalls zwischen einzelnen Kupferverbindungen unterschieden. Kupfer-I-Iodid wurde in diesem Zusammenhang als relativ gering antibakteriell wirksames Agens beschrieben (Knappwost 1953), während Kupfer(II)-Oxalat und Cuprioxyd (Kupfer(II)-Oxid) als deutlich effektiver befunden wurden (Jakob 2012). Die Erkenntnisse dieser Studien, liefern eine Erklärung für die ausbleibende antimikrobielle Wirkung des kupferhaltigen Zements in der vorliegenden Untersuchung. Im kupferhaltigen Prüfzement wurde entsprechend den Herstellerangaben Kupferthiocyanat (CuSCN) verwendet. Die Verwendung von elementarem Kupfer ist nicht dokumentiert. Demnach war ein direkter Kontakt mit elementarem Kupfer auf der Oberfläche der Probekörper nicht möglich, wodurch ein damit verbundener Zellwandschaden wahrscheinlich ausblieb. Es ist zudem anzunehmen, dass die in Lösung gegangenen Kupferionen nicht ausreichend in die Zellen eindringen konnten, um intrazellulär eine toxische Wirkung zu entwickeln. Des Weiteren ist von einer sehr geringen Menge an Kupfer im Prüfzement auszugehen. Es werden keine genauen Mengenangaben vom Hersteller bezüglich der enthaltenen Kupfermenge gemacht. Allerdings werden die anderen Bestandteile des Zementpulveranteils mit Zinkoxid 80-90%, Magnesiumoxid 5-10% und Calciumfluorid 0-5% angegeben, so dass der Anteil des Kupferthiocyanat $< 1\%$ angenommen werden kann. Diese Annahme wurde auch durch die Ergebnisse der durchgeführten EDX-Analytik in unserer Untersuchung bestätigt.

Abgesehen von den zwei Prüfzementen bzw. dem Kupfer als Einflussfaktor auf die Plaqueakkumulation wurden noch weitere mögliche Einflussparameter im Allgemeinen Linearen Modell getestet. Untersucht wurden im diesem Zusammenhang das Alter und Geschlecht der Probanden. Hier konnte in der Probandengruppe mit den ganzen Probekörpern ein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf die Plaqueakkumulation festgestellt werden. Außerdem zeigte sich sowohl für die ganzen als auch die geteilten Probekörper ein signifikanter synergistischer Einfluss des Probandenalters und -geschlechts auf die Biofilmmakkumulation, so dass bei jüngeren weiblichen Probanden allgemein eine geringere Plaquemenge vorlag. Im Gesamtkollektiv, das heißt bei der Betrachtung

aller Probekörper, lagen hingegen alle Werte der getesteten Einflussparameter oberhalb des Signifikanzniveaus von 5%. Die Gründe für den signifikanten Einfluss des Geschlechts auf die Plaqueakkumulation in der Gruppe mit den ganzen Probekörpern zu nennen, erweist sich als schwierig. In der Literatur gibt es Publikationen, die von einer vermehrten Plaqueakkumulation bei Männern im Vergleich zu Frauen berichten (Micheelis 1991, Micheelis 1993). Als Hauptursache werden dort die schlechteren Mundhygiene- und Ernährungsgewohnheiten bei Männern aufgeführt. Dadurch, dass bei allen Probanden vor dem Tragen der Trägerschiene eine klinische Voruntersuchung durchgeführt wurde und die Mundgesundheit mittels API und SBI bestimmt wurde, lagen zum Untersuchungsbeginn bei allen Probanden annähernd gleiche Ausgangsbedingungen vor. Zudem erfolgte das Tragen der Schiene nur über einen kurzen Zeitraum von 12 Stunden und die Probanden wurden angewiesen die Schiene zu den Mahlzeiten zu entfernen. Daher können sowohl eine schlechtere Mundhygiene als auch Ernährungsgewohnheiten der männlichen Probanden in der vorliegenden Arbeit weitestgehend ausgeschlossen werden. Eine andere Annahme wäre, dass bei Männern grundsätzlich eine vermehrte bzw. schnellere orale Biofilmbildung vorläge als bei Frauen. Diese Hypothese widerspricht allerdings der Mehrzahl an Untersuchungen in der Literatur (Lukacs und Largaespada 2006). Demnach läge bei Frauen ein hormonell-bedingt höheres Kariesrisiko vor als bei Männern. Zwar ist das Kariesrisiko nicht mit der Biofilmbildung in der Mundhöhle gleichzusetzen, dennoch gibt es gemeinsame Einflussfaktoren, die sowohl für die Biofilmbildung als auch das Kariesrisiko von Bedeutung sind. Dazu gehören beispielsweise die Speichelflussrate und -zusammensetzung. Untersuchungen haben gezeigt, dass Frauen eine signifikant niedrigere Speichelflussrate als Männer haben (Percival *et al.* 1994, Eliasson *et al.* 2006). Da der Speichel wichtige Funktionen wie mechanische Reinigung, das Puffern von Säuren, Remineralisation sowie antibakterielle Eigenschaften besitzt (Ferraro und Vieira 2010), sind diese protektiven Eigenschaften auf Grund des geringeren Speichelflusses bei Frauen herabgesetzt. In unserer Untersuchung wurden allerdings keine Unterschiede bezüglich der Speichelflussrate bei den weiblichen und männlichen Probanden festgestellt. Auch die Zusammensetzung des Speichels gerade hinsichtlich der antibakteriellen Eigenschaften ist bei Frauen anders als bei Männern. Eliasson *et al.* (2006) untersuchten die IgA-Konzentrationen im Speichel von Männern und Frauen und stellten bei den männlichen Studienteilnehmern höhere IgA-Konzentrationen fest. Fasst man diese Erkenntnisse zusammen, so lässt sich die Ursache für eine erhöhte Biofilmbildung der männlichen Probanden in der Gruppe mit ganzen Probekörpern nicht eindeutig klären. Da die Ergebnisse des Allgemeinen Linearen Modells diesen Einfluss des Geschlechts weder für die geteilten Probekörper noch für das Gesamtkollektiv bestätigten und auch die Anzahl der Probanden mit 20 relativ gering war, sollte dieser Zusammenhang nicht fehlinterpretiert werden.

Bei der Auswertung der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung fiel auf, dass auf

den geteilten Probekörpern im Mittel eine 7-10% höhere Biofilmakkumulation vorlag als auf den ganzen Probekörpern (siehe Tabelle 2). Eine Erklärung dafür lässt sich durch mögliche Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit der Probekörper geben. Bei der Herstellung der geteilten Probekörper wurden die zwei Prüfzemente durch ein zweizeitiges Ausgießen und Aushärten der Silikongußform miteinander verbunden. Bei diesem Prozess entstand zunächst eine Zementfuge zwischen den beiden Prüfzementen, die im weiteren Verarbeitungsprozess durch das Polieren der Probekörperoberfläche entfernt werden sollte. Ein vollständiges Entfernen dieser Zementfuge, um eine gleichwertig homogene Oberfläche wie bei den ganzen Probekörpern herzustellen, ist allerdings nicht möglich. Daher ist anzunehmen, dass die entstandene Zementfuge als Prädilektionsstelle für Bakterien und Plaque fungierte, so dass in diesen Bereichen eine vergleichsweise höhere Biofilmakkumulation gemessen wurde.

Die Ergebnisse der qualitativen Untersuchung der Biofilme auf den beiden Prüfzementen (Konventionell/Kupfer) anhand der REM-Aufnahmen mit bis zu 12000-facher Vergrößerung wiesen bezüglich der Biofilmdichte und Morphologie keine Unterschiede auf. Auf allen Zementproben stellte sich der Biofilm als heterogener Belag dar, in dem Stäbchen- sowie Kokken-Bakterien und Matrixbestandteile nachgewiesen werden konnten. Weitere Angaben hinsichtlich der verschiedenen bakteriellen Morphotypen sowie genauere Angaben zu Biofilmdicke konnten, wie bereits schon in Abschnitt 5.1 beschrieben, auf Grund einer fehlenden Vorbehandlung der Proben nicht gemacht werden. In der Literatur gibt es Publikationen, die anhand von REM-Untersuchungen genauere Beschreibungen der Morphotypen vorgenommen haben. Steiner (2012) untersuchte beispielsweise die antibakterielle Wirkung verschiedener Mundspüllösungen (Chlorhexamed Forte[®] 0,2 %, Listerine[®], Hexoral[®] und Meridol[®]) an in vitro gewachsenen Multispeziesbiofilmen. Dafür wurden die Testlösungen auf die auf speziellen Thermanox-Deckgläsern kultivierten Multispeziesbiofilme aufgebracht und im Anschluss die Reduktion bzw. morphologischen Veränderungen der Mikroorganismen unter dem REM dokumentiert. Die Auswertung der Biofilme auf den Trägern ergab ein heterogenes Bild in Bezug auf deren Zusammensetzung und relative Häufigkeit der Bakterien. Insgesamt wurde bei den mit den Mundspüllösung behandelten Biofilmen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollbiofilmen deutlich geringere Gesamtbakterienmengen gemessen, wobei durch Chlorhexamed Forte[®] 0,2 % die deutlichste Reduktion der Bakterienmenge festgestellt wurde. Bei dieser Studie stellte sich die Rasterelektronenmikroskopie als geeignete Methode zur Darstellung der Bakterien und einzelnen Morphotypen dar. Dabei war es auch möglich, Deformitäten und veränderte Oberflächen der Bakterien mittels des REM zu beschreiben.

Die Ergebnisse der EDX-Analyse zeigten für beide Prüfzemente annähernd gleiche elementare Zusammensetzungen. Ihre beiden Spektren wiesen deutliche „Peaks“ für

Zink, Kohlenstoff, Sauerstoff und Magnesium auf. Abgesehen vom Kohlenstoff entsprechen diese Angaben weitestgehend denen des Herstellers (Hoffmann Dental Manufaktur GmbH, Deutschland) (siehe Abschnitt 3.5). Dabei war der hohe Anteil an Kohlenstoff durch die kohlenstoffhaltige Trägerfolie zu erklären. In einer Untersuchung von Prause (2010), bei der an verschiedenen ausgewählten zahnärztlichen Materialien eine EDX-Analyse durchgeführt wurde, waren unter anderem zwei Zinkoxid-Phosphatzemente anderer Hersteller (Harvard Zement, Harvard Dental International GmbH, Deutschland und Fleck's Zement Keystone Industries, USA) untersucht worden. Ein Vergleich der EDX-Spektren mit denen dieser Studie zeigte sehr ähnliche für Zinkoxid-Phosphatzemente charakteristische elementare Zusammensetzungen. Bei der Analyse des Hoffmann's Kupfer Cement fiel jedoch auf, dass ein zu erwartender Peak für Kupfer im EDX-Spektrum fehlte. Daher konnte zumindest auf dem zu untersuchenden Bereich in der REM-Aufnahme kein Kupfer festgestellt werden. Auch das Element-Mapping für Kupfer der gleichen REM-Aufnahme zeigte nur vereinzelt Partikel mit einer erhöhten Kupferanreicherung. Schließlich weisen diese Ergebnisse auf eine sehr geringe Kupferanreicherung im Hofmann's Cupfer Cement hin. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die untersuchten Ausschnitte der REM-Aufnahmen nur einen sehr kleinen Teil der Gesamtprobe repräsentieren und daher deren Ergebnisse lediglich einen Hinweis auf die tatsächliche elementare Zusammensetzung aller Probenbereiche geben können.

5.3 Schlussfolgerung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die antimikrobiellen Eigenschaften eines Kupferadditivs in einem dentalen Befestigungszement anhand eines realistischen in-vivo-Biofilmodells zu überprüfen. Obwohl die antibakterielle Wirkung von Kupfer in der Literatur bereits von zahlreichen Autoren beschrieben wurde, konnten die Ergebnisse dieser Untersuchung einen hemmenden Einfluss des Kupfers auf die bakterielle Biofilmbildung nicht bestätigen. Die Ergebnisse der EDX-Analytik wiesen zudem auf einen sehr geringen Kupfergehalt im Prüfzement hin. Jedoch konnten keine genauen quantitativen Angaben zur Kupfermenge im Prüfzement sowie eine Dosis-Wirkungs-Beziehung gemacht werden. Des Weiteren war es nicht möglich, Aussagen zur Vitalität der Mikroorganismen zu machen, so dass diesbezüglich weitere Untersuchungen folgen müssen. Es zeigt sich jedoch bereits jetzt, dass ein -wie vom Hersteller propagierter- antimikrobieller Effekt nicht zu beobachten war. Deshalb erscheint die Verwendung von Kupfer in einem Zinkoxid-Phosphatzement als nicht sinnvoll.

6 Zusammenfassung

Die Akkumulation von dentalen Biofilmen auf der Oberfläche von Biomaterialien (Kronen, Implantaten, Füllungsmaterialien, Befestigungszementen) kann zur Bildung von Kandidosen, Sekundärkaries und parodontalen bzw. periimplantären Entzündungen führen und somit ihren Langzeiterfolg limitieren. Materialien mit anti-adhäsiven oder antimikrobiellen Eigenschaften könnten das Risiko solcher Erkrankungen reduzieren und damit die Lebensdauer zahnärztlicher Konstruktionen erhöhen. Ziel dieser Arbeit war es, die antimikrobielle Wirkung von Kupfer in einem bereits klinisch etablierten kupferhaltigen Zinkoxid-Phosphatzement (Hoffmann´s Kupfer Cement) zu überprüfen. Hierzu wurde anhand eines realistischen In-situ-Modells die mikrobielle Besiedlung des kupferhaltigen (Hoffmann´s Kupfer Cement) mit einem konventionellen Zinkoxid-Phosphatzement (Hoffmann´s Cement normalhärtend) verglichen.

An dieser klinischen Studie nahmen 20 Probanden (10 Frauen und 10 Männer, Durchschnittsalter 26 Jahre) teil. Das Probandenkollektiv wurde in zwei Gruppen mit jeweils 10 Probanden (5 Männer, 5 Frauen) aufgeteilt. Eine Gruppe erhielt geteilte Probekörper, deren eine Hälfte aus kupferhaltigem und die andere aus konventionellem Zinkoxid-Phosphatzement gefertigt waren. Die andere Gruppe wurde mit Probekörpern vollständig aus jeweils kupferhaltigem bzw. konventionellem Zinkphosphat-Zement versorgt. Jeder Proband erhielt 4 Zementproben, so dass insgesamt 40 geteilte und 40 ganze Probekörper in situ waren. Als Trägersystem dienten individuell hergestellte Oberkiefer-Tiefziehschienen, in die die Probekörper bukkal in der Prämolaren-/Molarenregion integriert wurden. Die Tragedauer betrug 12 Stunden. Die Zementproben wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht und die prozentuale Biofilmakkumulation auf der Probekörperoberfläche mit der Bildverarbeitungssoftware ImageJ 1.48 (National Institutes of Health, Maryland, USA) vermessen. Des Weiteren wurde anhand einer EDX-Analytik die elementare Zusammensetzung beider Prüfzemente untersucht. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels eines Allgemeinen Linearen Modells, in dem abgesehen von der Zementart auch das Alter und Geschlecht der Probanden als mögliche Einflussfaktoren auf die Biofilmakkumulation getestet wurden.

In der vorliegenden Untersuchung waren die Oberflächen der Probekörper im Mittel zwischen 35-55% mit Biofilm bedeckt. Bezüglich der Biofilmakkumulation konnte sowohl in der Gruppe mit den ganzen als auch den geteilten Probekörpern kein signifikan-

ter Unterschied zwischen den beiden Prüfzementen festgestellt werden. Das Alter und Geschlecht der Probanden schien jedoch einen signifikanten Einfluss auf die Biofilmmak-
akkumulation zu haben, so dass bei jüngeren weiblichen Probanden unabhängig vom Prüfzement die niedrigste Plaqueakkumulation gemessen wurde. Die EDX-Spektren der beiden Prüfzemente zeigten im festen Zementanteil die für Zinkoxid-Phosphatzement typischen Hauptelemente Zink, Sauerstoff und Magnesium. Ein zu erwartender Kupferanteil konnte anhand der EDX-Spektren in keinem der Prüfzemente ausreichend nachgewiesen werden. Fasst man die Ergebnisse dieser klinischen Untersuchung zusammen, so konnte die antimikrobielle Wirkung von Kupfers in einem Zinkoxid-Phosphatzement nicht bestätigt werden.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1 Schematische Darstellung der Biolmbildung in fünf Stadien | 6 |
| 2 Raum-Zeit-Modell der oralen bakteriellen Kolonisation von Kolenbrander <i>et al.</i> 2002 | 7 |
| 3 Einteilung der Dentalzemente in ihre Hauptbestandteile (Pawlig 2001) | 10 |
| 4 REM-Aufnahme eines dentalen Biolms (Gibbons und van Houte 1973). | 16 |
| 5 Beispiel einer Aufnahme eines Biolms mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (Donlan und Costerton 2002) | 17 |
| 6 Vitaluoreszenzmikroskopische-Aufnahme (Gosau <i>et al.</i> 2013) | 18 |
| 7 Prüfzemente | 22 |
| 8 Probekörper | 23 |
| 9 Gefräste Schablone aus Plexiglas | 24 |
| 10 Silikongußform | 24 |
| 11 Herstellung der Trägerschiene | 25 |
| 12 Fertiggestellte Schiene mit Probekörpern auf dem Modell | 26 |
| 13 Trägerschiene mit Probekörpern in situ | 26 |
| 14 Rasterelektronenmikroskop (Quanta FEG 200, FEI Company, USA) | 27 |
| 15 Vergleich biolmfreier/belegter Probekörper | 28 |
| 16 Schematisches Atommodell zur Erklärung der Entstehung der Röntgenemission | 29 |
| 17 Exemplarische Darstellung eines EDX-Spektrums | 30 |
| 18 Beispiel eines EDX-Mapping: Verteilung zweier verschiedener Elemente | 30 |
| 19 Falschfarbenkonvertierung | 31 |
| 20 Verteilung des Parameters Plaque (in %) bei Männern und Frauen auf geteilten Probekörpern mit kupferhaltigem und konventionellem Zement | 35 |

| | |
|--|----|
| 21 Verteilung des Parameters Plaque bei Männern und Frauen auf ganzen Probekörpern mit kupferhaltigem und konventionellem Zement | 36 |
| 22 Verteilung des Parameters Plaque (in %) für Männer und Frauen auf geteilten Probekörpern unabhängig vom Prüfzement | 36 |
| 23 Verteilung des Parameters Plaque (in %) für Männer und Frauen auf den ganzen Probekörpern unabhängig vom Prüfzement | 37 |
| 24 Verteilung des Parameters Plaque (in %) bei Männern und Frauen im Gesamtkollektiv auf kupferhaltigem und konventionellem Zement | 39 |
| 25 Verteilung des Parameters Plaque (in %) für Männer und Frauen im Gesamtkollektiv | 39 |
| 26 REM-Aufnahme (2589-fache Vergrößerung): Bakterienaggregation, eingebettet in einer Matrix aus extrazellulären Polysacchariden | 41 |
| 27 REM-Aufnahme (11242-fach): Bakterienaggregation, vornehmlich aus Kokken- und Stäbchen | 41 |
| 28 REM-Aufnahme (1000-fach): Homann's Cement normalhärtend Pulver | 42 |
| 29 REM-Aufnahme (1000-fache Vergrößerung): Homann's Kupfer Cement | 43 |
| 30 EDX-Spektrum der Flächenanalyse: Homann's Cement normalhärtend | 43 |
| 31 EDX-Spektrum der Flächenanalyse: Homann's Kupfer Cement | 44 |
| 32 Der Abbildung 28 zugehöriges EDX-Mapping für das Element Kupfer | 44 |
| 33 Der Abbildung 29 zugehöriges EDX-Mapping für das Element Kupfer | 45 |
| 34 Punktanalyse eines Zementpartikels aus Abbildung 29 | 45 |
| 35 Punktanalyse eines Zementpartikels aus Abbildung 29 | 46 |

7.2 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1 Verteilung der Mittelwerte \pm Standardabweichungen des Probandenalters abhängig vom Geschlecht innerhalb der ganzen und geteilten Probekörper | 33 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| 2 Mittelwert \pm Standardabweichung differenziert nach Prüfzement, Geschlecht, geteilten und ganzen Probekörpern sowie für das Gesamtkollektiv | 35 |
| 3 Ergebnisse des allgemeinen linearen Modells: Einfluss (p-Werte) des Alters, Prüfzements und Geschlechts sowie deren Wechselwirkungen auf den Parameter Plaque für geteilte und ganze Probekörper | 38 |
| 4 Ergebnisse des allgemeinen linearen Modells: Einfluss (p-Werte) des Alters, Prüfzements und Geschlechts sowie deren Wechselwirkungen auf den Parameter Plaque für das Gesamtkollektiv | 40 |

8 Literaturverzeichnis

Agarwala M, Choudhury B, Yadav RNS (2014): Comparative study of antibiofilm activity of copper oxide and iron oxide nanoparticles against multidrug resistant biofilm forming uropathogens. *Indian J Microbiol* 54, 365–368

Aguiar TR, Di Francescantonio M, Bedran-Russo AK, Giannini M (2012): Inorganic composition and filler particles morphology of conventional and self-adhesive resin cements by SEM/EDX. *Microsc Res Tech* 75, 1348–1352

Ahn SJ, Wen ZT, Burne RA (2007): Effects of oxygen on virulence traits of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 189, 8519-27

Al-Ahmad A, Roth D, Wolkewitz M, Wiedmann-Al-Ahmad M, Follo M, Ratka-Kruger P (2010): Change in diet and oral hygiene over an 8-week period: effects on oral health and oral biofilm. *Clin Oral Investig* 14, 391–396

Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahmad M, Fackler A, Follo M, Hellwig E, Bächle M, Hannig C, Han J, Wolkewitz M, Kohal R (2013): In vivo study of the initial bacterial adhesion on different implant materials. *Arch. Oral Biol* 58, 1139–1147

Albuquerque, Maria T P, Valera MC, Moreira CS, Bresciani E, de Melo RM, Bottino MC (2015): Effects of Ciprofloxacin-containing Scaffolds on *Enterococcus faecalis* Biofilms. *J Endod* 41, 710-714

Arweiler NB, Hellwig E, Sculean A, Hein N, Auschill TM (2004): Individual vitality pattern of in situ dental biofilms at different locations in the oral cavity. *Caries Res* 38, 442-447

Auschill TM, Arweiler NB, Netuschil L, Brex M, Reich E, Sculean A, Arweiler NB (2001): Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol* 46, 471–476

Auschill TM, Arweiler NB, Brex M, Reich E, Sculean A, Netuschil L (2002): The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *Eur J Oral Sci* 110, 48–53

Auschill TM, Hellwig E, Sculean A, Hein N, Arweiler NB (2004): Impact of the intraoral location on the rate of biofilm growth. *Clin Oral Investig* 8, 97-101

- Auschill TM, Hein N, Hellwig E, Follo M, Sculean A, Arweiler NB (2005): Effect of two antimicrobial agents on early in situ biofilm formation. *J Clin Periodontol* 32, 147-152
- Baier RE, Glantz PO (1978): Characterization of oral in vivo films formed on different types of solid surfaces. *Acta Odontol Scand* 36, 289-301
- Beeton ML, Aldrich-Wright JR, Bolhuis A (2014): The antimicrobial and antibiofilm activities of copper(II) complexes. *J Inorg Biochem* 140, 167-172
- Bjarnsholt T, Alhede M, Alhede M, Eickhardt-Sørensen SR, Moser C, Kühl M, Jensen PO, Høiby N (2013): The in vivo biofilm. *Trends Microbiol* 21, 466-474
- Bleichert P, Espírito Santo C, Hanczaruk M, Meyer H, Grass G (2014): Inactivation of bacterial and viral biothreat agents on metallic copper surfaces. *Biometals* 27, 1179-1189
- Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ (1999): Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods. *FEMS Microbiol Rev* 23, 179-230.
- Brex M, Rönström A, Theilade J, Attström R (1981): Early formation of dental plaque on plastic films. 2. Electron microscopic observations. *J Periodontal Res* 16, 213-227
- Brex M, Winkler M, Netuschil L (1994): Human dental plaque formation on plastic films. A quantitative SEM study. *J West Soc Periodontol Periodontal Abstr* 42, 77-80
- Breustedt A: Lehrmaterialien für das Selbststudium auf dem Gebiet der stomatologischen Werkstoffkunde. Humboldt-Universität, Berlin 1964
- Buchmann G, Klimm W, Geurtsen W (1992): Der Füllungsrandspalt und dessen mikroökologische Bedeutung. *Dtsch Zahnärztl Z* 47, 188- 91
- Bundy KJ, Butler MF, Hochman RF (1980): An investigation of the bacteriostatic properties of pure metals. *J Biomed Mater Res* 14, 653-663
- Bürgers R, Eidt A, Frankenberger R, Rosentritt M, Schweikl H, Handel G, Hahnel S (2009): The anti-adherence activity and bactericidal effect of microparticulate silver additives in composite resin materials. *Arch Oral Biol* 54, 595-601
- Bürgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M (2010): In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 21, 156-164
- Busscher H, Weerkamp AH (1987) : Specific and nonspecific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiol Rev* 46, 165-173.

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.

Casey AL, Adams D, Karpanen TJ, Lambert PA, Cookson BD, Nightingale P, Miruzenko L, Shillam R, Christian P, Elliott TS (2010): Role of copper in reducing hospital environment contamination. *J Hosp Infect* 74, 72–77

(1983): Clinical applications of biomaterials. National Institutes of Health Consensus Development. *Natl Inst Health Consens Dev Conf Summ* 4, 10

Chen EW, Carey AJ, Ulett GC, George R (2015): Characterisation of the efficacy of endodontic medications using a three-dimensional fluorescent tooth model: An ex vivo study. *Aust Endod J* 41, 88–96

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

Costerton JW (1999): Introduction to biofilm. *International journal of antimicrobial agents* 11, 217-21

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, 711-45

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999): Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-22.

Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR (2005): Biofilm in implant infections: Its production and regulation. *Int J Artif Organs* 28, 1062–1068

Daugela P, Oziunas R, Zekonis G (2008): Antibacterial potential of contemporary dental luting cements. *Stomatologija* 10, 16–21

Donlan RM, Costerton JW (2002): Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15, 167–193

Drake DR, Grigsby W, Cardenzana A, Dunkerson D (1993): Synergistic, growth-inhibitory effects of chlorhexidine and copper combinations on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus*, and *Actinomyces naeslundii*. *J Dent Res* 72, 524–528

Du X, Huang X, Huang C, Frencken JE, Yang T (2012): Inhibition of early biofilm formation by glass-ionomer incorporated with chlorhexidine in vivo: a pilot study. *Aust Dent J* 57, 58–64

- Duguid R (1983): Copper-inhibition of the growth of oral streptococci and actinomyces. *Biomaterials* 4, 225–227
- Dupuis V, Laviolle O, Potin-Gautier M, Castetbon A, Moya F (1992): Solubility and disintegration of zinc phosphate cement. *Biomaterials* 13, 467–470
- Eckelmann HPE: Plaquebildung auf verschiedenen Dentalmaterialien in vivo. Zahnmed. Diss. Tübingen 1995
- Elias S, Banin E (2012): Multi-species biofilms: Living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev* 36, 990–1004
- Eliasson L, Birkhed D, Osterberg T, Carlen A (2006): Minor salivary gland secretion rates and immunoglobulin A in adults and the elderly. *Eur J Oral Sci* 114, 494–499
- Ellenrieder M, Haenle M, Lenz R, Bader R, Mittelmeier W (2011): Titanium-copper-nitride coated spacers for two-stage revision of infected total hip endoprostheses. *GMS Krankenhhyg Interdiszip* 6, Doc16
- Faust J : Untersuchung der Biofilmbildung auf unterschiedlichen oralen Implantatmaterialien in situ. Zahnmed. Diss. Freiburg 2010
- Ferraro M, Vieira AR (2010): Explaining gender differences in caries: a multifactorial approach to a multifactorial disease. *Int J Dent* 2010, 649-643
- Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ (2007): The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol* 189, 7945
- 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
- Friedman MT, Barber PM, Mordan NJ, Newman HN (1992): The "plaque-free zone" in health and disease: a scanning electron microscope study. *J Periodontol* 63, 890–896
- Gama-Teixeira A, Simionato MR, Elian SN, Sobral MA, de Cerqueira 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
- Gibbons RJ, van Houte J (1973): On the formation of dental plaques. *J Periodontol* 44, 347–360

Glassman MD, Miller IJ (1984): Antibacterial properties of one conventional and three high-copper dental amalgams. *J Prosthet Dent* 52, 199- 203

Goldstein J, Newbury DE, Joy DC, Lyman CE, Echlin P, Lifshin E, Sawyer L, Michael JR: Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis, 3. Auflage; Springer Verlag, New York 2003

Gorodovsky S, Zidan O (1992): Retentive strength, disintegration, and marginal quality of luting cements. *J Prosthet Dent* 68, 269–274

Gosau M, Hahnel S, Schwarz F, Gerlach T, Reichert TE, Bürgers R (2010): Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on in vivo human oral biofilm. *Clin Oral Implants Res* 21, 866–872

Gosau M, Bürgers R, Vollkommer T, Holzmann T, Prantl L (2013): Effectiveness of antibacterial copper additives in silicone implants. *J Biomater Appl* 28, 187–198

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

Grech L, Mallia B, Camilleri J (2013): Characterization of set Intermediate Restorative Material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials. *Int Endod J* 46, 632–641

Grötz KA, Duschner H, Götz H, Wagner W (1996): Histomographie gesunden, menschlichen Zahnschmelzes permanenter Zähne im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM). *Acta Med Dent Helv* 1, 259-263

Grund P, Raab WH (1990): Pulp toxicity of luting cements. *Dtsch Zahnärztl Z* 45, 736–739

Hachem R, Reitzel R, Borne A, Jiang Y, Tinkey P, Uthamanthil R, Chandra J, Ghanoum M, Raad I (2009): Novel antiseptic urinary catheters for prevention of urinary tract infections: correlation of in vivo and in vitro test results. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 5145–5149

Hall-Stoodley L, Stoodley P (2002): Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr Opin Biotechnol* 13, 228-233

Hannig M (1997): Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. *Eur J Oral Sci* 105, 422–433

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

Hannig M, Hannig C (2007): Does a biofilm free of bacteria, exist in situ? *J Parodontol Implantol Orale* 26, 187-200

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

Harraghy N, Seiler S, Jacobs K, Hannig M, Menger MD, Herrmann M (2006): Advances in in vitro and in vivo models for studying the staphylococcal factors involved in implant infections. *Int J Artif Organs* 29, 368–378

Hellwig E, Klimek J, Attin T: Einführung in die Zahnerhaltung, 4. Auflage; Elsevier, Urban und Fischer, München 2007

Herles S, Olsen S, Aitto J, Gaar A, (1994): Chemostat flow cell system: an in vitro model for the evaluation of antiplaque agents. *J Dent Res* 73, 1748-1755

Hiraishi N, Kitasako Y, Nikaido T, Foxton RM, Tagami J, Nomura S (2003): Acidity of conventional luting cements and their diffusion through bovine dentine. *Int Endod J* 36, 622–628

Hogg JS, Hu FZ, Janto B, Boissy R, Hayes J, Keefe R, Post JC, Ehrlich GD (2007): Characterization and modeling of the *Haemophilus influenzae* core and supragenomes based on the complete genomic sequences of Rd and 12 clinical nontypeable strains. *Genome Biol* 8, R103

Hope CK, Wilson M (2004): Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1461-1468

Jacqueline C, Caillon J (2014): Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother* 69 Suppl 1, i37-40

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

Jentsch H, Hombach A, Beetke E, Jonas L (2002): Quantitative transmission electron microscopic study of dental plaque—an in vivo study with different mouthrinses. *Ultrastruct Pathol* 26, 309–313

Jentsch H, Eckert F, Eschrich K, Stratul S, Kneist S (2014): Antibacterial action of Chlorhexidine/thymol containing varnishes in vitro and in vivo. *Int J Dent Hyg* 12, 168–173

Kappert HF, Eichner K, Borchers L: Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung, 7. Auflage; Georg Thieme, Stuttgart 2000

Kasraei S, Azarsina M (2012): Addition of silver nanoparticles reduces the wettability of methacrylate and silorane-based composites. *Braz Oral Res* 26, 505–510

Knappwost A (1953): Über die das Fluor ergänzende Wirkung des Kupfers in der lokalen Kariesprophylaxe. *Dtsch Zahnarztl Z* 8, 611-619

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

Kolenbrander PE, London J (1993): Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 175, 3247-52.

Kolenbrander PE, Ganeshkumar N, Cassels FJ, Hughes CV (1993): Coaggregation: Specific adherence among human oral plaque bacteria. *FASEB J* 7, 406–413

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

Komrska J, Satava V (1970): Chemical processes during the setting of zinc-phosphate cements. *Dtsch Zahnarztl Z* 25, 914–921

Korsch M, Walther W, Marten S, Obst U (2014): Microbial analysis of biofilms on cement surfaces: An investigation in cement-associated peri-implantitis. *Journal of applied biomaterials & functional materials* 12, 70–80

Kowalczyk D, Ginalska G, Piersiak T, Miazga-Karska M (2012): Prevention of biofilm formation on urinary catheters: comparison of the sparfloxacin-treated long-term antimicrobial catheters with silver-coated ones. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 100, 1874–1882

Krekeler G, Pelz K, Rediker M (1990): Die Plaqueanhaftung an verschiedenen Implantatwerkstoffen. *Z Zahnarztl Implantol* VI, 191-194

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

Lam JS, La MacDonald, Lam MY, Duchesne LG, Southam GG (1987): Production and characterization of monoclonal antibodies against serotype strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 55, 1051–1057

Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE (1991): Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* 20, 6558-6567

- 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, Willson CJ, Shirtliff ME, Hassett DJ, Parsek, Jeffers AK (2005): The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *J Immunol* 175, 7512–7518
- Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG (2000): Saliva and dental pellicle—a review. *Adv Dent Res* 14, 22-8
- Lewandowski Z, Altobelli S A, Majors P D, Fukushima E (1992): NMR imaging of hydrodynamics near microbially colonized surfaces. *Wat Sci Tech* 26, 577
- Lewinstein I, Matalon S, Slutzkey S, Weiss EI (2005): Antibacterial properties of aged dental cements evaluated by direct-contact and agar diffusion tests. *The Journal of prosthetic dentistry* 93, 364–371
- 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 Z, Nair SK (2012): Quorum sensing: How bacteria can coordinate activity and synchronize their response to external signals? *Protein science a publication of the Protein Society* 21, 1403–1417
- Liljemark WF, Bloomquist CG, Bandt CL, Pihlstrom BL, Hinrichs JE, Wolff LF (1993): Comparison of the distribution of *Actinomyces* in dental plaque on inserted enamel and natural tooth surfaces in periodontal health and disease. *Oral Microbiol Immunol* 8, 5–15
- Liljemark WF, Bloomquist CG, Reilly BE, Bernardis CJ, Townsend DW, Pennock AT, LeMoine JL (1997): Growth dynamics in a natural biofilm and its impact on oral disease management. *AAAdv Dent Res.* 11, 14–23
- Lukacs JR, Largaespada LL (2006): Explaining sex differences in dental caries prevalence: Saliva, hormones, and “life-history” etiologies. *Am J Hum Biol* 18, 540–555
- Macpherson L, MacFarlane TW, Stephen KW (1990): An Intra-oral Appliance Study of the Plaque Microflora Associated with Early Enamel Demineralization. *Journal of Dental Research* 69, 1712–1716
- 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

- Marsh P, Martin MV: *Orale Mikrobiologie*; Thieme, Stuttgart, 2003
- Marsh PD, Bradshaw DJ (1995): Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol.* 15, 169–175
- Marxkors R, Meiners H: *Taschenbuch der zahnärztlichen Werkstoffkunde*, 5. neu bearb. Aufl; Dt. Zahnärzte-Verl. DÄV-Hanser, Köln 2001
- Mathews S, Hans M, Mücklich F, Solioz M (2013): Contact killing of bacteria on copper is suppressed if bacterial-metal contact is prevented and is induced on iron by copper ions. *Appl Environ Microbiol.* 79, 2605–2611
- McConoughey SJ, Howlin R, Granger JF, Manring MM, Calhoun JH, Shirliff M, Kathju S, Stoodley P (2014): Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiol* 9, 987-1007
- Mc Dougall T: Studies on dental plaque II: The histology of the developing interproximal plaque. *J Ind Microbiol* 1963, 169–175
- Meyerowitz C, Featherstone JD, Billings RJ, Eisenberg AD, Fu J, Shariati M, Zero DT (1991): Use of an intra-oral model to evaluate 0.05% sodium fluoride mouthrinse in radiation-induced hyposalivation. *J Dent Res* 70, 894–898
- Micheelis W (1991): *Mundgesundheitszustand und -verhalten in der Bundesrepublik Deutschland: Ergebnisse des nationalen IDZ-Survey 1989 (Materialienreihe / IDZ, Institut der Deutschen Zahnärzte 11,1)*; Dt. Ärzte-Verl., Köln 1991
- Micheelis W (1993): *Mundgesundheitszustand und -verhalten in Ostdeutschland: Ergebnisse des IDZ-Ergänzungssurvey 1992 (Materialienreihe / IDZ, Institut der Deutschen Zahnärzte 11,3)*; Dt. Ärzte-Verl., Köln 1993
- Miller MB, Bassler BL (2001): Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55, 165-99
- Moore WEC, Moore LVH (1994): The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 5, 66–77
- Moreira DM, Oei J, Rawls HR, Wagner J, Chu L, Li Y, Zhang W, Whang K (2014): A novel antimicrobial orthodontic band cement with in situ-generated silver nanoparticles. *Angle Orthod* 85, 175–183
- 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

Murakami H, Matsuya Y, Matsuya S (1990): Dissolution mechanism of zinc phosphate dental cement in acetic and lactic acid buffers. *Biomaterials* 11, 435–440

Nägeli CW: Über oligodynamische Erscheinungen in lebenden Zellen; In: Neue Denkschriften der Schweizerischen naturforschenden Gesellschaft; hrsg. v. Schweizerische Naturforschende Gesellschaft. (33): Fretz AG 1893, 1–51

Nascimento Cd, Pita MS, Pedrazzi V, de Albuquerque Junior, Ribeiro RF (2013): In vivo evaluation of *Candida* spp. adhesion on titanium or zirconia abutment surfaces. *Arch Oral Biol* 58, 853–861

Nascimento Cd, Pita MS, Fernandes, FH, Nogueira Carriço, Pedrazzi V, de Albuquerque Junior, Rubens Ferreira, Ribeiro RF (2014): Bacterial adhesion on the titanium and zirconia abutment surfaces. *Clin Oral Implants Res* 25, 337–343

Netuschil L (1983): Vitalfärbung von Plaque- Mikroorganismen mit Fluoresceindiaceetat und Ethidiumbromid. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 38, 914-917.

Netuschil L, Von Ohle C, Brex M, (1996): Die Vitalfluoreszenztechnik in der Plaqueforschung. *Parodontologie* 7, 293-305

Netuschil L, Reich E, Unteregger G, Sculean A, Brex M (1998): A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. *Arch Oral Biol* 43, 277-285

Nyvad B, Kilian M (1987): Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 95, 369-380

O’Gorman J, Humphreys H (2012): Application of copper to prevent and control infection. Where are we now? *J Hosp Infect.* 81, 217–223

Øilo G (1978): The influence of surface roughness on the retentive ability of two dental luting cements. *J Oral Rehabil* 5, 377-389

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

Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA (2006): The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation—new insight. *J Dent Res* 85, 878–887

Pameijer CH (2012): A review of luting agents. *Int J Dent* 2012, 752861

- Papavasileiou: In-vivo-Untersuchung zur periimplantären Biofilmbildung auf Befestigungszementen für festsitzenden implantatgetragenen Zahnersatz. Zahmed. Diss. Regensburg 2013
- Pawlig O: Grundlegende Untersuchungen zur Abbindereaktion von Zinkphosphatzement. Naturw. Diss. Duisburg 2001
- Percival RS, Challacombe SH, Marsh PD (1994): Flow rates of resting whole and stimulated parotid saliva in relation to age and gender. *J Dent Res* 73, 1416–1420
- Perez E, Williams M, Jacob JT, Reyes MD, Chernetsky Tejedor S, Steinberg JP, Rowe L, Ganakammal SR, Changayil S, Weil MR (2014): Microbial biofilms on needleless connectors for central venous catheters: comparison of standard and silver-coated devices collected from patients in an acute care hospital. *J Clin Microbiol* 52, 823–831
- Prabhakar AR, Prahlad D, Kumar SR (2013): Antibacterial activity, fluoride release, and physical properties of an antibiotic-modified glass ionomer cement. *Pediatr Dent* 35, 411–415
- Prada-López I, Quintas V, Tomás I (2015a): The intraoral device of overlaid disk-holding splints as a new in situ oral biofilm model. *J Clin Exp Dent* 7, 126–32
- Prada-Lopez I, Quintas V, Casares-De-Cal MA, Suarez-Quintanilla JA, Suarez-Quintanilla D, Tomas I (2015b): Ex vivo vs. in vivo antibacterial activity of two antiseptics on oral biofilm. *Front Microbiol* 6, 655
- Pratten J, Smith AW, Wilson M. (1998): Response of single species biofilms and microcosm dental plaques to pulsing with chlorhexidine. *J Antimicrob Chemother* 42, 453–459
- Prause D: EDX-Analyse ausgewählter zahnärztlicher Materialien zur Identifikation einer unbekanntes Leiche. Zahnmed. Diss. Graz 2010
- Prentice RL, Zhao LP (1991): Estimating equations for parameters in means and covariances of multivariate discrete and continuous responses. *Biometrics* 47, 825–839
- Pritzel D: Einfluss veränderter Parameter bei der Verblendung von edelmetallfreien Legierungen mit Keramik auf den Haftverbund. Zahnmed. Diss Berlin 2012
- Quintas V, Prada-López I, Prados-Frutos JC, Tomás I (2015): In situ antimicrobial activity on oral biofilm: essential oils vs. 0.2 % chlorhexidine. *Clin Oral Investig* 19, 97–107

- Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (1996): An introduction to materials in medicine. *Biomaterials Science* 484, 283–358
- Raval NC, Wadhvani, Chandur PK, Jain S, Darveau RP (2014): 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* 15, 1029-1035
- Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander NE, Handley PS (2003): Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol* 11, 94-100
- Roberts SK, Bass C, Brading M, Lappin-Scott H, Stoodley P (1999): Biofilm formation and structure: What's new? in: Newman, H.N., Wilson, M.: *Dental plaque revisited – oral biofilms in health and disease*. Bioline, University College London, 15-36
- Robinson C, Kirkham J, Percival R, Shore R, Bonass W, Brookes S, Kusa L (1997): A method for the quantitative site-specific study of the biochemistry within dental plaque biofilms formed in vivo. *Caries Res* 31, 194–200
- Romani AM, Fund K, Artigas J, Schwartz T, Sabater S, Obst U (2008): Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. *Microb Ecol* 56, 427-36
- Rosalen PL, Bowen WH, Pearson SK (1996a): Effect of copper co-crystallized with sugar on caries development in desalivated rats. *Caries research* 30, 367–372
- Rosalen PL, Pearson SK, Bowen WH (1996b): Effects of copper, iron and fluoride co-crystallized with sugar on caries development and acid formation in desalivated rats. *Arch Oral Biol* 41, 1003–1010
- Rosales JI, Marshall GW, Marshall SJ, Watanabe LG, Toledano M, Cabrerizo MA, Osorio R (1999): Acid-etching and hydration influence on dentin roughness and wettability. *J Dent Res* 78, 1554–1559
- Rosan B, Malamud D, Appelbaum B, Golub E (1982): Characteristic differences between saliva-dependent aggregation and adhesion of streptococci. *Infect Immun* 35, 86-90
- Rosenstiel SF, Land MF, Crispin BJ (1998): Dental luting agents: A review of the current literature. *J Prosthet Dent* 80, 280–30
- Rupp ME, Fey PD (2001): In vivo models to evaluate adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Methods Enzymol* 336, 206–215

- Salgado CD, Sepkowitz KA, John JF, Cantey, JR, Attaway HH, Freeman KD, Sharpe PA, Michels HT, Schmidt MG, Freeman KD (2013): Copper surfaces reduce the rate of healthcare-acquired infections in the intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 34, 479–486
- Sanderink RBA, Bernhardt H, Knoke M, Meyer J, Weber C, Weiger R: Curriculum orale Mikrobiologie und Immunologie, Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin u. a. 2004
- Sandig H, Pfister W, Liesegang K (1988): Untersuchung zur mikrobiellen Zusammensetzung der Plaque in Abhängigkeit von abnehmbaren Teilprothesen. *Zahn-, Mund- und Kieferheilkd* 76, 717–720
- Sauer K (2003): The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol.* 4, 219
- Scheie AA (1994): Mechanisms of dental plaque formation. *Adv Dent Res* 8, 246–253
- Schmalz G, Rotgans J (1977): Antimicrobial properties of cements with and without copper content. *Dtsch Zahnärztl Z* 32, 760–762
- Schmidt MG, Attaway HH, Sharpe PA, John J, Sepkowitz KA, Morgan A, Fairey SE, Singh S, Steed LL, Cantey, JR (2012): Sustained reduction of microbial burden on common hospital surfaces through introduction of copper. *J Clin Microbiol* 50, 2217–2223
- Schmidt MG, Attaway HH, Fairey SE, Steed LL, Michels HT, Salgado CD (2013): Copper continuously limits the concentration of bacteria resident on bed rails within the intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 34, 530–533
- Seth AK, Geringer MR, Hong SJ, Leung KP, Mustoe TA, Galiano RD (2012): In vivo modeling of biofilm-infected wounds: a review. *J Surg Res* 178, 330–338
- Sissons CH (1997): Artificial dental plaque biofilm model systems. *Advances in dental research* 11, 110–126
- Smit P, Heniger J (1975): Antoni van Leeuwenhoek (1632 - 1723) and the discovery of bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 41, 217- 228
- Smith DC, Ruse ND (1986): Acidity of glass ionomer cements during setting and its relation to pulp sensitivity. *J Am Dent Assoc* (1939) 112, 654–657
- Song F, Koo H, Ren D (2015): Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. *J Dent Res* 94, 1027–1034

- Sonoda H, Inokoshi S, Otsuki M, Tagami J (2001). Pulp tissue reaction to four dental cements. *Oper Dent* 26, 201-7
- Steiner K: Charakterisierung der Wirkung antimikrobieller Substanzen auf Multispeziesbiofilme mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie. Zahnmed. Diss. Berlin 2012
- Stewart PS, Costerton JW (2001): Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358, 135–138
- Stoodley P, Wilson S, Hall-Stoodley L, Boyle J D, Lappin-Scott H M, 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
- 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, 68–81
- Theilade J (1964): Electron microscopic study of calculus attachment to smooth surfaces. *Acta Odontol Scand* 22, 379–387
- Tuntiprawon M (1997): Roughness of tooth-surface and seating of metal crowns. *J Dent Res* 76, 56-61
- Usha C (2009): Dental caries - A complete changeover (Part I). *J Conserv Dent* 12, 46–54
- van Loosdrecht MC, Norde W, Zehnder AJ (1990): Physical chemical description of bacterial adhesion. *J Biomater Appl* 5, 91–106
- Veerachamy S, Yarlagadda T, Manivasagam G, Yarlagadda PK (2014): Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. *Proc Inst Mech Eng H* 228, 1083-1099
- Voß R, Meiners H: Fortschritte der Zahnärztlichen Prothetik und Werkstoffkunde, Band 4, Hanserverlag, 1989
- Walker C, Sedlacek MJ (2007): An in vitro biofilm model of subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* 22, 152–161
- 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

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

Waters CM, Bassler BL (2005): Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 319–346

Wecke J, Kersten T, Madela K, Moter A, Gobel UB, Friedmann A, Bernimoulin JP (2000): A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilms in human periodontal pockets. *FEMS Microbiol Lett* 191, 95–101

Wehle J: Klinische Studie zur initialen In-vivo-Plaueakkumulation auf verschiedenen dentalen Werkstoffen. Zahnmed. Diss. Göttingen 2004

Weimer, Juneau RA, Murrah KA, Pang B, Armbruster CE, Richardson SH, Swords WE (2011): Divergent mechanisms for passive pneumococcal resistance to beta-lactam antibiotics in the presence of *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 203, 549–555

Welker D (1970): Vergleichende werkstoffkundliche Prüfungen an EBA-Zementen und Zinkoxid-Phosphat-Zementen. *Dtsch Stomatol* 18, 557–564

Wimpenny JWT (1997): The validity of models. *Adv Dent Res* 11, 150–159

Wimpenny JWT, Colasanti R (1997): A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. *FEMS Microbiol Ecol* 22, 1–16

Windeler AS (1979): Powder enrichment effects on film thickness of zink phosphat cement. *J Prosthet Dent* 42, 299–303

Winkler C, Schäfer L, Felthaus O, Allerdings J, Hahnel S, Behr M, Bürgers 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

Wolcott R, Costerton, JW, Raoult D, Cutler SJ (2013): The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clin Microbiol Infect* 19, 107–112

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

Wunder D, Bowen WH (1999): Action of agents on glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* in solution and adsorbed to experimental pellicle. *Arch Oral Biol* 44, 203–214

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

Yousif A, Jamal MA, Raad I (2015): Biofilm-based central line-associated bloodstream infections. *Adv Exp Med Biol* 830, 157–179

Zanatta FB, Bergoli AD, Werle SB, Antoniazzi RP (2011): Biofilm removal and gingival abrasion with medium and soft toothbrushes. *Oral Health Prev Dent* 9, 177–183

Zaura-Arite E, ten Cate JM (2000): Effects of fluoride- and chlorhexidine-containing varnishes on plaque composition and on demineralization of dentinal grooves in situ. *Eur J Oral Sci* 108, 154–161

Zaura E, ten Cate JM (2004): Dental plaque as a biofilm: a pilot study of the effects of nutrients on plaque pH and dentin demineralization. *Caries Res* 38, 9–15

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 L, Gowardman J, Rickard CM (2011): Impact of microbial attachment on intravascular catheter-related infections. *Int J Antimicrob Agents* 38, 9–15

Danksagung

Ganz besonders danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Ralf Bürgers, für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung sowie die Ansprechbarkeit und Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen. Des Weiteren danke Ich Frau Dr. Techmer für die Betreuung und Unterstützung bei der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung.