

*AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR POLIKLINIK FÜR ZAHNÄRZTLICHE PROTHETIK  
Prof. Dr. Gerhard Handel  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*UNTERSUCHUNG DER BAKTERIELLEN ADHÄSION AUF SILAN-OBERFLÄCHEN*

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Zahnmedizin*

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Antje Klemm*

2009



*AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR POLIKLINIK FÜR ZAHNÄRZTLICHE PROTHETIK  
Prof. Dr. Gerhard Handel  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*UNTERSUCHUNG DER BAKTERIELLEN ADHÄSION AUF SILAN-OBERFLÄCHEN*

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Zahnmedizin*

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Antje Klemm*

2009

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	<i>Prof. Dr. G. Handel</i>
2. Berichterstatter:	<i>Prof. Dr. Dr. P. Proff</i>
Tag der mündlichen Prüfung:	<i>09.09.2009</i>

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	Bioadhäsionsprozesse in der Mundhöhle.....	3
2.1.1	Mechanismen der Plaquebildung .....	3
2.1.1.1	Pellikelbildung .....	4
2.1.1.2	Transport von Mikroorganismen.....	5
2.1.1.3	Reversible Adhäsion .....	5
2.1.1.4	Irreversible Adhäsion .....	6
2.1.1.5	Koaggregation und Biofilmbildung.....	7
2.1.2	Bakterielle Adhäsion und Oberflächeneigenschaften .....	8
2.1.2.1	Physikalisch-chemische Faktoren der mikrobiellen Adhäsion an Oberflächen.....	8
2.1.2.2	Spezifische Faktoren der mikrobiellen Adhäsion an Oberflächen .....	14
2.1.3	Bakterielle Adhäsion auf zahnärztlichen Restaurationsmaterialien .....	15
2.2	Testverfahren .....	18
2.2.1	<i>In vivo</i> Testverfahren.....	18
2.2.2	<i>In vitro</i> Testverfahren .....	18
2.2.3	<i>Streptococcus mutans</i> .....	19
2.2.4	Quantifizierung von Bakterienanlagerung .....	20
2.3	Silanhaftvermittler.....	22
3	Fragestellung.....	24
4	Material und Methoden.....	25
4.1	Materialien.....	26
4.1.1	Mikroorganismen.....	26
4.1.2	Silane und Probenkörper.....	26
4.1.3	Chemikalien und Lösungen.....	26
4.1.4	Geräte und technisches Material.....	27
4.1.5	Software .....	28
4.2	Methoden .....	28
4.2.1	Versuchsvorbereitung .....	28
4.2.1.1	Probenherstellung .....	28
4.2.1.2	Fourier-Transform Infrarot Spektroskopie (FT/IR) .....	32
4.2.1.3	Perthometermessung.....	33
4.2.1.4	Goniometermessung.....	35
4.2.1.5	Resazurin/ Almar Blue .....	35
4.2.1.6	Bakterienanzucht .....	36
4.2.2	Versuchsdurchführung: Bakterienanlagerung .....	38
4.2.2.1	Vorversuche 1 und 2 zur Messung des Einflusses der Konzentration von 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan auf die bakterielle Adhäsion von <i>S. mutans</i> .....	40
4.2.2.2	Hauptversuche 1 und 2 zur Ermittlung der bakteriellen Adhäsion für die Silane Nummer 1-9 .....	40
4.2.3	Auswertmethodik und Statistik .....	40
4.2.3.1	Auswertung .....	40
4.2.3.2	Statistik .....	41
5	Ergebnisse .....	43

5.1 Vorversuche .....	43
5.1.1 Fourier-Transform Infrarot Spektroskopie .....	43
5.1.2 Perthometer .....	52
5.1.2.1 Perthometerauswertung für die Vorversuche 1 und 2 .....	52
5.1.2.2 Perthometerauswertung für die Hauptversuche 1 und 2 .....	52
5.1.3 Goniometer .....	53
5.1.4 Vorversuch 1 und 2: Einfluss der Konzentration von 3-Methacryloxy- propyltrimethoxysilan auf die relative Intensität der Fluoreszenz .....	56
5.2 Hauptversuche .....	58
5.2.1 Hauptversuch 1 und 2: Ermittlung der relativen Fluoreszenzintensität für Silan 1-9 .....	58
6 Diskussion .....	61
6.1 Diskussion der Methoden .....	61
6.1.1 Bakterienauswahl .....	62
6.1.2 Experimentelle Bakterienanlagerung <i>in vitro</i> .....	63
6.1.3 Versuchsbedingungen .....	66
6.1.4 Auswertmethodik .....	67
6.2 Diskussion der Ergebnisse .....	70
6.2.1 Fourier-Transformations- Infrarot-Spektroskopie (FT/IR) .....	70
6.2.2 Rauigkeiten .....	74
6.2.3 Kontaktwinkelmessung .....	75
6.2.4 Adhäsion von <i>Streptococcus mutans</i> .....	77
6.2.4.1 Bakterielle Adhäsion an Silanoberflächen .....	78
6.3 Schlussfolgerung .....	82
7 Zusammenfassung .....	83
8 Literaturverzeichnis .....	85
9 Abkürzungsverzeichnis .....	103
10 Danksagung .....	104
11 Lebenslauf .....	105

# 1 Einleitung

Biomaterialien werden in der Medizin und Zahnmedizin unter anderem dafür verwendet verloren gegangene anatomische Strukturen zu ersetzen. Neben rein mechanischen und physikalischen Eigenschaften der Materialien sind für deren Lebensdauer ebenfalls die Wechselbeziehungen mit dem Biotop Mundhöhle und den sich dort befindlichen Mikroorganismen von Bedeutung. Jede Oberfläche wird im Mund innerhalb von wenigen Sekunden von einem Proteinfilm, dem sogenannten Schmelzoberhäutchen oder „acquired pellicle“ überzogen, welcher die Grundlage für die Anheftung von Bakterien bildet.

Zahlreiche Studien haben sich mit dem Adhäsionsverhalten von Bakterien auf dentalen Werkstoffen beschäftigt. Die Ergebnisse belegen, dass zahnärztliche Materialien, abhängig von ihren spezifischen Oberflächencharakteristika (Rauigkeit, Polarität, Hydrophobizität) eine unterschiedliche Tendenz zur Anlagerung von Mikroorganismen aufweisen. Komposite und Prothesenkunststoffe neigen im höheren Ausmaß zu mikrobieller Anlagerung als Goldlegierungen oder Keramiken. Aus dieser Erkenntnis kann gefolgert werden, dass bei diesen Materialien mit einem erhöhten Risiko der Entstehung von Sekundärkaries, gingivalen Entzündungen bis hinzu parodontalen Erkrankungen sowie Prothesenstomatitis zu rechnen ist. Die häufigste Ursache für den Austausch direkter Kompositrestaurationen ist die Entstehung von Sekundärkaries am Übergang zwischen Zahnhartsubstanz und Füllungsrand. Sekundärkaries wiederum entsteht durch die Anlagerung kariespathogener Keime und die Bildung dentaler Plaque auf dem Zahn und dem Füllungsmaterial.

Bei den heutigen adhäsiven Befestigungs- und Fügetechniken kommt den Silanen eine große Bedeutung zu. Sie stellen einen wichtigen Bestandteil der Komposite dar. Silanhaftvermittler bilden die kovalenten Bindungen indem sie mit dem organischen Molekülanteil an die Matrix polymerisieren und über die Alkoholgruppe an den anorganischen Füllkörper binden. Von Interesse ist dabei die Betrachtung der durch die Silanisierung veränderten Oberflächencharakteristika der Füllkörper und der möglichen Auswirkungen auf werkstoffkundliche Parameter, die Beständigkeit in der Mundhöhle sowie insbesondere dem Adhäsionsverhalten von oralen Mikroorganismen.

Die vorliegende *in vitro*-Arbeit beschäftigt sich mit der quantitativen Ermittlung der Adhäsion von *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) an 9 chemisch unterschiedlichen Silanhaftvermittlern.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Bioadhäsionsprozesse in der Mundhöhle

Dentale Plaque ist eine weiche, strukturierte, nicht mineralisierte, mikrobielle Biopolymerschicht aus Speichelbestandteilen, bakteriellen Stoffwechselprodukten, Bakterienresten und Nahrungsbestandteilen, die der Zahnoberfläche sowie zahnärztlichen Restaurationen zäh anhaftet [Hasty 1992, Norde 1984].

Die Entwicklung der Zahnplaque erfolgt in unterschiedlichen Stadien [Marsh 1992, Marsh 1995, Peyton 1995]. Dazu zählen die Adsorption von Speichelbestandteilen zur Bildung des *acquired pellicle* [Lendenmann 2000, Müller 2001], Transport von Mikroorganismen an die mit dem Pellikel überzogenen Oberflächen [Busscher 2006, Marsh 1999], eine initiale reversible Anheftung durch *Van der Waals*-Kräften und elektrostatischen Abstoßungen [Diaz 2006, Marsh 1999], eine irreversible Adhäsion durch spezifischen Wechselwirkungen zwischen den Molekülen von bakteriellen Adhäsinen und Rezeptoren des Pellikel [Hasty 1992, Marsh 1999], Koaggregation von Bakterien mit bereits adhären Mikroorganismen [Bos 1996, Ellen 1997, Kolenbrander 1990, Palmer 2003] und Zellteilung [Marsh 1999], die zu konfluenten Wachstum und Biofilmbildung führen.

#### 2.1.1 Mechanismen der Plaquebildung

Die Entwicklung eines Biofilms lässt sich in verschiedene Stadien einteilen. Mit dem Zeitpunkt der Annäherung eines Mikroorganismus an eine Oberfläche, bestehen spezifische und unspezifische Wechselwirkungen, die entscheidend für die Anheftung und Besiedlung der Oberfläche sind. BOS *et al.*, QUIRYNEN *et al.* und MARSH *et al.* zeigten, dass die Anheftung von Mikroorganismen prinzipiell in folgenden Schritten abläuft [Bos 1999, Marsh 1999, Quirynen 1995] :

1. Adsorption des Pellikels an der Zahnoberfläche
2. Transport von Mikroorganismen an die mit einem Pellikel überzogene Zahnoberfläche
3. Physikalisch-chemische Wechselwirkungen zwischen der Zelloberfläche des Mikroorganismus und dem Pellikel ermöglichen eine reversible Anheftung

durch das Zusammenwirken von *Van der Waals*-Kräften und elektrostatischen Abstoßung in einem Bereich mit schwacher Nettoanziehung.

4. Zu einer irreversiblen Adhäsion führen dagegen über Kurzstrecken wirksame Wechselwirkungen. Zu diesen Interaktionen gehören spezifische stereochemische Wechselwirkungen zwischen Adhäsinen der mikrobiellen Zelloberfläche und den Rezeptoren des erworbenen Pellikel.
5. Zu einer zunehmenden Vielfalt der Mikroflora der Plaque führt die Koaggregation von Mikroorganismen. Die Vervielfältigung der adhärenenten Organismen führt zu einem konfluenten Wachstum und einem Biofilm.
6. Die Besiedlung von weiteren Standorten wird durch das Ablösen von Zellen aus dem Biofilm in den Speichel ermöglicht.

#### 2.1.1.1 Pellikelbildung

Innerhalb von wenigen Sekunden adsorbiert auf einer gründlich gereinigten Zahnoberfläche ein unstrukturierter azellulärer Film, das dentale Pellikel, auch *acquired pellicle* genannt [Hellwig 2003, Lendenmann 2000, Müller 2001]. Dieses Zahnoberhäutchen weist nach mehreren Stunden eine Filmstärke von 0,1- 1µm [Gibbons 1973, Hellwig 2003, Marsh 1999] auf. Es besteht in erster Linie aus Speichelproteinen, zu denen die sauren prolinreichen Proteine, Statherin, Speichelamylase, sekretorisches IgA, Lysozym, Laktoferrin, Histatin, Cystatin, Lipide sowie die Muzine MG1 und MG2 gehören [Lendenmann 2000, Liljemark 1997, Yao 2003], aber auch aus Sulkusflüssigkeit und aus bakteriellen Ausscheidungsprodukten. Nicht alle Bestandteile des Speichels werden im Pellikel wieder gefunden, was darauf hinweist, dass die Adsorption selektiv erfolgt [Yao 2001, Yao 2003] und verschiedene Speichelkomponenten auch eine unterschiedliche Affinität für Hydroxylapatit aufweisen [Elangovan 2007, Lendenmann 2000]. Pellikel bilden sich auf allen intraoralen Oberflächen, sind aber nicht identisch. Die Bestandteile, die auf Schmelz adsorbieren, unterscheiden sich von denen auf Zement [Fisher 1987], und beide unterscheiden sich deutlich von auf der Mundschleimhaut adsorbierten Pellikel [Bradway, Edgerton 1996, Marsh 1999, Yoo 2003]. HORBETT *et al.* beschrieb, dass Proteine wegen ihrer polaren und apolaren Gruppen sowie verschiedener Seitenketten ein stark ausgeprägtes amphiles Verhalten haben, das ihnen die Fähigkeit verleiht, an Grenzflächen

konzentriert und adsorbiert zu werden [Horbett 1982]. Das Adsorptionsverhalten wird primär durch entgegengesetzt geladene Gruppen der Makromoleküle sowie der Eigenladung der Proteine bestimmt, welche eine elektrostatische Bindung an die Kalzium- und Phosphatgruppen des Hydroxylapatits der Zahnoberfläche ermöglichen [Bennick 1979, Moreno 1984]. Elektrostatische Interaktionen sind nicht allein determinierender Faktor, Konformationsänderungen der Proteine und Desorption von Wasser spielen ebenfalls eine wichtige Rolle [Moreno 1984]. Es gibt prinzipiell Möglichkeiten für anziehende und repulsive ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, *Van der Waals*-Kräfte, Hydratationseffekte, Säure-Basen-Wechselwirkungen und hydrophobe Interaktionen zwischen den Makromolekülen und der Schmelzoberfläche [Blomberg 1995, Hannig 1998].

#### 2.1.1.2 *Transport von Mikroorganismen*

Der Transport der Mikroorganismen zu den jeweiligen Oberflächen erfolgt Untersuchungen zu Folge durch Anziehungskräfte in Form von *Van der Waals*-Wechselwirkungen und elektrostatischen Anziehungen. Überwiegend werden Mikroorganismen durch den Speichelfluss passiv zur Zahnoberfläche transportiert. Wenige orale Bakterienarten sind dagegen beweglich und der Transport erfolgt durch *Brown'sche* Bewegung und aktive Eigenbewegung der Mikroorganismen [An 1998, Bos 1999, Van Loosdrecht 1990].

#### 2.1.1.3 *Reversible Adhäsion*

Die initiale reversible Anheftung der Zelloberfläche des Mikroorganismus an das Pellikel ist auf physikochemische Interaktionen zurück zu führen. Mikroorganismen sind aufgrund der Moleküle auf ihrer Zelloberfläche negativ geladen und saure Proteine des erworbenen Pellikel zeigen ebenfalls eine negative Nettoladung. BUSSCHER *et al.* unterschied dabei Langstrecken- und Kurzstrecken-Wechselwirkungen [Busscher 1997]. Unspezifische Langstrecken Wechselwirkungen werden bei Distanzen > 50 nm wirksam, wobei das Ausmaß von der Entfernung und der freien Oberflächenenergie abhängt [Busscher 1997, Marsh 1999]. Man hat versucht das physikochemische Geschehen unter anderem mit der sogenannten Theorie von DERJAGUIN & LANDAU zu erklären [Marsh 1999]. Demnach erfährt

der Partikel der sich der Oberfläche nähert, eine schwache *Van der Waals*-Anziehung, die durch die fluktuierenden Dipole innerhalb der Moleküle auf den beiden sich annähernden Oberflächen hervorgerufen wird [Marsh 1999]. Es werden aber auch so genannte Adhäsionsphänomene zwischen Mikroorganismen und Substratoberfläche diskutiert, zu denen BUSSCHER und VAN DER MEI *Van der Waals*-, Hydrophobe und Elektrostatische Wechselwirkungen zählen [Bos 1996a, Busscher 1997, Ellen 1997]. Desweiteren erfolgt eine passive Retention in Oberflächenvertiefungen und -rauigkeiten.

#### 2.1.1.4 Irreversible Adhäsion

Zu den über Kurzstrecken wirksamen Kräften gehören spezifische stereochemische Wechselwirkungen zwischen der Zelloberfläche der Bakterien und den Rezeptoren des Pellikel, durch direkten Kontakt der extrazellulären Proteinkomponenten (Adhäsine) und der komplementären Rezeptoren der Oberfläche [Busscher 1997, Glantz 1999, Quirynen 1995]. Bei engen Kontakt, d.h. bei Distanzen < 5nm zwischen Substratoberfläche und Bakterien wirken Kurzstrecken Wechselwirkungen, zu denen Ionen- bzw. Dipol-Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen zählen [An 1998, Glantz 1999, Quirynen 1989]. Damit diese Wechselwirkungen stattfinden können, ist es nötig, dass Wasserfilme zwischen den interagierenden Oberflächen entfernt werden. Der dehydratisierende Effekt der Zellhydrophobizität und hydrophober Bestandteile von Zelloberflächen auf diesen Wasserfilm spielt eine wichtige Rolle, da die Oberflächen sich einander so weit annähern können, dass über Kurzstrecken wirksame Wechselwirkungen stattfinden können. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Grad der Hydrophobizität der Zelloberflächen und der Anheftung von Bakterien an pellikelbedeckte Oberflächen ist nachgewiesen [Marsh 1999, Van Loosdrecht 1990, Weerkamp 1985]. Aufgrund von spezifischen Wechselwirkungen zwischen der Substratoberfläche und bakteriellen Zellstrukturen kommt es zu einer irreversiblen Adhäsion [Van Loosdrecht 1990]. Unter solchen Wechselwirkungen sind Ionenbindungen, Wasserstoffbrückenbindungen und kovalente Bindungen zu verstehen [Busscher 1997, Glantz 1999, Quirynen 1989]. Von untergeordneter Rolle sind dagegen *Van der Waals*- und elektrostatische Interaktionen [Busscher 1997, Quirynen 1995].

### 2.1.1.5 Koaggregation und Biofilmbildung

Koaggregation bezeichnet die gegenseitige Erkennung von Zellen, die genetisch unterschiedliche Typen von Partnerzellen angehören [Kolenbrander 1993, Liljemark 1986]. Die meisten oralen Bakterien weisen diese Eigenschaften auf [Kolenbrander 1988, Kolenbrander 1992, Kolenbrander 1993]. Durch intragenerische Koaggregation zwischen *Streptokokken* und zwischen *Actinomyces* sowie intergenerische Koaggregation zwischen *Streptokokken* und *Actinomyces* wird eine frühe Ansammlung von dentaler Plaque erleichtert. Bei der nachfolgenden Plaqueprogression werden weitere intergenerische Koaggregationen zwischen anderen Bakteriengattungen und Erstbesiedlern beobachtet. Bei diesem Vorgang erkennen Mikroorganismen Moleküle, in Form von lektinartigen Adhäsinen des einen Bakteriums, welche mit entsprechenden Oligo- oder Polysaccharidrezeptoren an der Oberfläche des anderen Bakteriums wechselwirken und eine Bindung ermöglichen [Kolenbrander 1988]. Es wird vermutet, dass die lektinvermittelte Koaggregation ein wichtiger Mechanismus bei der strukturellen Organisation der Zahnplaque darstellt. Durch Koaggregation wird möglicherweise auch die Entwicklung von Nahrungsketten, wie zwischen *Veillonellen* und *Streptokokken*, und die Bildung von sogenannten Maiskolbenstrukturen erleichtert [Müller 2001].

Biofilme bezeichnen Bakterienpopulation, die in eine durch die Bakterien selbst produzierte, extrazelluläre Matrix polymerer Moleküle eingebettet sind und fest auf einer Unterlage haften [Costerton 1994, Folwaczny 2003]. Zudem zeigen Bakterien eines Biofilms eine veränderte phänotypische Ausprägung und ein verändertes Wachstumsverhalten, als Bakterien des Speichels [Folwaczny 2003, Yoshida 2002]. Mit dem Zeitpunkt der Anheftung von Pionierbakterien, kommt es zum Wachstum und der Bildung von Mikrokolonien. Zu den Erstbesiedlern zählen Mitglieder der *Streptococcus mitis*- Gruppe. Die Entwicklung eines reifen Biofilms beinhaltet unterschiedliche Prozesse, die von den am Aufbau beteiligten Bakterienzellen initiiert und getragen werden [Folwaczny 2003]. Die dabei ablaufenden Vorgänge sind bisher nicht im Detail geklärt. Es existiert ein allgemein anerkanntes Modell, auf der Basis der bisher zur Verfügung stehenden Daten, das unabhängig von Art des Biofilms, den formierenden Bakterien sowie dem Umgebungsmedium gültig ist [Folwaczny 2003, Hall-Stoodley 2002]. Die Etablierung von mikrobiellen Biofilmen erfolgt durch primäre Adhäsion von Bakterien des Speichels auf der besiedelten

Oberfläche, gefolgt von der Formation und Entwicklung von Mikrokolonien einschließlich der Ausbildung der charakteristischen Biofilmarchitektur und der Freisetzung von Tochterkolonien [Costerton 1995a, Costerton 1995b, Folwaczny 2003]. Ein wichtiges Stadium bei der Entwicklung der Plaque stellt dabei die Bildung von extrazellulären Polymeren durch angeheftete Bakterien dar. *S. mutans* trägt durch Bildung von wasserunlöslichen Muzinen zur strukturellen Integrität von dentaler Plaque bei und unterstützt auf diese Weise die Bildung und Aufrechterhaltung von Kanälen in der Plaque [Marsh 1999].

Ein klassisches Beispiel für einen Biofilm wird in der dentalen Plaque gesehen [Wilson 1999], welcher eine komplexe mikrobielle Gemeinschaft enthält [Kinniment 1996, Müller 2001].

## **2.1.2 Bakterielle Adhäsion und Oberflächeneigenschaften**

### *2.1.2.1 Physikalisch-chemische Faktoren der mikrobiellen Adhäsion an Oberflächen*

Von essentieller Bedeutung für die mikrobielle Akkumulation und Proliferation des Zahnbelages ist die Fähigkeit oraler Mikroorganismen, an spezifischen Oberflächen unter den hydrodynamischen Bedingungen des oralen Milieus irreversibel zu adhären [Gibbons 1975, Marsh 1995b].

Innerhalb weniger Stunden heften sich selektiv zuerst grampositive Kokken, wie *Streptococcus sanguis* (*S. sanguis*), im geringen Umfang *Streptococcus mitis* (*S. mitis*) sowie *S. mutans* und *Aktinomyzeten*, wie *Actinomyces viscosus* (*A. viscosus*) sowie *Actinomyces naeslundii* (*A. naeslundii*) an die pellicelbedeckte Schmelzoberfläche [Liljemark 1986]. Die Pellicelbildung verändert die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Oberfläche und beeinflusst somit die bakterielle Adhärenz an der Zahnoberfläche sowie an zahnärztlichen Restaurationen [Levine 1985, Pratt-Terpstra 1987, Pratt-Terpstra 1989].

In der ersten Phase der bakteriellen Adhäsion kommt die anfängliche Wechselwirkung zwischen Mikroorganismus und Substrat zum Tragen. Diese Wechselwirkung wird mit Begriffen der physikochemischen Wechselwirkungen von Anziehung und Abstoßung präzise beschrieben und wird durch Faktoren wie Oberflächenrauigkeit, Hydrophobie, freie Oberflächenenergie und Zeta Potential bestimmt.

#### 2.1.2.1.1 Oberflächenrauigkeit

Die Rauigkeit ist ein Begriff aus der Oberflächenphysik, der die Unebenheiten der Oberflächenhöhe bezeichnet [Trautwein 2004]. Zur quantitativen Beschreibung der Rauheit werden der arithmetische Mittenrauhwert  $R_a$  und die gemittelte Rautiefe  $R_z$  verwendet, die in der Einheit  $\mu\text{m}$  angegeben werden [Eichner 1996]. Die gemittelte Rautiefe  $R_z$  ist das arithmetische Mittel aus den Einzelrautiefen fünf aneinandergrenzender Einzelmessstrecken  $l_e$  [Eichner 1996, Deutsches Institut für Normung DIN4768, 1990]. Die Einzelrautiefe  $Z_i$  ist der Abstand zweier Parallelen zur mittleren Linie, die innerhalb der Einzelmessstrecke  $l_e$  das Rauheitsprofil am höchsten bzw. tiefsten Punkt berühren [Eichner 1996]. Es ergibt sich rechnerisch:  $R_z = (1/5) \cdot (Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5)$  [Eichner 1996 (39), Deutsches Institut für Normung DIN4768, 1990].  $R_z$  gibt somit Auskunft über die durchschnittliche vertikale Oberflächenzerklüftung.

Nach DIN 4768 des Deutschen Institutes für Normung, entspricht die mittlere Rauheit  $R_a$  der Höhe eines Rechtecks, das die Länge  $l_m$  hat, sowie dessen Fläche gleich der Summe der zwischen Rauheitsprofil und mittlerer Linie eingeschlossenen Flächen ist [Deutsches Institut für Normung DIN4768, 1990]. Die mittlere Rauheit  $R_a$ , entspricht dem arithmetischen Mittel der Abweichung von der Mittellinie. In zwei Dimensionen berechnet sie sich aus:  $R_a = (1/l_m) \cdot (\sum A_{ai} + \sum A_{bi})$ . Dabei entspricht  $A_{ai}$  der Fläche über der mittleren Linie und  $A_{bi}$  der Fläche unter der mittleren Linie [Eichner 1996, Deutsches Institut für Normung DIN4768, 1990]. Durch die Flächenintegration bleiben einzelne Profilausreißer weitgehend unberücksichtigt. Die Messwerte für  $R_a$  bleiben bei Abtastung des Prüflings an unterschiedlichen Flächenausschnitten gegenüber  $R_z$  relativ konstant [Eichner 1996].

Die Erfassung der sogenannten Feingestaltabweichung erfolgt durch Tastschnittverfahren, optische Messverfahren und pneumatische Messverfahren.

Zahlreiche Untersuchungen belegen den begünstigenden Einfluss rauer Oberflächen auf die Bildung und Reifung von Plaque, was auf einen beschleunigten und leichteren Übergang vom initialen reversiblen zum irreversiblen Stadium der mikrobiellen Adhäsion zurückzuführen ist [Quirynen 1995, Taylor 1998a]. Die Elektronenmikroskopie zeigte, dass *in vivo* die initiale bakterielle Kolonisation auf der Schmelzoberfläche in Oberflächenunregelmäßigkeiten wie Perikymatien, Abrasions-

defekten und Rissen von wenigen Mikrometern beginnt [Hannig 1999]. Die initiale Adhäsion *in vivo* beginnt vor allem supragingival, an Bereichen, wo die Mikroorganismen gegen abscherende Kräfte geschützt sind. Zudem können auf unregelmäßigen Oberflächen und anderen Nischen anhaftende Bakterien länger überleben, da sie gegen die physiologische Reinigung [Newman 1974] sowie gegen die Mundhygiene geschützt sind [Quirynen 1995]. QUIRYNEN *et al.* untersuchten mit Hilfe von Polymerstreifen, die Bedeutung der freien Oberflächenenergie und der Oberflächenrauigkeit auf die supragingivale Plaquebildung *in vivo*. Dabei war eine Hälfte des Streifens glatt ( $R_a=0,1 \mu\text{m}$ ) und die andere angeraut ( $R_a=2,0 \mu\text{m}$ ). Auf den rauen Oberflächen der beiden Polymere war die Ausdehnung und Dicke der Plaque viermal größer als auf den polierten Oberflächen [Quirynen 1990].

*In vitro*- Untersuchungen weisen auf die Bedeutung der Oberflächenrauigkeit und der freien Oberflächenenergie bei der Anlagerung supragingivaler Plaque hin. EINWAG *et al.* zeigten, dass die Adhäsion von *S. mutans* an rauen Füllungsmaterialien stärker war, als an hochglanzpolierten Oberflächen [Einwag 1990]. Untersuchungen über die bakterielle Adhäsion von Gold, Amalgam, Komposit und drei Keramiken, wiesen bei allen rauen Proben bis auf die Keramiken eine deutlich höhere bakterielle Adhäsion auf, die sich durch Politur der Oberflächen reduzieren ließ [Kawai 2001b]. BOLLEN *et al.* ermittelten in ihren Studien einen Schwellenwert für die mittlere Rauheit  $R_a$  von  $0,2 \mu\text{m}$ . Rauigkeitswerte die unter  $0,2 \mu\text{m}$  liegen, haben somit unter Fließkammerkonditionen keinen Einfluss auf die bakterielle Adhäsion [Bollen 1997].

Die Faktoren Oberflächenrauigkeit und freie Oberflächenenergie interagieren miteinander, der Oberflächenrauigkeit wird aber ein größerer Einfluss zugeschrieben.

#### 2.1.2.1.2 Hydrophobie

Ein weiterer wesentlicher Faktor stellt die Hydrophobie dar [Nesbitt 1982, Rosenberg 1983]. Das Maß für den Ausprägungsgrad der Hydrophobie von Stoffen ist die Hydrophobizität. Mit dieser Bezeichnung aus der Chemie werden Substanzen charakterisiert, die sich nicht mit Wasser mischen und es auf Oberflächen meist „abperlen“ lassen [Atkins 2001].

Zu Beginn des letzten Jahrhunderts gewann YOUNG die Erkenntnis, dass sich das Kräftegleichgewicht am Rande eines liegenden Tropfens durch die

Grenzflächenenergie der jeweiligen Grenzflächen beschreiben lässt. Die Oberflächenspannung ist die an der Oberfläche von Flüssigkeiten auftretende physikalische Erscheinung, die aufgrund der zwischenmolekularen Kräfte der Flüssigkeit bewirkt, dass deren Oberfläche möglichst klein wird [Shaw 1980, Göpel 1996]. Als Oberflächenspannung bezeichnet man auch die Grenzflächenspannung, die auf die Grenzfläche zweier Stoffe in beliebiger Phase wirkt. Gemessen wird sie in den SI-Einheiten  $\text{Newton Meter}^{-1}$  oder  $\text{Joule Meter}^{-2}$  [Atkins 2001].

Die Gleichung nach YOUNG stellt eine Beziehung zwischen folgenden Spannungsparametern dar:

- der Oberflächenspannung zwischen Festkörper und dem gesättigten Dampf der Flüssigkeit ( $\sigma_s$ ),
- der Grenzflächenspannung zwischen Tropfen und Festkörper ( $\sigma_{ls}$ ) sowie
- der Oberflächenspannung des Tropfens gegenüber dem gesättigten Dampf ( $\sigma_l$ ).

Aus dem Gleichgewicht der Kräfte ergibt sich nach YOUNG für die jeweiligen Ober- und Grenzflächenspannungen:  $\sigma_s = \sigma_{ls} + \sigma_l \cdot \cos\Theta$  [Atkins 2001]. Aus theoretischen Überlegungen folgt zudem die Aufteilung der jeweiligen Oberflächenspannungen in einen dispersen ( $^d$ ) und einen polaren ( $^p$ ) Anteil:  $\sigma_s = \sigma_s^d + \sigma_s^p$  [Atkins 2001].

Die einzelnen Anteile sind jeweils auf verschiedene atomare Kräfte zurückzuführen, die über die Grenzfläche hinweg zwischen den Atomen der Flüssigkeit und den des Feststoffes wirken [Atkins 2001].

Um die Oberflächenspannung von Festkörpern untersuchen zu können, bedient man sich der Methode des liegenden Tropfens, der sogenannten *Sessile Drop*-Methode [Mabboux 2004]. Zumeist ist die Oberflächenenergie des Festkörpers zu ermitteln, wobei zunächst auch die Grenzflächenspannung zwischen Flüssigkeit und Festkörper unbekannt ist. Die Oberflächenenergie des Festkörpers kann aufgrund der Starrheit von Festkörpern mit seiner Oberflächenspannung gleichgesetzt werden. Die Oberflächenspannung der Flüssigkeit wird als bekannt vorausgesetzt [Atkins 2001]. Je nach angewandten Verfahren müssen zudem die Komponenten der Oberflächenspannung (polar und dispers) der verwendeten Flüssigkeiten bekannt sein [Atkins 2001].

Mikrobielle Hydrophobie wird bestimmt durch die Energie der Anziehung zwischen apolaren oder geringfügig polaren Zellen in einer wässrigen Phase. Die Fimbrien, die Lipoteichonsäure sowie die hydrophoben Seitenketten der Zellwandaminosäuren werden mit Hydrophobie der bakteriellen Zelloberfläche assoziiert. Die hydrophoben Eigenschaften der Bakterienoberfläche sind abhängig von der Bakterienspezies [Grivet 2000, Scheie 1994]. Die Anziehung von hydrophoben Bakterien zu festen Oberflächen erfolgt durch die Abstoßung aus der wässrigen Phase. Es wird zudem vermutet, dass die Ionen-, Ion-Dipol- und Wasserstoffbrückenbindungen durch hydrophobe Bindungen verstärkt werden [Nesbitt 1982]. BUSSCHER *et al.* beschrieb ein Verfahren zur Messung der freien Oberflächenenergie von bakteriellen Zelloberflächen mittels Kontaktwinkelmessung mit der sogenannten *sessile drop*-Methode [Busscher 1984].

#### 2.1.2.1.3 Freie Oberflächenenergie

Die treibende Kraft der initialen Phase der bakteriellen Adhäsion wird der freien Oberflächenenergie zugeschrieben. Die Oberflächenenergie ist ein Maß für die Energie, die zum Aufbrechen von chemischen Bindungen notwendig ist, wenn eine neue Oberfläche eines Festkörpers oder einer Flüssigkeit erzeugt wird. Sie ist definiert als die Energie, die zum Erzeugen der Oberfläche je Flächeneinheit aufgewendet werden muss [Meschede 2006]. Freie Oberflächenenergie entsteht aufgrund einseitiger Krafteinwirkung auf oberflächennahe Moleküle [Scheie 1994].

Der Grund für das Verhalten der Oberflächen und Bakterien liegt in ihrem molekularen Aufbau. Jedes Molekül besteht aus einer hydrophilen polaren Gruppe und einem hydrophoben Molekülrest. Hydrophobe Moleküle bestehen aus Kohlenwasserstoffketten mit unterschiedlicher Anzahl an C-Atomen. Zu den hydrophilen Gruppen zählen Carbonyl- und Carboxylgruppen. Aufgrund der Reaktionsfreudigkeit von hydrophilen Gruppen besitzen hydrophilere Oberflächen eine höhere freie Oberflächenenergie [Atkins 2001].

Die Bedeutung der freien Oberflächenenergie ( $\sigma_{sv}$ ) des Substrates für die bakterielle Adhäsion kann anhand der Formel für die freie Oberflächenenergie  $\Delta G_{adh} = \sigma_{sb} - \sigma_{sl} - \sigma_{bl}$  abgeleitet werden [Absolom 1983]. Die freie Energie der Adhäsion  $\Delta G_{adh}$  wird als Funktion der freien Oberflächenenergie des Substrates ( $\sigma_{sv}$ ) berechnet [Absolom

1983]. Der Wert der Oberflächenenergie wird in  $\text{J/m}^2 = \text{Nm/m}^2 = \text{N/m}$  oder in Bruchteilen davon in  $\text{mN/m}$  gemessen [Atkins 2001].

Aus dieser Funktion kann man ableiten, dass es zu einer erhöhten Adhäsion auf niedrigenergetischen (hydrophoben) Substraten kommt, wenn  $\sigma_{\text{lv}} > \sigma_{\text{bv}}$  ist. Wenn allerdings  $\sigma_{\text{lv}} < \sigma_{\text{bv}}$  ist, zeigt sich ein entgegengesetztes Verhalten, d. h. eine erhöhte Adhäsion auf hochenergetischen (hydrophilen) Substraten. Für den Fall, dass  $\sigma_{\text{lv}} = \sigma_{\text{bv}}$  ist, wird  $\Delta G_{\text{adh}} = 0$  unabhängig vom Wert der freien Oberflächenenergie ( $\sigma_{\text{sv}}$ ) des Substrates [Quirynen 1995].

QUIRYNEN & BOLLEN konstatierten, dass Plaque sich zu einem höheren Maß auf hochenergetischen Oberflächen ansammelt und fester bindet [Quirynen 1995]. Dies begünstigt die bakterielle Anheftung besonders der meisten oralen Mikroorganismen, die eine hohe freie Energie besitzen [Quirynen 1995, Weerkamp 1985]. Beeinflusst wird die freie Oberflächenenergie durch die Pellikelbildung. Eine Reduktion der freien Oberflächenenergie auf Oberflächen der Mundhöhle führt demnach zu einer Verringerung der bakteriellen Adhäsion und zu einer verlangsamten Plaquebildung [Pratt-Terpstra 1989, Scheie 1994].

#### 2.1.2.1.4 Zeta-Potential

Ein weiteres Kriterium der bakteriellen Adhäsion ist das Zeta-Potential, das die elektrokinetischen Eigenschaften bestimmt. Darunter ist das nach außen wirksame Potential von Teilchen an der Grenzfläche zweier nicht mischbarer Phasen zu verstehen [Olsson 1976b]. Das Zeta-Potential (auch  $\zeta$ -Potential) ist das elektrische Potential an der Abscherschicht eines bewegten Partikels in einer Suspension. Das elektrische Potential beschreibt die Fähigkeit eines Feldes, Kraft auf andere Ladungen auszuüben [Atkins 2001].

Das Zeta-Potential hängt von den Charakteristika der Ionengruppen auf der Oberfläche sowie dem pH-Wert des suspendierenden Mediums ab.

Die Faktoren Hydrophobie, freie Oberflächenenergie und Zeta-Potential beeinflussen sich gegenseitig. VAN LOOSDRECHT *et al.* beschreibt, dass das Zeta-Potential der Mikroorganismen mit abnehmender Hydrophobie steigt sowie eine geringe Oberflächenenergie und damit verbundene hohe Hydrophobie eine bakterielle Anheftung fördert [Van Loosdrecht 1990].

### 2.1.2.2 Spezifische Faktoren der mikrobiellen Adhäsion an Oberflächen

Die irreversible Adhäsion wird durch spezifische Wechselwirkungen zwischen komplementären Molekülen auf der Oberfläche des Mikroorganismus bzw. des Pellikel bestimmt. Die molekularen Bestandteile der Bakterien, die bei der Adhäsion eine Rolle spielen, werden Adhäsine genannt, während die des Wirtes als Rezeptoren bezeichnet werden. Auf einer Bakterienzelle können verschiedene Adhäsine exprimiert sein, die stereochemisch an komplementären Rezeptoren der Oberfläche des Wirtes binden können [Scheie 1994]. Den Bakterien ist es auch möglich Rezeptoren für Adhäsine für mikrobielle Zelltypen zu exprimieren, die für die Anheftung zwischen Zellen verwendet werden. Eine große Anzahl der Adhäsine sind Lektine, die sich an kohlenhydrathaltige Rezeptoren auf Oberflächen binden. Diese bakteriellen Adhäsine befinden sich häufig auf Oberflächenstrukturen wie Fimbrien oder Fibrillen, die meist hydrophobe, unpolare Aminosäureseitenketten aufweisen [Bos 1999, Hultgren 1993, Scheie 1994]. Bei den meisten oralen Streptokokken kommen zudem Adhäsine der Antigen-I/II-Familie der Polypeptide vor, die in der Zelloberfläche verankert sind. Diese multifunktionellen Adhäsine besitzen verschiedene Bindungsstellen für Rezeptoren und können an menschliche Glykoproteine im Speichel, an Calcium und an andere Mikroorganismen binden. Glukosyltransferasen stellen eine weitere Gruppe bakterieller Adhäsine dar und können mit Rezeptoren im Pellikel, wie blutgruppenspezifischen Proteinen, oder mit adsorbierten Glukanen und Dextranen wechselwirken [Marsh 1999]. Einige grampositive orale Bakterien besitzen eine Lipoteichonsäure und es konnte gezeigt werden, dass Lipoteichonsäure mit blutgruppenspezifischen Substanzen im Pellikel interagieren. Da im Pellikel Antikörper nachweisbar sind, wirken eine Reihe von Antigenen unter Umständen indirekt auch als Adhäsine [Marsh 1999]. Es ist bekannt, dass einige Adhäsine ein lipidhaltiges Ende besitzen und auf diese Weise in der Zellmembran verankert sind. Diesen Lipoproteine könnten an immobilisierte Substanzen im Pellikel und andere bakterielle Zelloberflächen binden [Marsh 1999]. Studien haben gezeigt, dass besonders saure, prolinreiche Speichelproteine die mikrobielle Adhäsion an der Schmelzoberfläche fördern [Gibbons 1989]. Der Bindung des Proteins an die Hydroxylapatitkristalle des Zahnschmelzes dient das saure N-terminale Segment des Moleküls [Bennick 1979, Bennick 1987], während das C-terminale Segment die spezifische Adhärenz der Mikroorganismen gewährleistet [Hannig 1998]. Die sauren, prolinreichen Proteine durchlaufen

während der Adsorption an mineralischen Oberflächen Konformationsänderungen oder auch enzymatisch bedingten Modifikationen. Auf diese Weise werden spezifische molekulare Segmente freigelegt, die von oralen Mikroorganismen als Rezeptoren genutzt werden können und als „Kryptitope“ bezeichnet werden, allerdings bei gelösten Proteinen im Molekülinneren verborgen bleiben [Gibbons 1989].

### **2.1.3 Bakterielle Adhäsion auf zahnärztlichen Restaurationsmaterialien**

Klinische Untersuchungen konnten bisher nicht eindeutig klären ob die Adsorption von Proteinen und die anschließende bakterielle Adhäsion auf Restaurationsoberflächen mit den Adhäsionsprozessen auf der Zahnoberfläche übereinstimmen oder anderen Gesetzmäßigkeiten unterliegen. In zahlreichen Studien wurden die gebräuchlichsten dentalen Materialien auf ihre Tendenz zur bakteriellen Adhäsion untersucht [Grivet 2000, Kawai 2001a, Satou 1988, Carlén 2001, Montanaro 2004, Radford 1998, Suljak 1995, Svanberg 1990, Tanner 2000, Taylor 1998b] und konnten zeigen, dass die verschiedenen zahnärztlichen Restaurationsmaterialien nicht im gleichen Maße zur Ausprägung mikrobieller Beläge neigen [Hahn 1992, Hahn 1993, Krämer 1989, Krämer 1990, Van Dijk 1987]. Während keramische Massen oder Glaskeramiken in geringerem Umfang als Zahnhartsubstanz besiedelt werden, weisen Kunststoffe und Kompositmaterialien eine starke Tendenz zur Akkumulation der bakteriellen Plaque auf [Chan 1986, Hahn 1993, Krämer 1990, Lundin 1989, Savitt 1987, Shahal 1998]. Hydrophile Oberflächen, wie Zahnschmelz oder Keramik weisen eine reversible Proteinadsorption auf, wogegen sie auf unpolaren Oberflächen irreversibel ist. Moderne Dentalkomposite enthalten relativ hydrophobe Monomere, wie Bisphenol-A-Glycidyl-Methacrylat und Urethandimethacrylat, die eine geringe Wasseraufnahme und eine geringe Quellung ermöglichen. Die wissenschaftlichen Aussagen bezüglich der Plaqueformation und der Hydrophobizität von Substratoberflächen sind widersprüchlich. Einige Studien berichten das vermehrte Auftreten dentaler Plaque auf hydrophilen Restaurationsmaterialien, wie Porzellan und Metall im Vergleich zu hydrophoben Oberflächen wie Amalgam und Komposite [Quirynen 1995, Olsson 1992]. SULJAK *et al.* untersuchten die Adhäsion von Bakterien zu Amalgam und Kompositen *in vitro*. Es konnte eine Korrelation zwischen steigender Hydrophobizität

der Bakterienoberfläche und erhöhter Retention dieser auf den hydrophoben Substratoberflächen nachgewiesen werden. Ein statistischer Unterschied der Adhäsion zu Amalgam gegenüber Komposite bestand nicht [Suljak 1995]. MONTANARO *et al.* betrachteten das Adhäsionsverhalten von *S. mutans* an Restaurationsmaterialien wie Komposite, Glasionomerezemente, Compomere und Ormocere. Mit Ausnahme der Ormocere und des Glasionomerezementes Fuji IX, welche in einem höheren Maß zur Adhäsion neigten, zeigten die untersuchten Materialien eine ähnliche Neigung zur bakteriellen Adhäsion [Montanaro 2004]. VAN LOOSDRECHT *et al.* sprechen von einer erhöhten Plaquebildung auf hydrophoben Materialien [Van Loosdrecht 1987b]. Weitere Studien haben gezeigt, dass konvergierende Werte der Hydrophobizität für bakterielle und Substratoberflächen die mikrobielle Adhäsion erleichtern [Grivet 2000, Satou 1988, Satou 1991, Weerkamp 1985]. Untersuchungen von GRIVET *et al.* zur Auswirkung der Hydrophobizität auf die Adhäsion von Streptokokken auf dentalen Legierungen *in vitro* unterstreichen die signifikante Korrelation zwischen bakterieller Adhäsion und Hydrophobizität der Substratoberfläche. *Streptococcus oralis* (*S. oralis*), *S. sanguis*, *S. mutans* waren hydrophob, *S. mitis* war hydrophil. *S. oralis*, der hydrophobere Stamm zeigte die größte Adhäsion auf den untersuchten Materialien, dagegen wurden für *S. mitis* die geringsten Adhäsionswerte auf hydrophoben Oberflächen gefunden [Grivet 2000]. SATOU *et al.* kamen aufgrund ihrer Untersuchungen zu dem Schluß, dass die Hydrophobizität der Restaurationmaterialien Komposite, Amalgam und Au-Ag-Pd-Legierung einen Zusammenhang zur Menge der adhärenen Zellen von *S. sanguis* zeigten. Es wurde vermutet, dass hydrophobe Wechselwirkungen einen Einfluss auf die Adhäsion dieser Bakterienspezies haben. Im Gegensatz dazu zeigte die Zahl der adherenten Zellen von *S. mutans* eine Korrelation zum Zeta-Potential der Materialoberfläche. Das lässt auf die Bedeutung der elektrostatischen Wechselwirkungen für das Adhäsionsverhalten dieser Bakterienspezies schließen [Satou 1988].

Kunststoffe unterliegen in der Mundhöhle durch thermische, chemische und mechanische Einflüsse einem Alterungsprozess, wodurch Risse und mechanische Läsionen entstehen können [Krämer 1989]. Dies erklärt zum einen ein vermehrtes Auftreten gingivaler Entzündungen an Rändern von Kompositfüllungen [Hammer 1979, Van Dijk 1987, Van Dijken 1987], zum anderen belegen zahlreiche klinische prospektive und retrospektive Studien, dass Sekundärkaries die häufigste Ursache

für die Erneuerung von Füllungen im bleibenden Gebiss und bei Restaurationen mit weniger als vier Flächen ist [Deligeorgi 2001, Friedl 1994]. Zur Erklärung der unterschiedlichen bakteriellen Besiedlung der Materialien werden einerseits Differenzen im Oberflächenprofil der verschiedenen Werkstoffe [Adamczyk 1990], andererseits materialspezifische Charakteristika der Werkstoffoberflächen herangezogen [Pratt-Terpstra 1987, Pratt-Terpstra 1989, Van Dijk 1987, Weerkamp 1989]. CARLÉN *et al.* untersuchten den Einfluss der Politur auf die Rauigkeit und die chemische Zusammensetzung von Glasionomermaterial- und Kompositoberflächen. Bei unpolierten Glasionomermaterialien traten höhere Oberflächenrauigkeiten auf und es wurden auf deren Oberflächen mehr anorganische, positiv geladene Komponenten gefunden. Die Politur der Kompositoberflächen führte bei dieser Untersuchung zu einer Zunahme der Biofilmbildung [Carlén 2001]. Die Auswirkungen der Oberflächenbearbeitung von dentalen Materialien auf die Retention oraler Mikroorganismen wurden von TAYLOR *et al.* untersucht. Es wurde die Adhäsion von *S. oralis*, *A. viscosus* und *Candida albicans* (*C. albicans*) auf polierten, sandgestrahlten und elektropolierten Kobalt-Chrom-Legierungen und Acryl-Kunststoffen ermittelt. TAYLOR *et al.* kamen zu dem Ergebnis, dass die Zellgröße und die Art der Rauigkeit einen signifikanten Einfluss auf die Retention von Mikroorganismen auf Oberflächen hat [Taylor 1998b].

RADFORD *et al.* beschäftigten sich bei ihren Untersuchungen mit der Adhäsion von *C. albicans* auf Prothesenmaterialien. Sie kamen zu dem Schluss, dass raue Oberflächen die Adhäsion von *C. albicans in vitro* fördern, jedoch Speichel einen reduzierenden Effekt auf die Adhäsion hat [Radford 1998].

Diskutiert werden auch mögliche antibakterielle Effekte der Füllungsmaterialien, die beispielsweise bei metallischen Restaurationen [Augthun 1988], bei Fluorid freisetzenden Materialien [Kawai 2001a, Friedl 1997] sowie bei Werkstoffen mit sogenannten antibakteriellen Zusätzen [Ebi 2001] von Bedeutung sind. FRIEDL *et al.* untersuchten den Einfluss der Fluoridfreisetzung auf das Wachstum von *S. mutans*. Die untersuchten Glasionomermaterialien zeigten eine gute Korrelation zwischen Fluoridfreisetzung und dem Einfluss auf das Bakterienwachstum, wobei die Wirksamkeit nach 180 Tagen deutlich abnahm [Friedl 1997]. KAWAI *et al.* betrachteten in ihrer Studie die Inhibition der Bakterien- und Glukanadhäsion an lichthärtenden fluoridfreisetzenden Füllungsmaterialien. Nach 24 Stunden zeigten

Glasionomerzemente und Compomere signifikant geringere Mengen adhärenter Bakterien und Glukane als Kompomere [Kawai 2001a].

## **2.2 Testverfahren**

Die Durchführung von Bakterienanlagerungstests auf unterschiedlichen dentalen Materialien hat zum Ziel, eine realistische Wiedergabe sowohl physiologischer als auch pathogener Bedingungen zu simulieren. Grundsätzlich werden zwei Versuchsaufbauten unterschieden: *in vivo* und *in vitro* Versuchsverfahren.

### **2.2.1 *In vivo* Testverfahren**

Bei *in vivo* Versuchsaufbauten werden die Probekörper in der Mundhöhle befestigt um sie den physiologischen Gegebenheiten dieses Milieus auszusetzen. Es besteht die Möglichkeit die zu untersuchenden Materialien entweder dauerhaft in den Zahn als Füllung bzw. Einlagerrestauration einzubringen oder temporär über herausnehmbare Apparaturen dem oralen Milieu auszusetzen. KRÄMER *et al.* integrierten bei ihren Untersuchungen die Proben in einer Oberkiefertiefziehschiene und beließen sie dort verschiedene Tragezeiten lang [Krämer 1990]. KREKELER *et al.* verwendeten bei Ihren Untersuchungen über die Affinität von Plaque zu verschiedenen Werkstoffen individuell gegossene Unterkieferbügel mit den Proben an der lingualen Schleimhautseite [Krekeler 1984]. GRIMM dagegen arbeitete mit einer experimentellen Brücke, die mit Geschieben für die Probekörper versehen war [Grimm 1989]. HANNIG verwendete zur Befestigung der Probekörper entfernbare Splints an den oberen 1. Molaren bukkal und palatinal [Hannig 1997].

Die Ergebnisse von *in vivo* Versuchsaufbauten sind interindividuell und auch intraindividuell (z. B. orale und bukkale Unterschiede) verschieden und sind somit nicht standardisierbar und vergleichbar [Hannig 1997].

### **2.2.2 *In vitro* Testverfahren**

*In vitro*-Testverfahren versuchen, die natürlichen Gegebenheiten im Labor zu imitieren. Man unterscheidet zum Einen zwischen statischen Versuchsaufbauten sowie Fließskammerkonditionen [An 2001, Busscher 1995b, Roosjen 2005, Rosentritt 2008] und zum Anderen zwischen reinen Bakterienanlagerungstests

[Bürgers 2007, Faltermeier 2007] und Versuchsaufbauten bei denen künstliche Pellikel auf die Proben aufgebracht werden [Hahnel 2008, Carlén 2001].

Maßgeblich für die Versuchsbedingungen der *in vitro* Adhäsion von Mikroorganismen sind die zu untersuchenden Parametern sowie die Bakterienspezies. Zur Untersuchung der initialen Adhäsionvorgänge werden kürzere Inkubationszeiten der Proben von wenigen Stunden mit der jeweiligen Bakterienlösung [Satou 1988] beschrieben. Wogegen zur Untersuchung einer ausgereiften Plaque eine weitaus längere Inkubationszeit nötig ist, die zwischen ein bis drei Tagen betragen kann [Kawai 2001b].

In in-vitro Untersuchungen betrug die Inkubationszeit der zu untersuchenden Proben mit der Bakterienlösung, weniger als zwei Stunden [Olsson 1992, Carlén 2001]. Bei den Studien von SATOU *et al.* [Satou 1988] erfolgte die Inkubation über Zeiträume von zwei und bei MONTANARO *et al.* von vier Stunden [Montanaro 2004]. *In vivo* konnte eine signifikante Besiedlung der Oberflächen durch Kokken frühestens vier Stunden nach Exposition der Proben mit der Bakterienlösung nachgewiesen werden [Marsh 1999, Klimek 1999].

### **2.2.3 *Streptococcus mutans***

In Studien werden je nach Fokus der Untersuchungen unterschiedliche Keime getestet. So bieten sich *S. mutans*, *S. sanguis* sowie *S. mitis* neben *A. viscosus* und *A. naeslundii* für Untersuchungen zum Kariesrisiko an [Kayser 2001]. *S. mitis* [Palenik 1992], *S. oralis* [Olsson 1992], *S. sanguis* [Satou 1988, Suljak 1995, Palenik 1992], *S. goordinii* sind von besonderem Interesse, wenn das Augenmerk auf die sogenannten Frühbesiedler der Plaque gerichtet ist [Kawai 2001a, Kolenbrander 1993, Li 2004, Morgan 2001]. SULJAK *et al.* untersuchten die bakterielle Adhäsion auf Amalgam und Komposit mit dem Fokus der unterschiedlichen Hydrophobizität von *S. sanguis*, *Streptococcus salivarius* (*S. salivarius*) und *A. viscosus*. Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der steigenden Hydrophobizität der Bakterien und der Retentionsneigung auf hydrophoben Oberflächen [Suljak 1995]. PALENIK *et al.* befassten sich mit dem positiven Einfluss von fluoridfreisetzenden Glasionomeren auf die *in vitro* Inhibition des Bakterienwachstums und des

Adhäsionsverhaltens von *A. viscosus*, *S. mitis*, *S. mutans*, *Lactobacillus casei* (*L. casei*) und *S. sanguis* [Palenik 1992]. *S. mutans* spielt aufgrund seiner Stoffwechsel- und Adhäsionsleistung neben *Lactobazillen* und *Aktinomyzeten* eine besondere Rolle bei der Entstehung von Karies [Marsh 1995a]. Das hohe kariogene Potential konnte in zahlreichen Untersuchungen an tierischer und menschlicher dentaler Plaque nachgewiesen werden, so ergaben sich eine enge Korrelation zwischen der Anwesenheit von *S. mutans* und einer hohen Kariesaktivität [Englander 1972, Krasse 1968]. *S. mutans* ist fähig extrazelluläre Glukane und Fruktane in Anwesenheit von Saccharose mittels spezifischer Glukosyl- und Fructosyltransferasen zu synthetisieren [Hellwig 2003, Kayser 2001]. Auf diese Weise wird eine Adhäsion dieser gram positiven fakultativ anaeroben Kokke an der Schmelzoberfläche sowie die Etablierung einer adhäsiven und hochgradig kariogenen Plaque möglich. Eine weitere Fähigkeit stellt die Bildung organischer Säuren in Form von Laktat und Pyruvat über anaerobe Glykolyse dar, die bei entsprechender Expositionsdauer die Zahnhartsubstanz demineralisieren. Zudem ist dieser Mikroorganismus in der Lage intrazelluläre Polysaccharide zu bilden, die ihm ermöglichen seinen Stoffwechsel auch bei mangelnder Substratzufuhr aufrechtzuerhalten [Hellwig 2003]. Im Gegensatz zu anderen oralen Bakterien ist *S. mutans* säuretolerant, d.h. er ist in der Lage in auch in saurer Umgebung, bei  $\text{pH} < 5,5$  in der dentalen Plaque zu existieren sowie organische Säuren zu synthetisieren und diese entgegen den Konzentrationsgradienten aus dem Zellinneren aktiv zu transportieren [Hellwig 2003].

#### **2.2.4 Quantifizierung von Bakterienanlagerung**

Für die Quantifizierung von adhärenenten Bakterien werden eine Reihe von verschiedenen Techniken verwendet, unter anderem die *situ* Visualisierung durch Epifluoreszenzmikroskopie, Konfokale Laser- Raster- Mikroskopie, Raster-Elektronen- Mikroskopie und Rasterkraftmikroskopie [Ahimou 2007, Fang 2000, Hannig 2007, Müller 2007, Shahal 1998]. Zudem gibt es Möglichkeiten der indirekten Technik der Quantifizierung von Mikroorganismen nach der Entfernung von Oberflächen, zu denen zählen die Zählung per Szintillation von radioaktiv markierten Organismen [Kawai 2001a, Steinberg 1999] sowie die Quantifizierung von Metaboliten (5-cyano-2,3-ditolyltetrazoliumchlorid) [An 1997, Kawai 2001a] und die

Zählung mit Hilfe des sogenannten *Coulter Counter*, der Zytofluorometrie [Logan 1998, Pils 2006] oder der Spektrophotometrie [An 1997]. Eine simple Methode für die Bestimmung des Wachstums von Bakterienkolonien besteht in der kulturellen Anzucht auf Agar Platten. Die Bakterien werden von den Proben abgelöst, auf dem Agar ausgestrichen und die nach einer bestimmten Zeit entstandenen Kulturen visuell ausgewertet [Fijan 2005, Olsson 1976a]. Weniger häufig finden Auswertmethoden wie die Gewichtsbestimmung der Plaque und die optisch mikroskopische Planimetrie Verwendung. Eine weitere angewendete Methode der Auswertung stellt die Visualisierung mit dem Rasterelektronenmikroskop mit einer anschließenden Computer gestützten oder manuellen Auszählung dar [Satou 1988, Satou 1991, Tanner 2000].

Die Resazurin-Reduktionsmethode stellt eine weitere Quantifizierungstechnik für adhärente Mikroorganismen dar. Die Resazurin-Reduktionsmethode gilt als ein etabliertes und einfaches Verfahren zum Nachweis der Zellproliferation bei Bakterien [Baker 1994, Bürgers 2007, Collins 1997, Faltermeier 2007, Novak 1993], Hepatozyten [Slaughter 1999] und Lymphozyten [Ansar 1994, Fries 1995]. In Untersuchungen wurde eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der lebenden Mikroorganismen mit metabolisch aktiven Zellen und der Reduktion des Resazurin zu fluoreszierenden Resorufin nachgewiesen [Nakayama 1997, O'Brien 2000, Voytik-Harbin 1998]. Chemisch, wird oxidiertes (blaues) und nicht fluoreszierendes Resazurin (Almar blue) (Absorptionsmaximum bei 605 nm) zu Resorufin (pink) (Absorptionsmaximum bei 573 nm), welches in hohem Maße fluoreszierend ist reduziert [Collins 1997, Fields 1993, Nakayama 1997]. Der genaue Mechanismus dieser nicht toxischen Reduktion ist nicht genau bekannt, man vermutet eine intrazelluläre oder an der Plasmaoberfläche stattfindende Enzymaktivität oder eine im Medium stattfindende chemische Reaktion [Batchelor, Goegan 1995, Maeda 2001, O'Brien 2000, Voytik-Harbin 1998]. Es scheint eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der lebenden Mikroorganismen mit metabolisch aktiven Zellen und der Reduktion des Resazurin zu fluoreszierenden Resorufin zu bestehen [Nakayama 1997, O'Brien 2000, Voytik-Harbin 1998]. Mit Hilfe dieser Reaktion, sichtbar durch die Fluoreszenzfärbung ist es möglich das quantitative Ausmaß der bakteriellen Adhäsion auf festen Oberflächen zu ermitteln [Bürgers 2007, Collins 1997, O'Brien 2000].

## 2.3 Silanhaftvermittler

Silane sind siliziumorganische Verbindungen, die einen funktionellen organischen und einen anorganischen Molekülanteil besitzen. Der organische Molekülanteil (z. B. Vinyl  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ , Allyl  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ , Amino  $-\text{NH}_2$ , Isocyanato  $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ ) kann mit einer organischen Matrix polymerisieren, die Alkoholgruppe (z.B. Methoxy  $-\text{O}-\text{CH}_3$ , Ethoxy  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ) kann mit anorganischen Substraten reagieren und kovalente Bindungen zwischen den unterschiedlichen Matrices werden gebildet [Matinnlinna 2004a].

Zur Silanisierung von Metall- oder Keramikoberflächen sowie zum Verbund mit dem Füllstoff der Komposite wird im Dentalbereich vornehmlich 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan verwendet (siehe Abbildung 1). Über die Si-OH-Gruppen erfolgt die Reaktion mit dem Füllstoff bzw. der Metall- oder Keramikoberfläche; über die Methacrylatgruppe erfolgt die Verbindung zur Kunststoffmatrix (siehe Abbildung 2) [Eichner 1996, Plueddemann 1982].

Abbildung 1: Grundlegende Struktur eines Silanhaftvermittlers am Beispiel von 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan ((1) anorganische Gruppe, (2) Verbinder, (3) organische Gruppe)

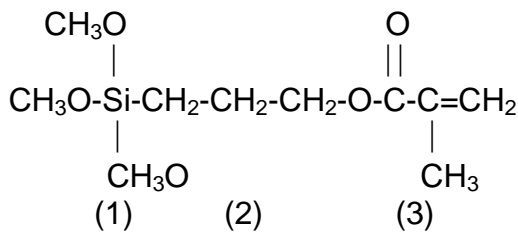
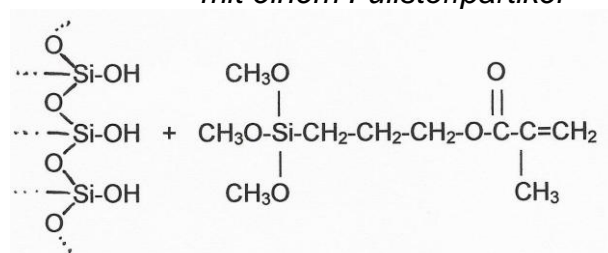
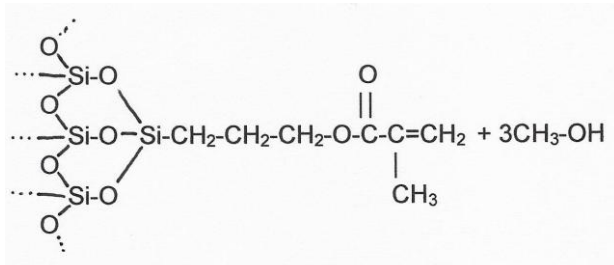


Abbildung 2: Chemische Reaktion von 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan mit einem Füllstoffpartikel



Glas oder Silikatoberfläche + 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan  
mit Silanolgruppen





silanisierter Füllstoffpartikel + abgespaltenes Methanol

Während die reaktive Alkoxygruppe mit Silanolgruppen an der Silicat- oder Glaspartikeloberfläche unter Abspaltung von Alkohol verestert, copolymerisieren die ungesättigten Vinyl- oder Methacrylgruppen mit den Monomeren und Comonomeren der Kunststoffmatrix [Braden 1997, Eichner 1996, Plueddemann]. Die anorganischen Füllkörper von Kompositen weisen in der Regel eine hydrophile Oberfläche auf und sind mit Hydroxyl- oder Sauerstoffatomen bedeckt. Die Monomermatrix hat dagegen einen stark hydrophoben Charakter. Mit dem Silanhaftvermittler werden Wechselwirkungen zwischen ihnen geschaffen, die einen Verbundwerkstoff entstehen lassen. Silane können sowohl hydrophil als auch hydrophob sein [Eichner 1996].

### 3 Fragestellung

Ziel der vorliegenden *in vitro*-Arbeit war die quantitative Untersuchung der Adhäsion von *Streptococcus mutans* an chemisch unterschiedliche Silanhaftvermittler.

Im Vorversuch sollte ein Nachweis für die tatsächliche Silanbeschichtung der Trägeroberflächen mit Hilfe der Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FT/IR) und der Kontaktwinkelmessung erbracht werden. Zusätzlich sollte ein geeigneter Versuchsaufbau für die Bakterienquantifizierung auf Silanoberflächen gefunden werden.

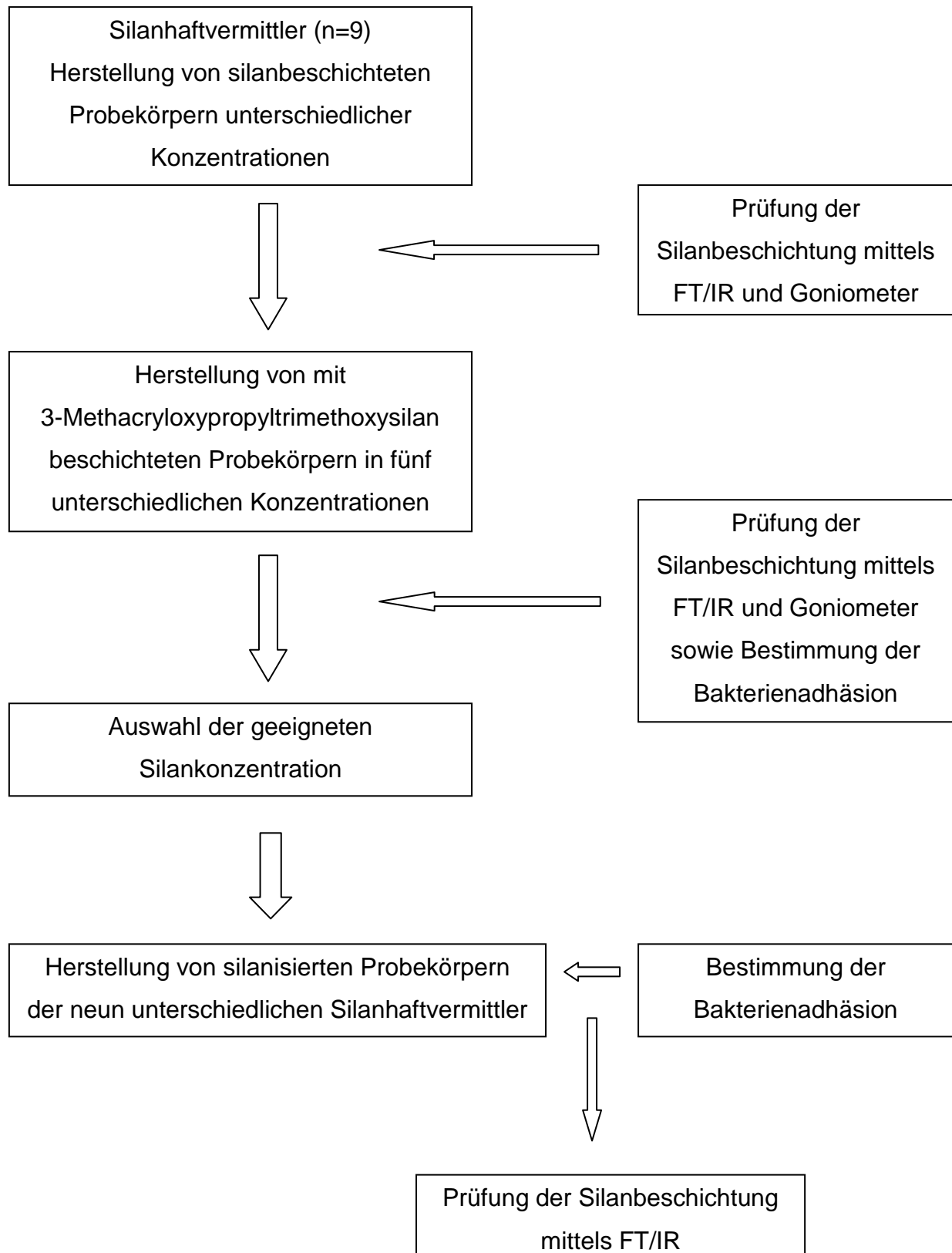
Ziel der anschließenden Hauptversuche war die Klärung folgender Fragen:

- Ist die Adhäsion von *S. mutans* abhängig von der Konzentration des Silans?
- Ist die Adhäsion von *S. mutans* abhängig vom Typ des verwendeten Silans?
- In welchem Maß beeinflusst die Silanisierung die Oberflächeneigenschaften (Rauigkeit, Hydrophobie, Struktur) des Trägermaterials?

Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Quantität der adhärenenten Bakterien und den spezifischen Eigenschaften der silanisierten Oberfläche (Rauigkeit, Hydrophobie, Struktur)?

## 4 Material und Methoden

Abbildung 3: Versuchsdesign im Überblick



## 4.1 Materialien

### 4.1.1 Mikroorganismen

In sämtlichen Adhäsionsversuchen wurde als Testkeim *Streptococcus mutans* (NCTC 10449; DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) eingesetzt.

### 4.1.2 Silane und Probenkörper

Zur Untersuchung der bakteriellen Adhäsion von *S. mutans* auf Silanoberflächen, wurden 9 chemisch unterschiedliche Silanverbindungen verwendet. Unbehandelte Glasplättchen (Cover Glasses No. 1 Ø 10mm, 12mm, 15mm; Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) dienten als Referenzmaterialien (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Verwendete Silane

Kenn-nummer	Produkt	Hersteller
1	3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan	ABCR GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
2	3-Methacryloxypropylmethyldimethoxysilan	ABCR GmbH & Co. KG
3	3-Methacryloxypropyldimethylmethoxysilan	ABCR GmbH & Co. KG
4	3-Methacryloxypropyltriethoxysilan	ABCR GmbH & Co. KG
5	3-Methacryloxypropyltrichlorosilan	ABCR GmbH & Co. KG
6	3,3,3-(trifluor)propyltrimethoxysilan	ABCR GmbH & Co. KG
7	3-Aminopropyltrimethoxysilan	ABCR GmbH & Co. KG
8	O-(Methacryloxyethyl)-N-triethoxysilylurethan	ABCR GmbH & Co. KG
9	3-(trimethoxysilyl)-propyldimethyloctadecylammoniumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

### 4.1.3 Chemikalien und Lösungen

- Ethanol (Merk/ Chemikalienausgabe, Darmstadt, Deutschland)
- Methanol (Merk/ Chemikalienausgabe)

- 3mM Resazurin-Lösung (Resazurin Natriumsalzes mit Zertifikat, Indikator pH 3,8- 6,5: Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- Das Medium für *S. mutans* (TS-Medium 92) bestand aus Trypticas soy broth (30,0 g) und Yeast extract (3,0 g) (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA) auf 1000 ml *Aqua destillata*.
- Der verwendete PBS-Puffer wurde durch Lösen einer Phosphate Buffered Saline Tablette (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in 200 ml *aq. dest.* hergestellt.

#### 4.1.4 Geräte und technisches Material

- Eppendorf-Pipetten (Netheler & Hinz GmbH, München, Deutschland)
- Eppendorf-Pipetten-Spitzen (100/1000 µl) (Greiner Labortechnik, München, Deutschland)
- FTIR Spectrometer Jas.co FT/IR (Jas.co Hachioji, Tokyo, Japan)
- Leit-c-Plast (Plano W. Plannet GmbH, Marburg, Deutschland)
- Magnetrührgrät, IKAMAG Rec-G (Ika-Labortechnik, Staufen im Breisgau, Deutschland)
- Durchlicht-Mikroskop (Carl Zeiss West GmbH, Oberkochen, Deutschland)
- Mikroskop für goniometrische Messungen (Microskop Erma, Tokio, Japan)
- Multi-Detektor Fluoreszenz Lesegerät (Fluostar optima, bmg-Labtech, Offenburg, Deutschland)
- Photometers, Genesys 10nV Scanning (Thermo Spectronic, Rochester NY, USA)
- Pipette des Goniometers (Microlab RP, Hamilton, USA)
- Polyethylenscheiben Erkodur Stärke 1,0 mm (Erkodent Erich Kopp GmbH, Pfalzgrafenweiler, Deutschland)
- Probeträger, Alu-Stubs (Fa Provac GmbH, Oestrich Winkel, Deutschland)
- Pumpe, KNF Neuberger Laboport (KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland)
- Rasterelektronenmikroskop Cambridge Stereoscan 240 (Fa. LEO Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen, Deutschland)
- Rüttler Heidolph Reax top, (Heidolph-Elektro GmbH & Co.KG, Kehlheim, Deutschland)
- Schüttelinkubator Modell G 25 (New Brunswick Scientific Co. Inc, Edison, New Jersey, USA)

- Silikonkleber, UHU Silikon (UHU GmbH & Co. KG, Bühl, Deutschland)
- Sputtergerät für Goldbedampfung, Balzerunion SCD 040 (Balzer Union Limited, Balzers, Lichtenstein)
- Sterilbank HeraSafe (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Testschlittensystems Perthometer S6P (Feinprüf Perten GmbH, Göttingen, Deutschland)
- 48 Well Cell Culture Cluster ( Corning Incorporated, Corning NY, USA)
- Zentrifuge Rotixa/P (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen 10 ml (Becton Dickinson Microbiology Systems, Franklin Lakes, NY, USA)

#### **4.1.5 Software**

- Fluostar Optima Version 1.30.0 (BMG LabTech, Offenburg, Deutschland) für die Erfassung der Fluoreszenzwerte
- Spectra Analysis (Spectra Analysis Inc., Marlboroug, USA) für die Erfassung der FTIR-Messungen
- SPSS für Windows Version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) für die statistische und graphische Darstellung der Versuchsergebnisse
- Tabellenkalkulation Excel Version 5.0 (Microsoft, Seattle, USA) für die Auswertung und graphische Darstellung der FTIR-Messungen

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Versuchsvorbereitung**

#### *4.2.1.1 Probenherstellung*

Die verwendeten Glasplättchen entsprachen einer Materialstärke von 0,13 - 0,16 mm und wurden in zwei unterschiedlichen Durchmessern (10 mm, 12 mm) verwendet. Vor der Beschichtung mit den Silanverdünnungen wurden die Glasplättchen mit *aq. dest.* gereinigt und anschließend bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die Glasplättchen mit einem Durchmesser von 12 mm wurden für die goniometrischen Messungen und die Fourier-Transform Infrarot Spektroskopie (FT/IR) verwendet, da

Proben mit diesem Durchmesser spaltfrei in das entsprechende Gerät eingespannt werden konnten. Für die Adhäsionsversuche wurden die Glasplättchen mit dem Durchmesser von 10 mm verwendet.

Die Silanhaftvermittler lagen in den vorgegebenen Konzentrationen als Stammlösungen vor (siehe Tabelle 2). Die Silane 1-8 wurden mit Ethanol (Merk/ Chemikalienausgabe), Silan 9 mit Methanol (Merk/ Chemikalienausgabe) verdünnt. Es wurden auf diese Weise Silankonzentrationen von jeweils 0,5 %, 2,5 %, 5,0 % erstellt. Für Silan 1 wurden zusätzlich Lösungen von 10 %, 15 %, 20 % hergestellt. Für die FT/IR und die Kontaktwinkelmessungen wurden zwei Gruppen gebildet. Gruppe 1 umfasste alle Silanverbindungen in den jeweiligen Konzentrationen als einfache Beschichtung auf Glas. Bei Gruppe 2 wurde eine dreimalige Beschichtung durchgeführt.

Für Gruppe 1 wurden von jeder Silanverbindung 4 Proben für jede Verdünnung hergestellt. Dazu wurden die Glasplättchen nach der Reinigung auf Metallgittern platziert, mit einer Pipette (Netheler & Hinz GmbH) wurden jeweils 40 µl auf jedes Plättchen aufgetragen und diese unter einem Abzug für mindestens 24h getrocknet. In Gruppe 2 wurden jeweils 4 Proben für jede Kombination aus Silan und Konzentration angefertigt. Die Silanverdünnungen (jeweils 40 µl) wurden mit einer Pipette dreimal in einem zeitlichen Abstand von jeweils einer Stunde aufgetragen. Nach der letzten Applikation wurden die Proben für mindestens 24 h zum Trocknen unter dem Abzug belassen.

Für die Adhäsionsversuche wurden Glasplättchen mit einem Durchmesser von 10 mm mit 27,8 µl der jeweiligen Silanverbindung und entsprechender Konzentration beschichtet.

Tabelle 2: Verwendete Silanhaftvermittler

Nr.:	Chemische Bezeichnung	CAS-Nr.	Summenformel	Strukturformel	Konzentration der Stammlösung
1	3-Methacryloxypropyl-trimethoxysilan	2530-85-0	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub> Si	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\     \\  \text{H}_2\text{C}=\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Si}(\text{OCH}_3)_3 \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $	98 %
2	3-Methacryloxypropylmethyl-dimethoxysilan	14513-34-9	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub> Si	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\     \\  \text{H}_2\text{C}=\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Si}(\text{OCH}_3)_2 \\    \qquad \qquad   \\  \text{CH}_3 \qquad \qquad \text{CH}_3  \end{array}  $	97 %
3	3-Methacryloxypropyldimethyl-methoxysilan	66753-64-8	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> Si	$  \begin{array}{c}  \text{O} \qquad \qquad \text{O} \\     \qquad \qquad    \\  \text{H}_2\text{C}=\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Si}(\text{OCH}_3) \\    \qquad \qquad   \qquad \qquad   \\  \text{CH}_3 \qquad \qquad \text{CH}_3 \qquad \qquad \text{CH}_3  \end{array}  $	95 %
4	3-Methacryloxypropyl-triethoxysilan	21142-29-0	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub> Si	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\     \\  \text{H}_2\text{C}=\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3 \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $	100 %
5	3-Methacryloxypropyl-trichlorosilan	7351-61-3	C <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub> Si	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\     \\  \text{H}_2\text{C}=\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Si}(\text{Cl})_3 \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $	95 %
6	3,3,3- (trifluor)propyl-trimethoxysilan	429-60-7	C <sub>6</sub> F <sub>3</sub> H <sub>13</sub> O <sub>3</sub> Si	(F) <sub>3</sub> C-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -Si(OCH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	100 %
7	3-Aminopropyltrimethoxysilan	13822-56-5	C <sub>6</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub> Si	H <sub>3</sub> N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -Si(OCH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	97 %
8	O-(Methacryloxyethyl)-N-triethoxysilylurethan		C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>7</sub> Si	$  \begin{array}{c}  \text{O} \qquad \qquad \text{O} \\     \qquad \qquad    \\  \text{H}_2\text{C}=\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}-\text{N}-\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3 \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $	90 %
9	3-(trimethoxysilyl)propyl-dimethyloctadecylammoniumchlorid	27668-52-6	C <sub>26</sub> H <sub>58</sub> NO <sub>3</sub> Si	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\     \\  \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Si}(\text{OCH}_3)_3 \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $	72 %

#### 4.2.1.1.1 Probenherstellung für Vorversuch 1 und 2 zur Messung des Einflusses der Konzentration auf die bakterielle Adhäsion von *S. mutans*

Der Einfluss der Konzentration der Silanlösung auf die mikrobielle Adhäsion von *S. mutans* wurde in Vorversuchen am Beispiel von 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan ( $\gamma$ -MPS) ermittelt. Hierzu wurden je 16 gereinigte Glasplättchen ( $\varnothing$  10 mm) mit 27,8  $\mu$ l 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan in den Konzentrationen 0,5 %, 2,5 %, 5,0 %, 10,0 %, 15,0 % beschichtet sowie 16 weitere gesäuberte Glasproben als Refrenzproben vorbereitet. Zusätzlich wurde jeweils eine Probe je Gruppe auf eine Polyethylenscheibe (Erkodur Stärke 1,0 mm, Erkodent Erich Kopp GmbH) geklebt, um es so leichter für Untersuchungen mit dem Rasterelekromikroskop (REM) entnehmen zu können. Diese Proben wurden nicht in die Fluostar-Auswertungen mit aufgenommen. Es wurden zwei Sätze von Proben angefertigt, um den Versuch als Kontrolle zu wiederholen.

#### 4.2.1.1.2 Probenherstellung für Hauptversuch 1 und 2 zur Ermittlung der bakteriellen Adhäsion an den Silanen Nummer 1-9

Es wurden jeweils 16 Glasplättchen ( $\varnothing$  10 mm) mit einer 5%igen Verdünnung der 9 Silane (siehe Tabelle 2) beschichtet. Die Plättchen für Silane 1-5, 7-9 wurden einmal mit 27,8  $\mu$ l der Silanverdünnung beschichtet. Die Plättchen für Silan 6 wurden dagegen drei Mal mit 27,8  $\mu$ l der Verdünnung von 3,3,3-(trifluor)propyltrimethoxysilan beschichtet (der zeitliche Abstand zwischen den Beschichtungswiederholungen betrugen jeweils eine Stunde.). 16 gereinigte, unbeschichtete Glasplättchen ( $\varnothing$  10 mm) wurden als Referenzproben in den Versuch aufgenommen. Jeweils eine Probe je Gruppe wurde auf einer Polyethylenscheibe (Erkodur Stärke 1,0 mm, Erkodent Erich Kopp GmbH) mit einem Durchmesser von 10 mm befestigt und nach dem Adhäsionsversuch als

Probe für die REM-Untersuchung entnommen. Auch für diesen Versuch wurden die Proben für einen Kontrollversuch zweimal angefertigt.

Für die oben genannten Anlagerungsversuche wurden die hergestellten Proben nach vollständiger Trocknung (mindestens 24 Stunden) mittels eines Silikonklebers, UHU Silikon (UHU GmbH & Co. KG) und einer Pinzette in ein 48 Well Cell Culture Cluster (Corning Incorporated) befestigt. Anschließend folgte eine Prüfung des festen Haltes der Proben in den Wells. Nach Trocknung des Klebers wurden in jedes Well je 1ml steriles *aq. dest.* pipettiert, und für 48 Stunden gelagert.

#### *4.2.1.2 Fourier-Transform Infrarot Spektroskopie (FT/IR)*

Zur Überprüfung der Beschichtung mit den Silanverdünnungen vor und nach den Adhäsionsversuchen wurde primär das Verfahren der Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FT/IR) herangezogen. Diese Methode ermöglicht es unbekannte Materialien zu identifizieren, die Qualität oder Beschaffenheit einer Probe zu analysieren und die Menge von Bestandteilen eines Gemisches zu bestimmen. Bei der Infrarot Spektroskopie (IFTR) wird der Probekörper mit Infrarotstrahlung bestrahlt. Ein Teil der Infrarotstrahlung wird vom Probekörper absorbiert und ein Teil der Strahlung transmittiert. Das resultierende Spektrum repräsentiert die molekulare Absorption und Transmission, die einen sogenannten Fingerabdruck des Probekörpers darstellt [Günzler 1996].

Vor jeder Messung des Transmissionsspektrums eines Probekörpers wird das sogenannte Background-Spektrum gemessen, welches charakteristisch für das Gerät selbst ist. Dies ist das Einstrahlspektrum, das die Energieverteilung der Lichtquelle, die Empfindlichkeit des Detektors und die Transmissionsfunktion des Spektrometers beinhaltet. Das Transmissionsspektrum des Probekörpers errechnet sich durch Aufnahme des Background-Spektrums und des Einstrahlspektrums der Probe [Coates 2000, Griffith 1986].

Die Messungen der Proben wurden mit dem Gerät FTIR Spectrometer Jas.co FT/IR (Jas.co Hachioji) durchgeführt.

Die zu untersuchenden Probekörper wurden wie unter Punkt 4.2.1.1 beschrieben angefertigt. In Tabelle 3 sind die unterschiedlichen Gruppen dieser ersten Untersuchung aufgeführt. Eine weitere Untersuchung wurde stichprobenartig mit den Probekörpern aus den Hauptversuchen durchgeführt, um die Beschichtung nach den Adhäsionsversuchen zu überprüfen.

Vor jeder Messung wurde das Gerät gegen Luft geeicht, danach wurden die mit Silanverdünnungen beschichteten Glasplättchen mit einem Durchmesser von 12 mm in die Halterung eingespannt und die Transmission der Proben bei folgenden Einstellungen gemessen: Accumulation: 32, Gain: Auto (1), Scanning Speed: Auto (2mm/sec), Resolution  $4\text{ cm}^{-1}$ , Apodization: Triangle, Aperture: Auto (7,1mm). Die Messungen wurden in einem Wellenlängenbereich zwischen  $399\text{ cm}^{-1}$  –  $4000,6\text{ cm}^{-1}$  durchgeführt und die Werte als Transmission in Prozent angegeben. Die Erfassung und Auswertung der Daten erfolgte via Spectra Analyses (Spectra Analysis Inc.), für die graphische Darstellung wurden diese Daten für die Tabellenkalkulation Excel Version 5.0 (Microsoft) umformatiert.

#### 4.2.1.3 Perthometermessung

Eine Objektivierung der Oberflächenrauigkeit der Proben sollten die Messungen im Sinne einer profilometrischen Oberflächenanalyse mit Hilfe des Testschlittensystems Perthometer S6P (Feinprüf Perten GmbH) gewährleisten. Hierbei wurde der arithmetische Mittelwert des Rauigkeitsprofils  $R_a$  (DIN 4768, ISO 4287/1) in Mikromtern bestimmt. Der Zielbereich wurde mit dem Bereich  $0,04 - 0,08\text{ }\mu\text{m}$  festgelegt, da in diesem Wertebereich nicht mit einem Einfluss der Rauigkeit auf die bakterielle Adhäsion zu rechnen ist.

Die Proben wurden zur Vermessung auf eine Haltevorrichtung mittels Knetmasse aufgebracht und durch Antrieb eines Zahnriemengetriebes mit dem Taster abgefahren. Die Messungen Oberflächenrauigkeit der Probekörperoberflächen wurden an drei Stellen (zweimal marginal, einmal zentral) durchgeführt. Die Taststrecke (Messstrecke mit Vor- und Nachlauf) betrug 1,7

mm, wobei die Einzelmessstrecke 0,25 mm umfasste, die Parameter für die Vertikale und die Horizontale betrugen jeweils 50  $\mu\text{m}$ .

*Tabelle 3: Proben für FT/IR und Goniometer*

Nr.:	Chemische Bezeichnung	Einfache Beschichtung		Dreifache Beschichtung je 40 $\mu\text{l}$
		je 10 $\mu\text{l}$	je 40 $\mu\text{l}$	
1	3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan	5,0%	0,5% 2,5% 5,0% 10,0% 15,0%	0,5% 2,5% 5,0%
2	3-Methacryloxypropylmethyl-dimethoxysilan	5,0%	0,5% 2,5% 5,0%	0,5% 2,5% 5,0%
3	3-Methacryloxypropyldimethyl-methoxysilan	5,0%	0,5% 2,5% 5,0%	0,5% 2,5% 5,0%
4	3-Methacryloxypropyltriethoxysilan	5,0%	0,5% 2,5% 5,0%	0,5% 2,5% 5,0%
5	3-Methacryloxypropyltrichlorosilan	5,0%	0,5% 2,5% 5,0%	0,5% 2,5% 5,0%
6	3,3,3- (trifluor)propyltrimethoxysilan	5,0%	0,5% 2,5% 5,0%	0,5% 2,5% 5,0%
7	3-Aminopropyltrimethoxysilan	5,0%	0,5% 2,5% 5,0%	0,5% 2,5% 5,0%
8	O-(Methacryloxyethyl)-N-triethoxysilylurethan	5,0%	0,5% 2,5% 5,0%	0,5% 2,5% 5,0%
9	3-(trimethoxysilyl)-propyldimethyloctadecyl-ammoniumchlorid	5,0%	0,5% 2,5% 5,0%	0,5% 2,5% 5,0%

#### 4.2.1.4 Goniometermessung

Als weiteres Mittel zur Prüfung einer vorhandenen Beschichtung der Probekörper mit Silanen und zur Verifizierung des Einflussfaktors Hydrophobizität auf die Quantität der bakteriellen Adhäsion wurden Kontaktwinkelmessungen durchgeführt.

Für die Messungen wurde ein Mikroskop für goniometrische Messungen (Mikroskop Erma) verwendet. Die Proben wurden analog Punkt 4.2 hergestellt. Die unterschiedlichen Gruppen sind in Tabelle 3 dargestellt. Die jeweiligen Probekörper wurden zur Messung auf das Probentischchen des Mikroskops platziert, der rechte Rand des Glasplättchens anvisiert und entsprechend vergrößert. Mit der elektronisch kalibrierten Pipette (Microlab RP) wurde eine definierte Tropfengröße von 2  $\mu\text{l}$  *aq. dest.* auf das Plättchen aufgebracht. Nach 30 sec wurde der Wert für den Kontaktwinkel des Tropfens auf der Probe abgelesen. Der Tropfen wurde mit dem Mikroskop betrachtet, in dessen Okular sich ein bewegliches Fadenkreuz mit variabel einstellbarem Winkel befand. Ein Schenkel des Fadenkreuzes wurde mit der Grenzfläche Festkörper/ Tropfen zur Deckung gebracht, der andere Schenkel ausgehend von der Dreiphasenkontaktlinie als Tangente an das Tropfenprofil angelegt. Der Winkel zwischen den beiden Schenkeln wurde als Randwinkel  $\Theta$  abgelesen. Der Wert wurde in Grad angegeben. Für jeden einzelnen Probekörper wurden drei Werte ermittelt und via SPSS für Windows Version 12.0 (SPSS Inc.) ausgewertet.

#### 4.2.1.5 Resazurin/ Almar Blue

Die quantitative Messung der bakteriellen Adhäsion auf den Proben erfolgte durch Ermittlung der relativen Fluoreszenzintensität in einem Multi-Detektor Fluoreszenz Lesegerät (Fluostar optima, bmg). Die Resazurin-Reduktionsmethode gilt als ein etabliertes und einfaches Verfahren zum Nachweis der Zellproliferation sowie für zytotoxische Untersuchungen bei

Bakterien [Baker 1994, Bürgers 2007, Collins 1997, Faltermeier 2007, Novak 1993], Hepatozyten [Slaughter 1999] und Lymphozyten [Ansar 1994, Fries 1995].

Als Indikator für die ablaufende Resazurin-Reduktion wurde eine 3mM Resazurin-Lösung (Resazurin Natriumsalzes mit Zertifikat, Indikator pH 3,8 - 6,5: Sigma-Aldrich Chemie GmbH) benötigt. Dazu wurde 0,007536 g Resazurin Natriumsalz in 10 ml *aq. dest.* gelöst. Die relative Intensität der Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines automatisierten Multi-Detektor Fluoreszenz Lesegerät (Fluostar optima, bmg-Labtech) bei Wellenlängen von 530 nm Excitation und 590 nm Emission ermittelt. Eine genaue Beschreibung der Vorgehensweise findet sich im Kapitel 4.2.2.

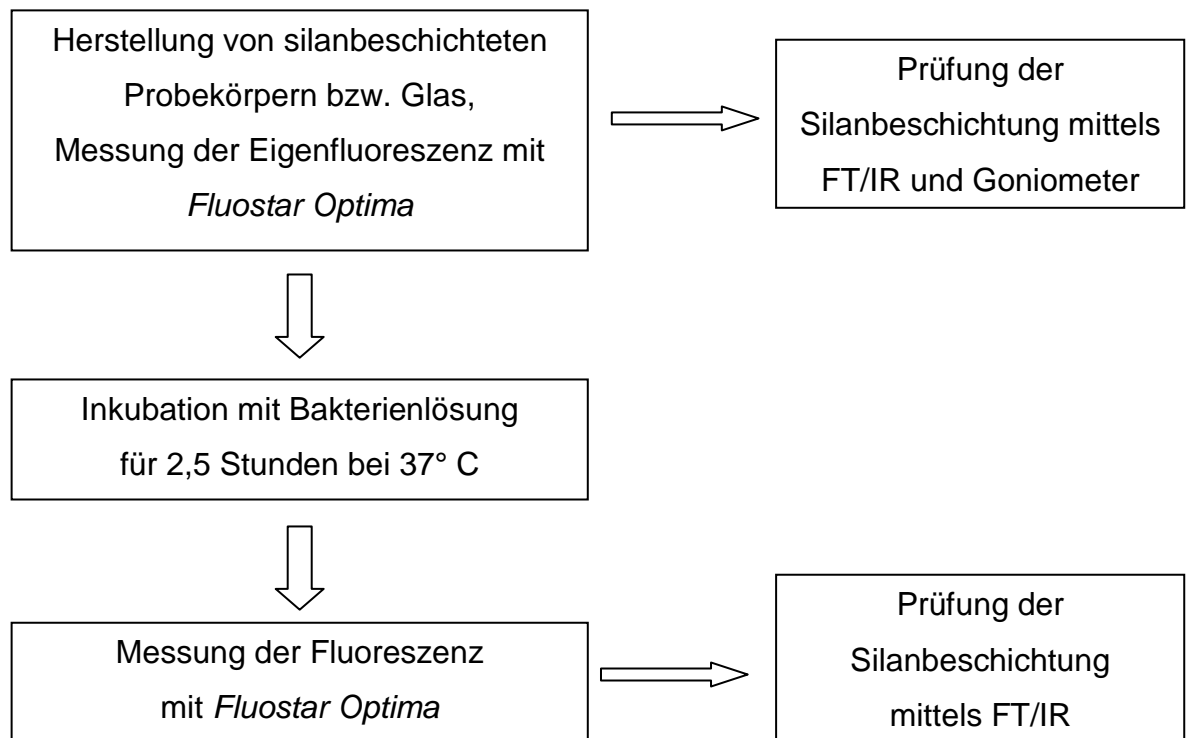
#### 4.2.1.6 Bakterienanzucht

Von einer tiefgefrorenen Kultur, wurden *S. mutans*-Bakterien auf eine Agar Platte aufgebracht und für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Eine einzelne Kultur wurde entnommen und in ein Zentrifugenröhrchen (Falcon-Tube) 10 ml (Becton Dickinson Microbiology Systems) mit Medium übertragen. Die Falcon-Tube mit Medium und Bakterienkultur wurde für 20 Stunden unter ständigem Schütteln (200 U/min) bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde im Kühlschrank aufbewahrt, und wöchentlich davon eine "frische Kultur" hergestellt. Dazu wurden 100 µl dieser Lösung steril mit einer Pipette entnommen, zu einem Tube mit 25 ml TS-Medium Nr. 92 gegeben und wiederum im Schüttelinkubator Modell G 25 (New Brunswick Scientific Co. Inc.) für 20 Stunden inkubiert. Am Vorabend der jeweiligen Versuche wurden 100 µl Bakterienlösung steril entnommen und 25 ml TS-Medium Nr. 92 in eine Falcon-Tube gegeben. Diese Suspension wurde unter konstanten Bewegungen im Schüttelinkubator bei 37°C für 20 Stunden inkubiert. Am Tag der Versuche wurde zuvor das Wachstum der Bakterien unter dem Mikroskop (Durchlicht-Mikroskop, Carl Zeiss West GmbH) überprüft. Anschließend folgte die Zentrifugation (Rotixa/P, Hettich) der Zentrifugenröhrchen (Einstellungen: Bremse 9, T°C 18, 2500 U/min, 5 t/min), der resultierende Überstand wurde dekantiert und verworfen.

Zum Zentrifugat wurden nun je Falcon-Tube 15 ml Phosphate Buffered Saline-Puffer (PBS) pipettiert und die Falcon-Tubes erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt und nach dieser 2. Waschung mit PBS der Überstand wiederum dekantiert. Nun erfolgte die Aufnahme des Zentrifugates in 30 ml PBS-Puffer je Falcon-Tube. Mit Hilfe eines Rüttlers Heidolph Reax top (Heidolph-Elektro GmbH & Co.KG) wurde die Lösung gleichmäßig durchmischt und die Falcon-Tubes im Verlauf in ein steriles Becherglas mit sterilen Rührmagneten entleert, um eine gleichmäßige Durchmischung mittels des Magnetrührgrätes IKAMAG Rec-G (Ika-Labortechnik) gewährleisten zu können. Die gewünschte Bakteriendichte von 0,3 OD wird anschließend mit Hilfe des Photometers Photometers, Genesys 10nV Scanning (Thermo Spectronic) bei einer Wellenlänge von 540 nm eingestellt. Mit dem PBS-Puffer wurde der 0-Wert eingestellt und der gewünschte OD-Wert durch schrittweises Verdünnen der Bakterienlösung erreicht.

### 4.2.2 Versuchsdurchführung: Bakterienanlagerung

Abbildung 4: Versuchsdesign im Überblick



Aus den für den Versuch vorbereiteten 48 Well Cell Culture Cluster wurde aus den einzelnen Well-Kammern *aq. dest.* abgesaugt. In jede Kammer wurde nun mit Hilfe der Pipette jeweils 1 ml PBS-Puffer gegeben und somit die 48 Well Cell Culture Cluster für die Messung der Eigenfluoreszenz im *Fluostar* vorbereitet. Im Programm *Fluostar Optima* Version 1.30.0 (BMG LabTech) wurden die nötigen Einstellungen vorgenommen, der Gainwert auf 2600, Excitations-Filter auf 550 und das Value auf 15% eingestellt, die 48 Well-Platte eingelegt und die Messung vorgenommen.

Nach Kontrolle der gewonnenen Daten, wurde der PBS-Puffer aus den Well-Kammern wieder abgesaugt und die Kammern wurden entsprechend den Angaben von Tabelle 4 gefüllt. Die Platte wurden mit dem Deckel der Kunststoffplatte wieder abgedeckt und die Probenplatten in einer lichtdichten Kunststoffschachtel gelagert. Anschließend wurden die Platten im Schüttelinkubator bei 200 U/min und 37 Grad Celsius für 2,5 Stunden inkubiert.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Suspension mittels der Pumpe KNF Neuberger Laboport (KNF Neuberger) aus allen Kammern in ein gesondertes Gefäß abgesaugt. Die Kammern wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen, indem je 1 ml PBS-Puffer je Kammer pipettiert und anschließend wieder abgesaugt wurde, um nicht adhärente Bakterien zu entfernen. Zur Vorbereitung der Messung der Fluoreszenz wurden die Kammern des 48 Well Cell Culture Clusters wieder mit jeweils 1 ml PBS-Puffer gefüllt.

*Tabelle 4: Pipettierschema*

P	Messprobe	1 ml verdünnte Bakterienkultur und 15 µl Reazurinlösung
FK	Farbkontrollprobe	1 ml PBS-Puffer und 15 µl Reazurinlösung
BK	Bakterienkontrollprobe	1 ml verdünnte Bakterienkultur
O	Nullkontrolle	1 ml PBS-Puffer
X		In Vorversuch 1 und 2 - leeres Well, in Hauptversuch 1 und 2 - Plättchen für REM: 1 ml verdünnte Bakterienkultur und 15 µl Resazurinlösung

Die Fluoreszenz des reinen PBS (Nullkontrolle), des Puffers und Resazurin (Farbkontrolle) und der reinen Bakterienlösung dienten als Kontrollen. Die relative Fluoreszenzintensität wurde errechnet in Relation zur Eigenfluoreszenz der jeweiligen Proben und ist ein Maß für die Menge der adhärennten Bakterien. Die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm Fluostar Optima für Windows Version 1.30.0, wobei die Daten mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel, Version 5.0 erfasst und die statistische Auswertung mittels des Programms SPSS für Windows Version 12.0 (SPSS Inc.) durchgeführt wurde.

Zur Entnahme von Proben für Rasterelektronische Messungen wurde der PBS-Puffer aus den entsprechenden Kammern abgesaugt, die Proben mit einer Pinzette entnommen und auf die entsprechenden Träger unter dem Abzug befestigt.

#### *4.2.2.1 Vorversuche 1 und 2 zur Messung des Einflusses der Konzentration von 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan auf die bakterielle Adhäsion von S. mutans*

Bereits unter Punkt 4.2.1.1 wurde die Anfertigung der Proben zu diesem Versuch dargestellt. Ziel dieser Untersuchung war es, den Einfluss der Konzentration des Silans 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan auf die Messungen zu ermitteln. Dazu wurden die Konzentrationen 0,5 %, 2,5 %, 5,0 %, 10,0 %, 15,0 % des Silans  $\gamma$ -MPS, und gesäuberte Glasplättchen als Referenzproben gewählt. Die Proben wurden anschließend vorbereitet (siehe Kapitel 4.2.1.1) und der Versuch wie unter Abschnitt 4.2.2 beschrieben durchgeführt. Dieser Versuch wurde zweimal durchgeführt.

#### *4.2.2.2 Hauptversuche 1 und 2 zur Ermittlung der bakteriellen Adhäsion für die Silane Nummer 1-9*

In Abschnitt 4.2.1.1 wurde die Anfertigung der beschichteten Glaskörper bereits erläutert. Es wurden jeweils 16 Glasplättchen mit einer 5%igen Verdünnung der 9 Silane (siehe Tabelle 2) beschichtet. Die Plättchen für Silane 1-5, 7-9 wurden einmal beschichtet, die Plättchen für Silan 6 wurden dagegen drei Mal beschichtet. Gereinigte Glasplättchen dienten als Referenzproben. Die Vorbereitung der Proben zu diesem Anlagerungsversuch erfolgte wie unter 4.2.1.1 beschrieben, die Bakterienanlagerung gemäß Abschnitt 4.2.2. Auch dieser Versuch wurde ein zweites Mal durchgeführt.

### **4.2.3 Auswertmethodik und Statistik**

#### *4.2.3.1 Auswertung*

##### *4.2.3.1.1 Fluostar-Analyse*

Die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm Fluostar Optima für Windows Version 1.30.0 (BMG LabTech), wobei die Daten mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel, Version 5.0 erfasst und die statistische

Auswertung mittels des Programms SPSS für Windows Version 12.0 (SPSS Inc.) durchgeführt wurde.

#### *4.2.3.1.2 FT/IR*

Die Messungen wurden in einem Wellenlängenbereich zwischen  $399\text{ cm}^{-1}$  –  $4000,6\text{ cm}^{-1}$  durchgeführt und die Werte als Transmission in Prozent angegeben. Die Erfassung und Auswertung der Daten erfolgte via Spectra Analyses (Spectra Analysis Inc.), für die graphische Darstellung wurden diese Daten für die Tabellenkalkulation Excel Version 5.0 (Microsoft) umformatiert.

#### *4.2.3.1.3 Perthometer*

Für jeden untersuchten Probenkörper wurden drei Werte ermittelt und in Mikrometer angegeben. Die Auswertung wurde mittels SPSS für Windows Version 12.0 (SPSS Inc.) durchgeführt.

#### *4.2.3.1.4 Goniometer*

Der Wert wurde in Grad angegeben. Für jeden einzelnen Probenkörper wurden drei Werte ermittelt und via SPSS für Windows Version 12.0 (SPSS Inc.) ausgewertet.

#### *4.2.3.2 Statistik*

Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Untersuchungsergebnisse erfolgten mittels des Programmes SPSS für Windows (Version 12.0, SPSS Inc.).

Mit Hilfe von Boxplots erfolgte die graphische Darstellung. Im Boxplot werden Median und Quartile graphisch zusammengefasst. Der Median einer Messreihe wird als Querbalken, die Quartile als Kasten darum, und die minimalen und maximalen Werte als Verlängerungen aus diesem Kasten dargestellt. Der Abstand zwischen den Quartilen, der 50% der Messwerte umspannt wird als Interquartilspanne bezeichnet und ist ein zum Median korrespondierendes

Streuungsmaß, das 1. und 3. Quartil, unter derer 25% bzw. 75% der aufgetretenen Messwerte liegen [Krummenauer 2007]. Die graphische Darstellung in Form eines Boxplots ermöglicht eine Analyse der Symmetrie einer Verteilung, der Lage der zentralen Tendenz und der Variabilität der Werte. Die Angabe des Medianwertes und die Darstellung von Untersuchungsergebnissen mittels eines Boxplots bieten gegenüber der Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen den Vorteil der Unempfindlichkeit für Ausreißerwerte [Krummenauer 2007].

Für die statistische Auswertung der aus den Versuchen ermittelten Daten wurde der sogenannte Mann-Whitney-U-Test verwendet. Dieser Test dient der Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen. Der Test wurde von Mann und Whitney (1947) sowie Wilcoxon (1945) entwickelt und aus diesem Grund auch als Mann-Whitney-Wilcoxon-Test bezeichnet.

Die Werte von zwei Stichproben werden miteinander verglichen.

Der Mann-Whitney U-Test untersucht unter Annahme bzw. Nullhypothese, dass es keinen Unterschied zwischen den Verteilungskurven der beiden Stichproben A und B gibt, gegen die Alternativ-Hypothese, dass sich die Medianen unterscheiden. Der Test funktioniert einseitig oder zweiseitig. [Sachs 2002].

Bei einem vorgegebenen Testniveau von 5% ist bei einem Signifikanzniveau  $\alpha$  von unter 0.05 die Annahme von Unterschieden gegeben.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Vorversuche

#### 5.1.1 Fourier-Transform Infrarot Spektroskopie

In Vorversuchen wurden mit Silan beschichtete Probeoberflächen unterschiedlicher Konzentrationen untersucht, um eine für die Adhäsionsversuche geeignete Silan-Konzentration zu finden. In Abbildung 5 sind beispielhaft für die anderen Silanverbindungen die Spektren der unterschiedlichen Konzentrationen (0,5 %, 2,5 %, 5,0 %, 10,0 %, 15,0 %) von 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan (Silan 1) dargestellt. Das Spektrum dieses Silans mit der Konzentration von 5,0 % zeigt bei einer Wellenlänge zwischen 400 und 1500  $\text{cm}^{-1}$  eine Transmission von weniger als 5%. In einem Wellenlängenbereich von 1500 bis 1600  $\text{cm}^{-1}$  steigt der Wert deutlich über 10 % bis im Bereich 1650 bis 1790  $\text{cm}^{-1}$  zwei schwache Peaks zu erkennen sind. Eine kontinuierliche Zunahme der Transmission auf ca. 80 % erfolgt bis etwa 2500  $\text{cm}^{-1}$ , gefolgt von zwei intensiven aufeinanderfolgenden Peaks im Wellenlängenbereich von 2800 bis 3250  $\text{cm}^{-1}$ . Danach ist eine erneute Zunahme der Transmission auf über 82 % zu sehen, bis im Bereich von 3300 bis 3700  $\text{cm}^{-1}$  ein breites Band mit einer Abnahme der Werte auf unter 78 % auffällt. Ein Plateau ab 3800  $\text{cm}^{-1}$  bei einer Transmission von 90 % schließt das Spektrum ab. Die Spektren der Silankonzentrationen von 0,5 % sowie 2,5 % zeigen die charakteristischen Peaks im Bereich 1650 bis 1790  $\text{cm}^{-1}$  und 2800 bis 3250  $\text{cm}^{-1}$  nicht. Bei den Konzentrationen 10,0 % und 15,0 % sind die Peaks (im Bereich 1650 bis 1790  $\text{cm}^{-1}$  und 2800 bis 3250  $\text{cm}^{-1}$ ) in abgeschwächter Form zu erkennen. Zudem ist auffällig, dass im Wellenlängenbereich 400 bis 2000  $\text{cm}^{-1}$  die Transmissionswerte im Vergleich zu der Silankonzentration von 5,0 % deutlich erhöht sind. Desweiteren ist beim Transmissionsspektrum von 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan (Silan 1) bei einer Konzentration von 15 %

ein kleines Band im Sinne eines Transmissionsanstieges zwischen 1000 und 1100  $\text{cm}^{-1}$  zu erkennen.

In einem weiteren Schritt wurde die Qualität der Silanbehandlung (Silane 1 bis 9) bei einfacher und mehrfacher Beschichtung überprüft (Abbildung 6 -14). Bei Vergleich der Spektren der chemisch unterschiedlichen Silane konnte festgestellt werden, dass die Silanverbindungen 1, 2, 3, 4, 5 und 8 charakteristische Peaks in einem Wellenlängenbereich zwischen 1650 und 1790  $\text{cm}^{-1}$  aufweisen. Diese Silane gleichen sich in chemischer Hinsicht bezüglich der Methacryloxy-Gruppe. Peaks als Doublettstruktur in einem Bereich von 2800 bis 3250  $\text{cm}^{-1}$  wiederholten sich in unterschiedlicher Ausprägung bei den Silanverbindungen 1, 2, 3 und 9. Die Spektren der Verbindungen 4 und 8 zeigten in diesem Bereich einen dreigezackten Peak. Alle Silanspektren zeigten bei der FT/IR-Untersuchung im Bereich von 3300 bis 3700  $\text{cm}^{-1}$  ein breites Band. Bezogen auf die Transmissionsabnahme war dies bei den Verbindungen 1, 2, 3, 4 schwach, dagegen bei den Silanen 5, 6, 7, 8 und 9 stark ausgebildet. Unterschiede der jeweiligen Spektren der chemisch sich unterscheidenden Silane konnten in einem Wellenlängenbereich von 2250 und 3750  $\text{cm}^{-1}$  festgestellt werden.

Bei der Gegenüberstellung von einfacher Beschichtung und dreifacher Beschichtung zum Nachweis der Silanbehandlung der Glasoberflächen zeigte sich bei allen Verbindungen eine deutliche Transmissionsabnahme im Bereich von 1650 bis 1790  $\text{cm}^{-1}$  sowie 2800 bis 3250  $\text{cm}^{-1}$ . Bei den Verbindungen 5, 6, 7, 8 und 9 zeigten auch die auftretenden Banden der Wellenlängen zwischen 3300 und 3700  $\text{cm}^{-1}$  eine deutliche Reduktion der Transmission. Die einfache Beschichtung der Glasoberfläche mit 3,3,3-(trifluor)propyltrimethoxysilan (Silan 6) ließ sich im Vergleich zu den anderen Silanverbindungen schlecht darstellen, da die Peaks und Banden im Verhältnis zur mehrfachen Beschichtung insbesondere im Bereich von 2800 bis 3700  $\text{cm}^{-1}$  lediglich schwach ausgebildet waren.

Abbildung 5: Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen von  
3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan (Silan 1)

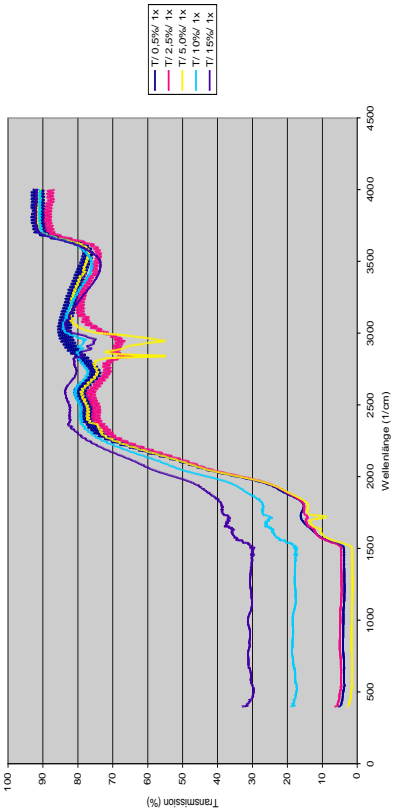


Abbildung 6: Vergleich einfacher und dreifacher Beschichtung  
bei 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan (Silan 1)

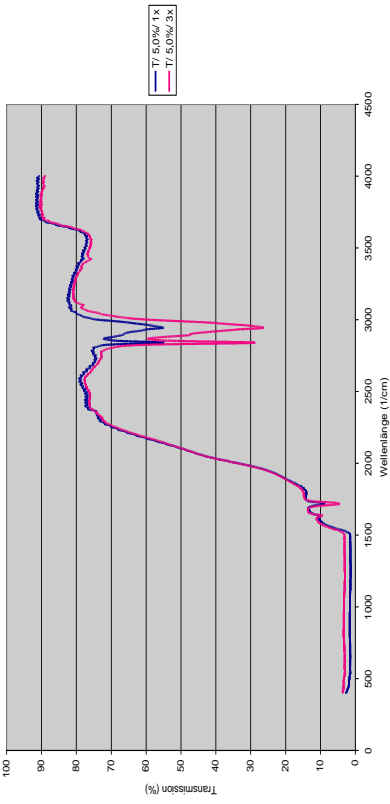


Abbildung 7: Vergleich einfacher und dreifacher Beschichtung bei  
3-Methacryloxypropylmethyldimethoxysilan (Silan 2)

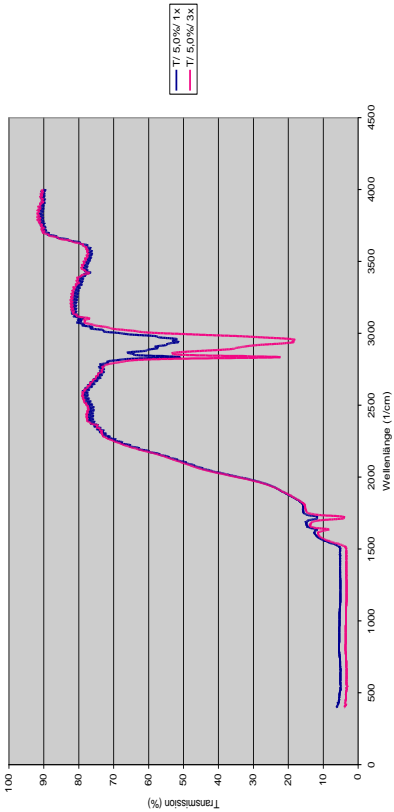


Abbildung 8: Vergleich einfacher und dreifacher Beschichtung bei  
3-Methacryloxypropyldimethylmethoxysilan (Silan 3)

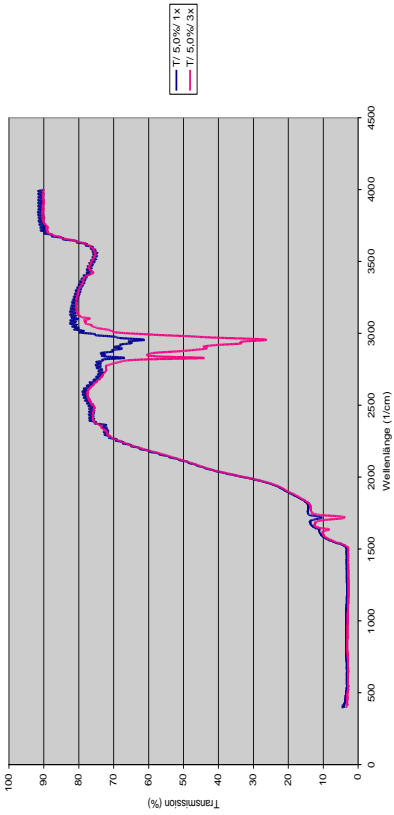


Abbildung 9: Vergleich einfacher und dreifacher Beschichtung bei 3-Methacryloxypropyltriethoxysilan (Silan 4)

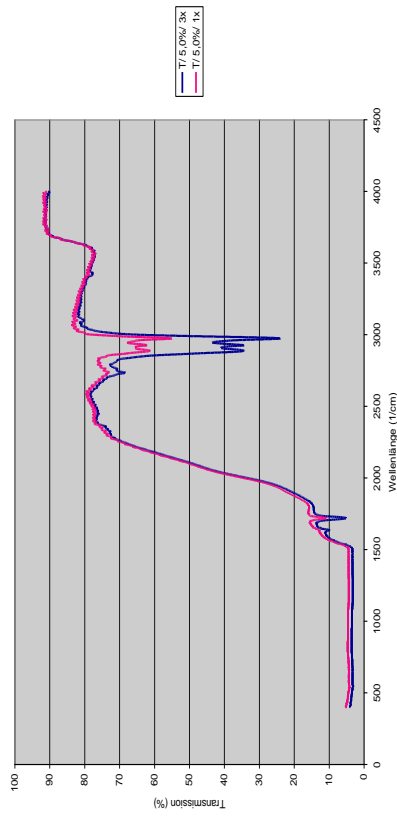


Abbildung 10: Vergleich einfacher und dreifacher Beschichtung bei 3-Methacryloxypropyltrichlorosilan (Silan 5)

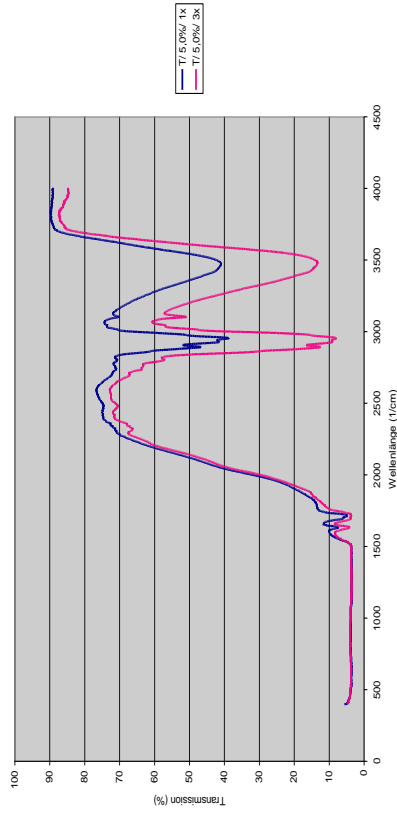


Abbildung 11: Vergleich einfacher und dreifacher Beschichtung bei 3,3,3- (trifluor)propyltrimethoxysilan (Silan 6)

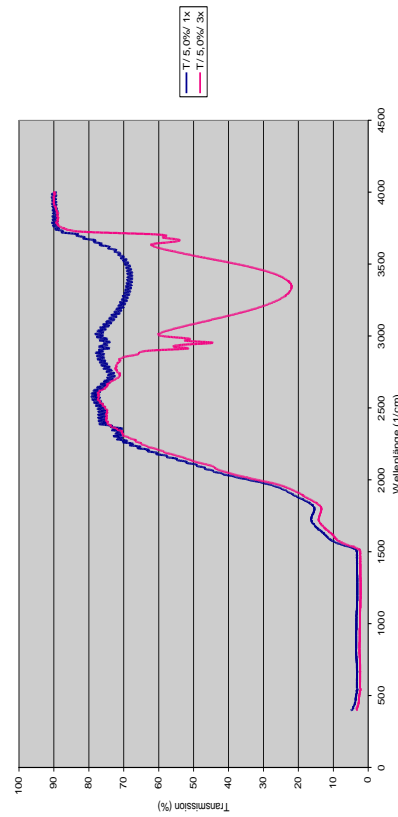


Abbildung 12: Vergleich einfacher und dreifacher Beschichtung bei 3-Aminopropyltrimethoxysilan (Silan 7)

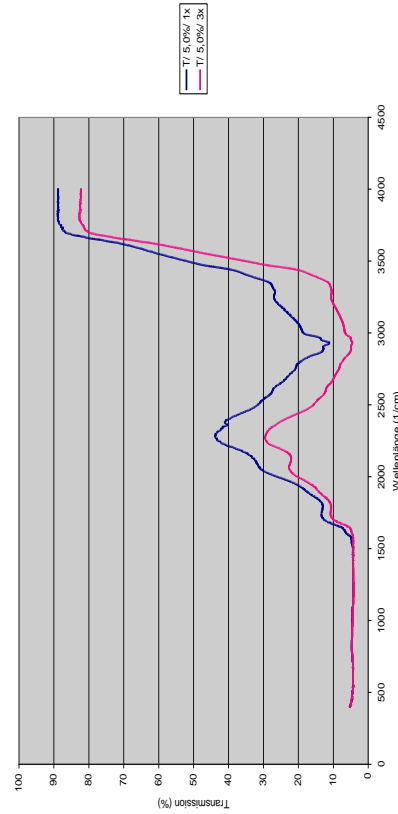


Abbildung 13: Vergleich einfacher und dreifacher Beschichtung  
bei O-(Methacryloxyethyl)-N-triethoxysilylurethan  
(Silan 8)

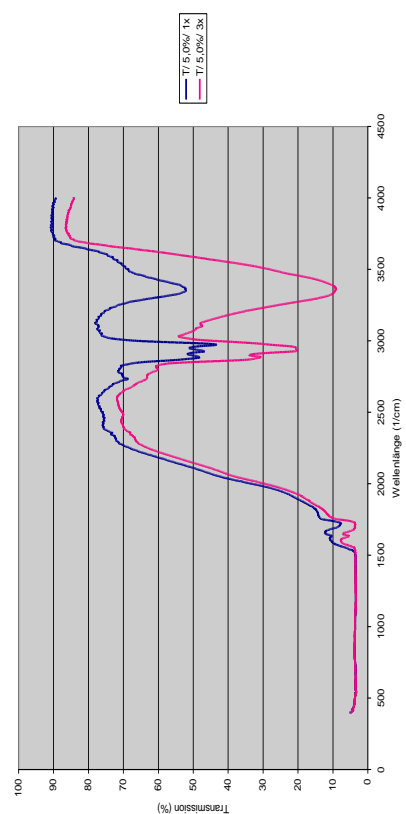
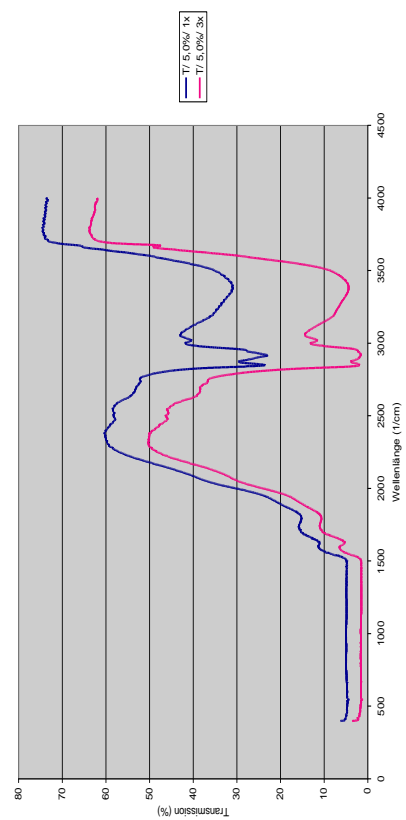


Abbildung 14: Vergleich einfacher und dreifacher Beschichtung  
bei 3-(trimethoxysilyl)propyldimethyloctadecyl-  
ammoniumchlorid (Silan 9)



In den Abbildungen 15 bis 24 werden die Werte für die Transmission der Silane vor und nach erfolgtem Adhäsionsversuch mit *S. mutans* einander gegenübergestellt.

Es zeigte sich bei allen Probekörpern eine Veränderung der Transmissionswerte des Spektrums. Besonders die Spektren der Silane 1- 4, 7 und 9 zeigten deutliche Diskrepanzen zwischen den Messungen vor und nach Durchführung der Adhäsionsversuche. Auffallend ist hierbei bei den Silanen 1-4 das Verschwinden der für die Silanverbindung charakteristischen Peaks in den Wellenlängenbereichen  $1650$  bis  $1790\text{ cm}^{-1}$  sowie  $2800$  bis  $3250\text{ cm}^{-1}$ . Die Spektren dieser Silane glichen sich dem Spektrum der Referenzprobe Glas an. Die Transmissionsspektren für die Silane 5, 6, 8 zeigten auch nach dem Adhäsionsversuch die für die Verbindung charakteristischen Peaks und Banden. Die aufgenommenen Spektren von 3-Methacryloxypropyltrichlorosilan (Silan 5) vor und nach Adhäsionsversuch wiesen die geringsten Abweichungen auf. Bei den Verbindungen 3,3,3- (trifluor)propyltrimethoxysilan (Silan 6) und O- (Methacryloxyethyl)-N-triethoxysilylurethan (Silan 8) wurde eine Verschiebung des jeweiligen Spektrums zu höheren Transmissionswerten sowie zu einer geringfügig deutlicheren Ausprägung der Peaks und Banden im Wellenlängenbereich von  $2250$  bis  $3750\text{ cm}^{-1}$  beobachtet. Innerhalb des Wellenlängenbereiches von  $2250$  bis  $2350\text{ cm}^{-1}$  fällt bei den Spektren der Silane 6, 7, 8, 9 ein zusätzlicher deutlicher Peak, sowie bei der Referenzprobe Glas, Silan 3 und 5 ein schwacher Peak auf.

Abbildung 15: Glasplättchen vor und nach Adhäsionsversuch

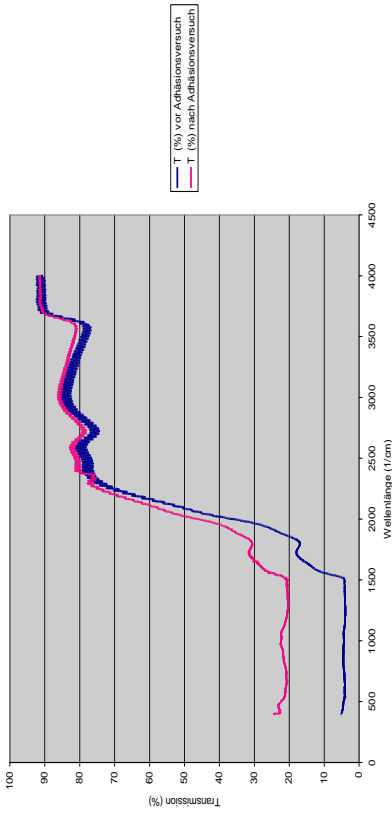


Abbildung 16: 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan (Silan 1)

vor und nach Adhäsionsversuch

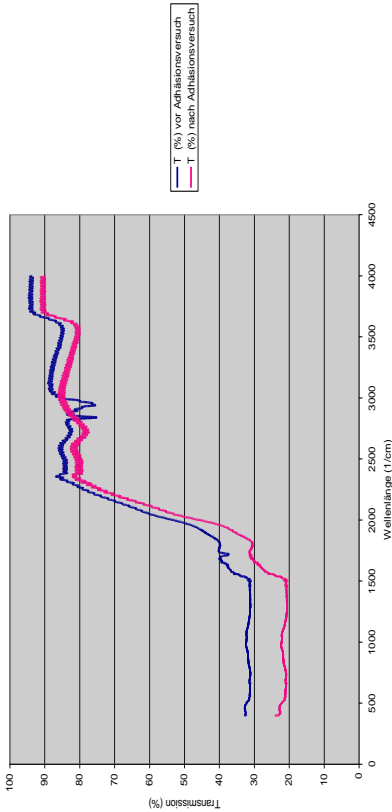


Abbildung 17: 3-Methacryloxypropylmethyldimethoxysilan (Silan 2)

vor und nach Adhäsionsversuch

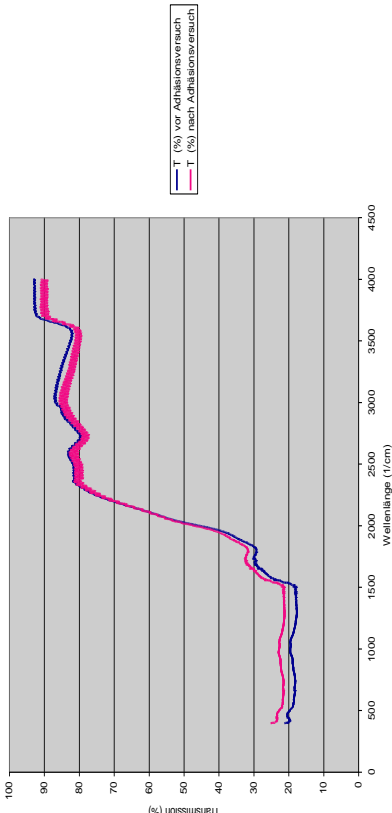


Abbildung 18: 3-Methacryloxypropyldimethylmethoxysilan (Silan 3)

vor und nach Adhäsionsversuch

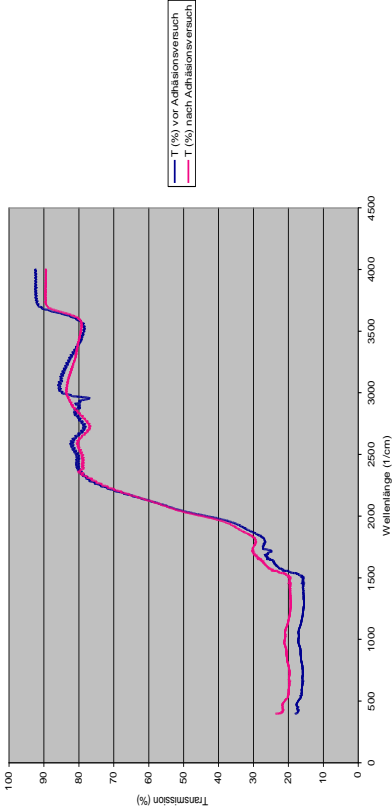


Abbildung 19: 3-Methacryloxypropyltriethoxysilan (Silan 4)  
vor und nach Adhäsionsversuch

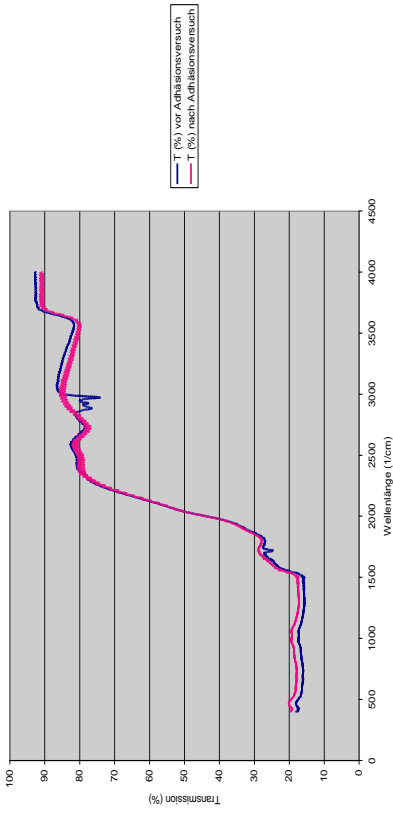


Abbildung 20: 3-Methacryloxypropyltrichlorosilan (Silan 5)  
vor und nach Adhäsionsversuch

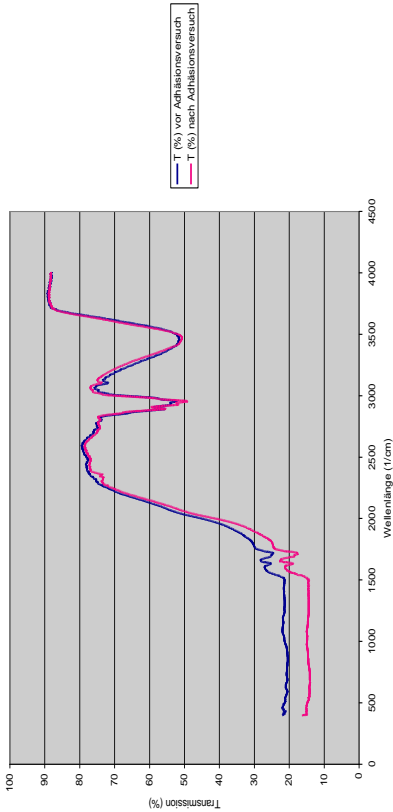


Abbildung 21: 3,3,3- (trifluor)propyltrimethoxysilan (Silan 6)  
vor und nach Adhäsionsversuch

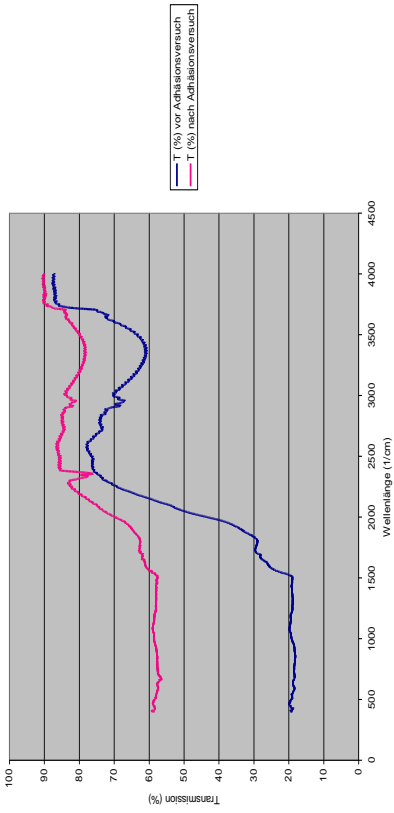


Abbildung 22: 3-Aminopropyltrimethoxysilan (Silan 7)  
vor und nach Adhäsionsversuch

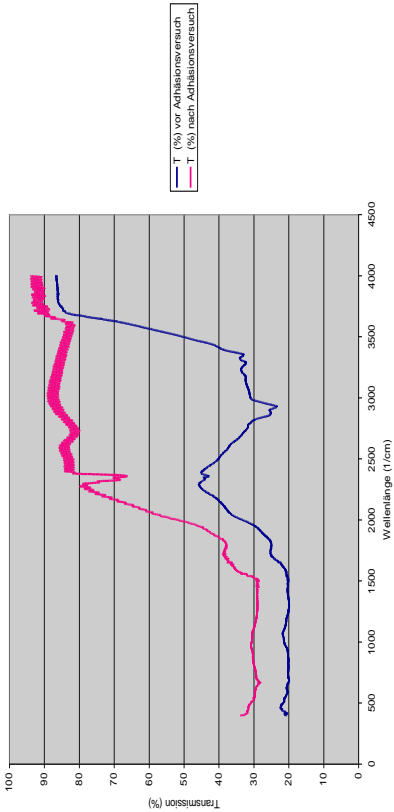


Abbildung 23: O-(Methacryloxyethyl)-N-triethoxysilylurethan  
(Silan 8) vor und nach Adhäsionsversuch

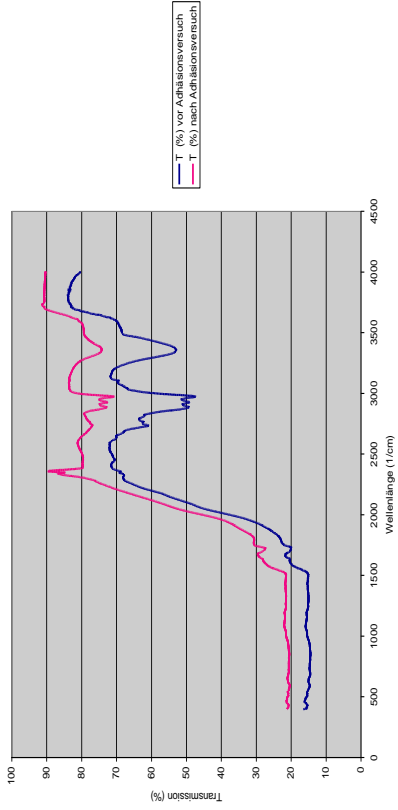
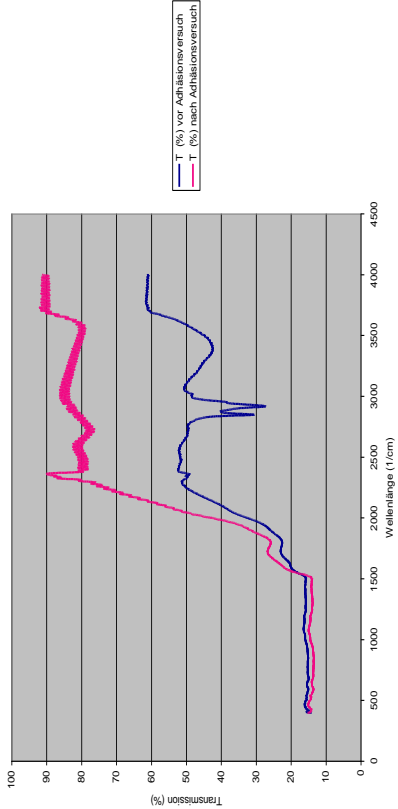


Abbildung 24: 3-(trimethoxysilyl)propyldimethyloctadecyl-  
ammoniumchlorid (Silan 9) vor und nach  
Adhäsionsversuch



### 5.1.2 Perthometer

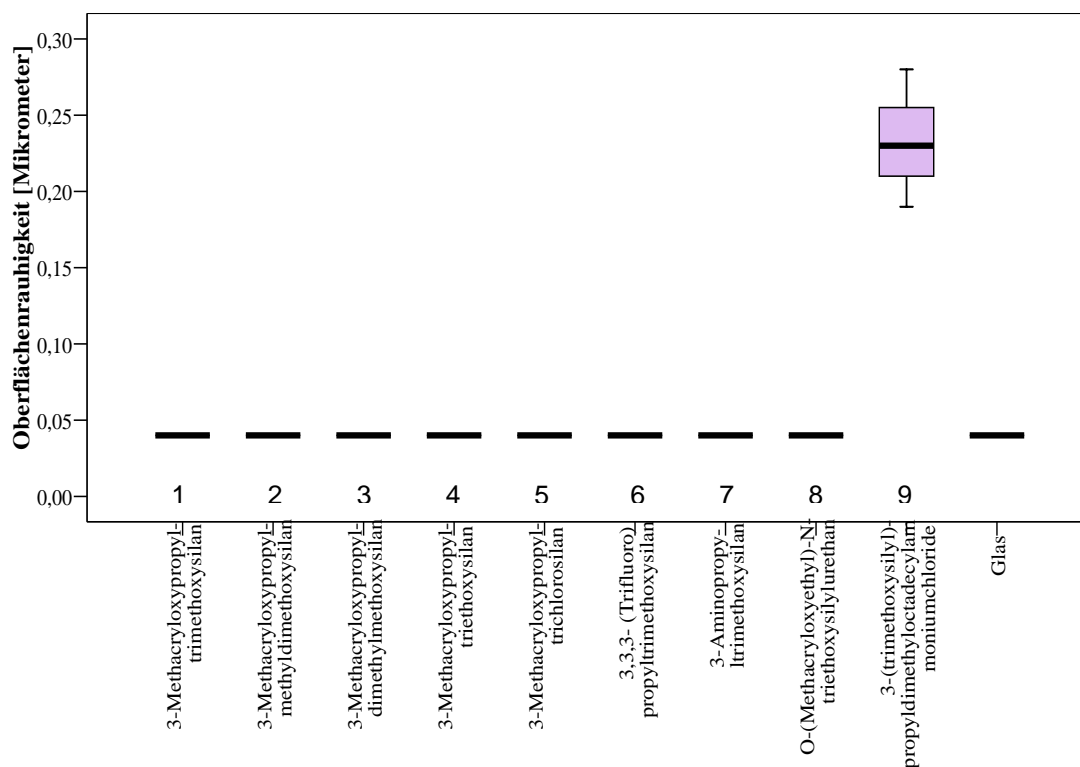
#### 5.1.2.1 Perthometerauswertung für die Vorversuche 1 und 2

Die Rauigkeiten der in den Vorversuchen 1 und 2 untersuchten mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,5 %, 2,5 %, 5,0 %, 10,0 %, 15,0 %) von  $\gamma$ -MPS beschichteten Proben sowie die Referenzprobe Glas wiesen alle identische Werte von 0,04  $\mu\text{m}$  [0,04 (0,04/ 0,04)] auf.

#### 5.1.2.2 Perthometerauswertung für die Hauptversuche 1 und 2

Abbildung 25 zeigt die Rauigkeiten der im Hauptversuch verwendeten Proben. Die Rauigkeitsmessungen von Glas sowie die mit den Silanverbindungen 1-8 beschichteten Probekörpern aus Glas ergaben konstante Werte von 0,04  $\mu\text{m}$  und zeigten keine signifikanten Unterschiede untereinander ( $p=1,000$ ). Für die mit Silan 9 (3-(trimethoxysilyl)-propyldimethyloctadecylammoniumchlorid) beschichteten Glasplättchen wurden dagegen Werte zwischen 0,19 und 0,28  $\mu\text{m}$  gemessen, die höchsten Werte wurden dabei in den kristallisierten Bereichen, in der Mitte der Proben ermittelt. Der Medianwert betrug 0,23  $\mu\text{m}$  (0,21/ 0,255). Proben des Silans 9, die Werte über 0,19  $\mu\text{m}$  aufwiesen wurden für die Adhäsionsversuche nicht verwendet. Die Rauigkeit von mit Silan 9 beschichteten Glas gegenüber den anderen Silanen war signifikant höher ( $p< 0,001$ ).

Abbildung 25: Oberflächenrauigkeit im Hauptversuch  
(Median, 25/75 Perzentilen)



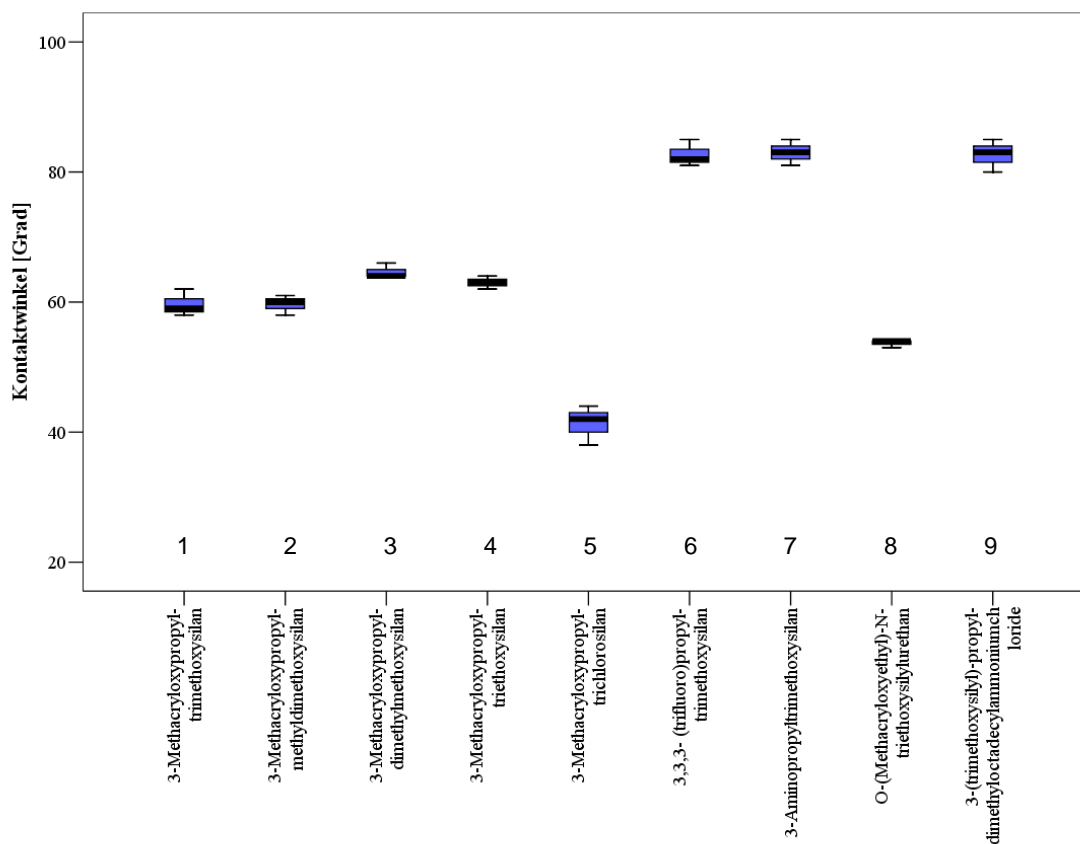
### 5.1.3 Goniometer

Bei allen zu untersuchenden Gruppen ließen sich Unterschiede im Kontaktwinkel im Vergleich zur Referenzprobe Glas nachweisen. Die deutlichsten Unterschiede zeigten sich in der Untersuchungsgruppe der dreifach mit 5prozentiger Silanverdünnung beschichteten Glasplättchen (siehe Abbildung 26 und Tabelle 5). Die Referenzprobe Glas wies Kontaktwinkelwerte um 72 Grad auf.

Die Silane 1 (3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan), 2 (3-Methacryloxypropylmethyldimethoxysilan), 4 (3-Methacryloxypropyltriethoxysilan) zeigten keine signifikanten Unterschiede untereinander, was sich durch deren ähnliche chemische Struktur erklären lässt. Ein signifikant höherer Kontaktwinkel wurde für Silan 3 (3-Methacryloxydimethylmethoxysilan) im Vergleich zu Silan 1 und 2 ermittelt, gegenüber Silan 4 konnte in statistischer Hinsicht kein Unterschied festgestellt werden.

Der Kontaktwinkel von Silan 5 (3-Methacryloxypropyltrichlorosilan) lag signifikant unter dem Wert für Silan 8 (O-(Methacryloxyethyl)-N-triethoxysilylurethan). Beide Silanbeschichtungen führten zudem gegenüber den anderen Proben zu einer signifikanten Reduktion der goniometrischen Ergebnisse. Signifikant höher als die Silane 1-5 und 8 unterschieden sich davon die goniometrischen Werte für die Silanverbindungen 6 (3, 3, 3-(trifluor)propyltrimethoxysilan), 7 (3-Aminopropyltrimethoxysilan) und 9 (3-(trimethoxysilyl)propyldimethyloctadecylammoniumchlorid), deren Kontaktwinkel als tendenziell hydrophob einzuschätzen sind. Es zeigte sich keine statistisch relevante Abweichung der Werte für die Silane 6, 7, 9 untereinander.

*Abbildung 26: Kontaktwinkelwerte für 3-fache Beschichtung mit 5-prozentiger Lösung der jeweiligen Silanverbindungen (Median, 25/ 75 Perzentilen)*



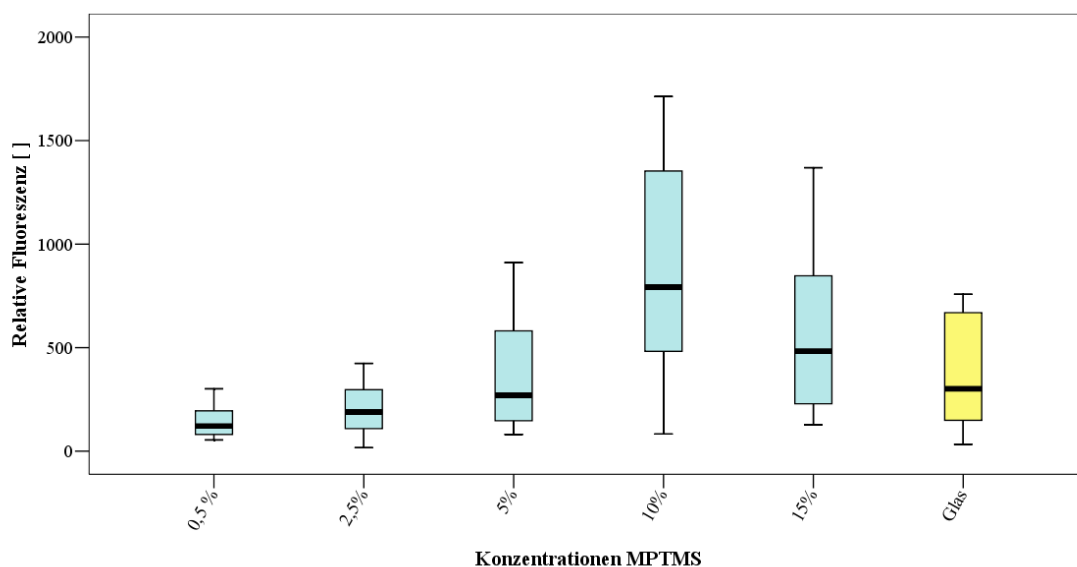
*Tabelle 5: Statistische Analyse (P-Werte): Kontaktwinkelwerte der  
silanbeschichteten Glasplättchen  
(Mann-Whitney U-Test  $p > 0,05$ : statistisch nicht signifikant)*

	Silan 2	Silan 3	Silan 4	Silan 5	Silan 6	Silan 7	Silan 8	Silan 9	Glas
Silan 1	1,000	0,002	0,009	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
Silan 2		0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
Silan 3			0,026	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
Silan 4				0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
Silan 5					0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
Silan 6						0,818	0,002	1,000	0,002
Silan 7							0,002	0,818	0,002
Silan 8								0,002	0,002
Silan 9									0,002

#### 5.1.4 Vorversuch 1 und 2: Einfluss der Konzentration von 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan auf die relative Intensität der Fluoreszenz

Die Ergebnisse der Untersuchung einer möglichen Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität von der Konzentration der Silanbeschichtung sind in Abbildung 27 und Tabelle 6 aufgeführt. Einen Überblick über die statistische Auswertung mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests (Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$ ) gibt Tabelle 7. Die Median-Werte der relativen Fluoreszenzintensität dieser Untersuchung lagen zwischen 121 und 793. Die Silanbeschichtung mit einer 10% Lösung ergab den höchsten Wert. Die niedrigsten Werte der relativen Fluoreszenzintensität ergaben sich für eine Konzentration von 0,5%. Signifikante Unterschiede konnten zwischen den Gruppen 0,5 % zu 10,0 % und 15,0 % sowie 2,5 % zu 10,0 % ermittelt werden.

*Abbildung 27: Relative Fluoreszenzintensität bei unterschiedlichen Konzentrationen (0,5 %, 2,5 %, 5,0 %, 10,0 %, 15,0 %) von  $\gamma$ -MPS (Mediane, 25/ 75 Perzentilen)*



*Tabelle 6: Tukey-Angelpunkte: Relative Fluoreszenzintensität bei unterschiedlichen Konzentrationen von  $\gamma$ -MPS beschichteten Proben*

<b>Konzentration [%]</b>	<b>Fluoreszenzintensität [] Median (25 %/75 %)</b>
0,5 %	121 (81/ 195)
2,5 %	190 (109/ 297)
5,0 %	271 (147/ 581)
10,0 %	793 (482/ 1353)
15,0 %	483 (229 / 847)
Glas	301 (149/ 669)

*Tabelle 7: Statistische Analyse Mann-Whitney-U-Test (P-Werte): Relative Fluoreszenzintensität bei unterschiedlichen Konzentration von  $\gamma$ -MPS beschichteten Proben ( $p > 0,05$ : statistisch nicht signifikant)*

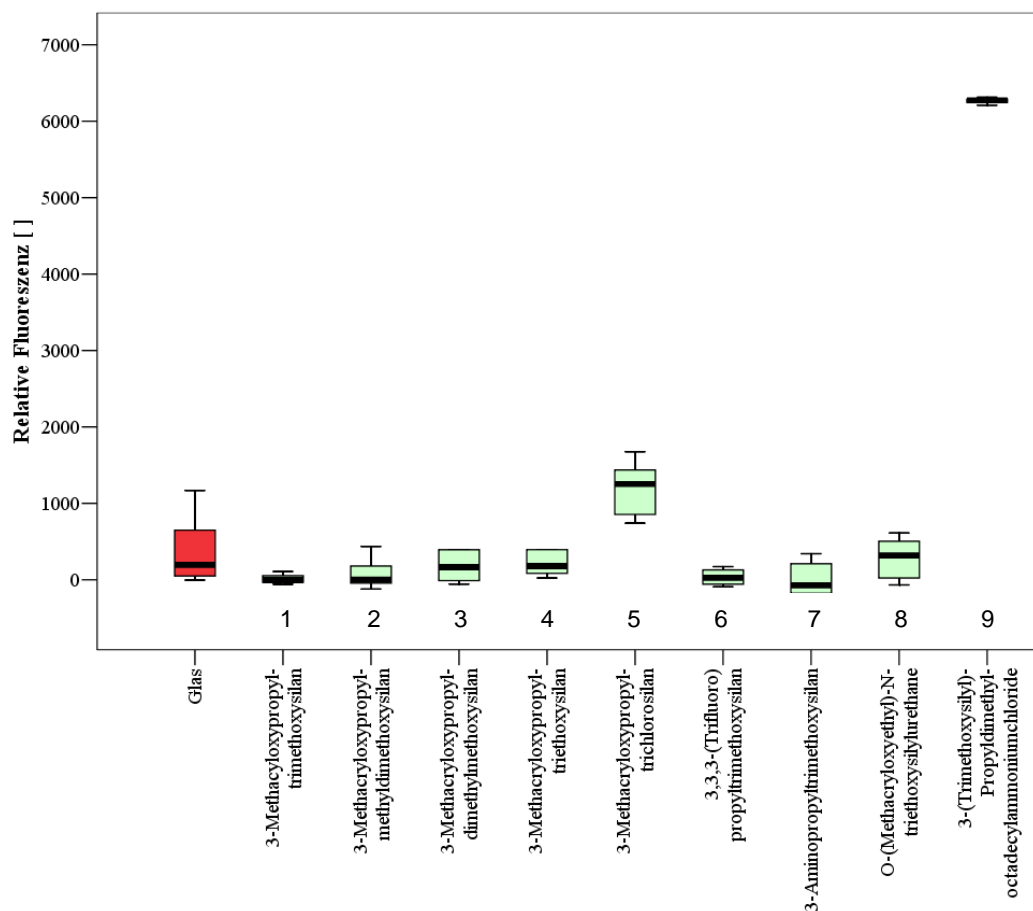
	<b>2,5 %</b>	<b>5,0 %</b>	<b>10,0 %</b>	<b>15,0 %</b>	<b>Glas</b>
<b>0,5 %</b>	0,481	0,075	0,002	0,004	0,190
<b>2,5 %</b>		0,315	0,005	0,043	0,247
<b>5,0 %</b>			0,023	0,218	0,912
<b>10,0 %</b>				0,218	0,023
<b>15,0 %</b>					0,353

## 5.2 Hauptversuche

### 5.2.1 Hauptversuch 1 und 2: Ermittlung der relativen Fluoreszenzintensität für Silan 1-9

Die Ergebnisse der Bakterienadhäsionsversuche mit neun chemisch unterschiedlichen Silanverbindungen sind in Abbildung 28 und Tabelle 8 dargestellt. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test (Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$ ).

Abbildung 28: Relative Fluoreszenzintensität der Silanbeschichteten Proben 1-9 (Mediane, 25/ 75 Perzentilen)



Die Median-Werte der relativen Fluoreszenzintensität für die bakterielle Adhäsion lagen zwischen -176 und 6247. Die höchsten Adhäsionswerte zeigte die Silanverbindung 3-(trimethoxysilyl)-propyldimethyloctadecylammoniumchlorid (Silan 9), die geringsten Werte zeigten sich bei Silan 3-Aminopropyltrimethoxysilan (Silan 7). Keine signifikanten Unterschiede konnten zwischen der Referenzprobe Glas und den Silanen 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan (Silan 1), 3-Methacryloxypropylmethyldimethoxysilan (Silan 2), 3-Methacryloxypropyldimethylmethoxysilan (Silan 3), 3-Methacryloxypropyltriethoxysilan (Silan 4), 3,3,3-(trifluor)propyltrimethoxysilan (Silan 6), 3-Aminopropyltrimethoxysilan (Silan 7) und O-(Methacryloxyethyl)-N-triethoxysilylurethan (Silan 8) nachgewiesen werden. Signifikant deutlich erhöhte Werte wies 3-(trimethoxysilyl)propyldimethyloctadecylammoniumchlorid (Silan 9) gegenüber allen anderen Proben auf.

3-Methacryloxypropyltrichlorosilan (Silan 5) zeigte im Vergleich zu den restlichen Proben signifikant höhere Werte für die relative Fluoreszenzintensität.

*Tabelle 8: Tukey-Angelpunkte: Relative Fluoreszenzintensität der Silanbeschichteten Proben 1-9*

<b>Probe</b>	<b>Fluoreszenzintensität [I] Median (25 %/75 %)</b>
Glas	198 (50/ 649)
Silan 1	-33 (-2/ 53)
Silan 2	-43 (3/ 180)
Silan 3	-11 (167/ 393)
Silan 4	84 (181/ 394)
Silan 5	855 (1254/ 1437)
Silan 6	-57 (29/ 129)
Silan 7	-176 (-70/ 210)
Silan 8	24 (317/ 504)
Silan 9	6247 (6272/ 6287)

*Tabelle 9: Statistische Analyse Mann-Whitney-U-Test (P-Werte): Relative  
Floureszenzintensität der Silanbeschichteten Proben 1-9  
( $p > 0,05$ : statistisch nicht signifikant)*

	Silan 1	Silan 2	Silan 3	Silan 4	Silan 5	Silan 6	Silan 7	Silan 8	Silan 9
<b>Glas</b>	0,007	0,063	0,684	0,684	< 0,001	0,075	0,035	0,912	< 0,001
<b>Silan 1</b>		0,971	0,075	0,003	< 0,001	0,796	0,165	0,019	< 0,001
<b>Silan 2</b>			0,315	0,089	< 0,001	1,000	0,218	0,089	< 0,001
<b>Silan 3</b>				0,481	< 0,001	0,247	0,043	0,481	< 0,001
<b>Silan 4</b>					0,007	0,043	0,023	0,853	< 0,001
<b>Silan 5</b>						< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001
<b>Silan 6</b>							0,280	0,089	< 0,001
<b>Silan 7</b>								0,019	< 0,001
<b>Silan 8</b>									< 0,001

## 6 Diskussion

### 6.1 Diskussion der Methoden

Grundsätzlich ist bei Versuchsaufbauten zwischen Versuchen, die *in vivo* oder *in vitro* durchgeführt werden, zu unterscheiden.

Um die intraoralen physiologischen Bedingungen exakt reproduzieren zu können, werden bei *in vivo*-Versuchen die Prüfkörper direkt in der Mundhöhle befestigt. Es besteht die Möglichkeit die zu untersuchenden Materialien entweder dauerhaft in den Zahn als Füllung bzw. Einlagerrestauration einzubringen oder temporär über herausnehmbare Apparaturen, beispielsweise in Form von Tiefziehschienen [Krämer 1990], individuell gegossenen Unterkieferbügeln [Krekeler 1984], experimentellen, mit Geschieben für Proben versehenen Brücken [Grimm 1989] oder entfernbaren Splints [Hannig 1997] dem oralen Milieu auszusetzen.

Die Ergebnisse von *in vivo*-Versuchsaufbauten sind interindividuell und auch intraindividuell (z. B. orale und bukkale Unterschiede) verschieden und sind somit nicht standardisierbar und vergleichbar [Hannig 1997]. In der Literatur wird beschrieben, dass die Zusammensetzung der Pellikel an verschiedenen Stellen der Mundhöhle intraindividuell verschieden ist [Hannig 1997]. Die Speichelzusammensetzung weist ebenfalls inter- und intraindividuelle Unterschiede auf, da beispielsweise die Proteinzusammensetzung und -konzentration stark variieren kann und durch den Einfluss der jeweiligen Speicheldrüsen an verschiedenen Stellen im Mund unterschiedlich ist [Hannig 1997]. Dies kann ebenso wie lokal auftretende Scherkräfte und Selbstreinigungseffekte intraoral zu einer unterschiedlichen Pellikelbildung auf identischen Prüfkörpern führen, wenn sie z. B. bukkal und palatinal angebracht werden [Hannig 1997]. Ein weiteres Problem bei *in vivo*-Untersuchungen stellt die Kontamination mit Mikroorganismen, aber auch die mögliche Beschädigung des intraoral gebildeten Pellikels bei der Probenentnahme dar. Erschwerend kommt hinzu, dass die hohe Anzahl zu verwendender Proben bei einem

Probanden schlecht zu realisieren ist. Aus den oben genannten Gründen wurde einer *in vitro*-Versuchsanordnung für die vorliegende Untersuchung der Vorzug gegeben.

Bei *in vitro*-Versuchen werden die physiologischen Gegebenheiten im Labor imitiert. Man unterscheidet zwischen statischen und dynamischen Versuchsaufbauten, sowie zwischen reinen Bakterienanlagerungstests und Versuchsaufbauten bei denen künstliche Pellikel auf die Proben aufgebracht werden. Der Vorteil der dynamischen gegenüber der statischen Methode, liegt in der Simulation der hydrodynamischen Bedingungen der Mundhöhle, wie beispielsweise dem Speichelfluss und den Scherkräften.

Die vorliegende Untersuchung wurde unter semistatischen Versuchsbedingungen und als reiner Bakterienanlagerungstest durchgeführt.

### **6.1.1 Bakterienauswahl**

Für die Versuche wurde als repräsentatives Bakterium *Streptococcus mutans* verwendet. *S. mutans* zählt mit einer Konzentration im menschlichen Speichel von  $1 \times 10^5$  Zellen pro ml Speichel [Kawashima 2003] zu den häufigsten Keimen innerhalb des orofazialen Systems. *In vivo*-Untersuchungen durch NYVAD *et. al.* zeigten, dass *S. mutans* innerhalb der initialen Plaque weniger als zwei Prozent der gesamten Streptokokkenflora ausmacht [Nyvad 1990]. Es ist nicht vollständig geklärt, inwiefern das Bakterium *in vivo* direkt an das erworbene Pellikel oder vielmehr an schon adhärente orale Mikroorganismen bindet [Douglas 1984].

*S. mutans* bindet an Zahnschmelz und Oberflächen, die zuvor nicht mit Speichel inkubiert wurden. Zahlreiche Studien haben sich mit dem Einfluss der Speichelinkubation auf die *in vitro* Adhäsion von *S. mutans* an Zahnoberflächen [Orstavik 1974, Tinanoff 1979, Pratt-Terpstra 1989, Weerkamp 1988], Glas [Busscher 1992] und Restaurationsmaterialien [Satou 1991, Ahn 2007, Tanner 2000] befasst. Die Untersuchungsergebnisse von ORSTAVIK *et. al.*, PRATT-TERPSTRA *et. al.*, WEERKAMP *et. al.* stimmen darin überein, dass eine Adhäsion von *S. mutans* an Schmelz in Abwesenheit von Speichel stattfindet

[Pratt-Terpstra 1989, Orstavik 1974, Weerkamp 1988]. Der Speichelüberzug von Oberflächen hat allerdings einen reduzierenden Effekt auf die bakterielle Adhäsion [Pratt-Terpstra 1989, Orstavik 1974, Weerkamp 1988]. WEERKAMP *et. al.* beobachteten zudem, dass *S. mutans* eine größere Affinität zu Dentin als zu Schmelz hat, was auf spezifische Rezeptoren für Bestandteile des Dentins zurückgeführt wurde [Weerkamp 1988]. BUSSCHER *et. al.* unterstrichen die Bedeutung der Struktur und der Zusammensetzung des Pellikels in Hinsicht auf die Adhäsion von *S. mutans*-Stämmen. Auf mit Speichel überzogenen Glasoberflächen konnten quantitativ weniger *S. mutans*-Zellen nachgewiesen werden als auf unbehandelten [Busscher 1992]. Die Untersuchungen von SATOU *et. al.* belegen ebenfalls den positiven Einfluss des Speichels auf eine verringerte Zahl adhärenter *S. mutans* auf Restaurationsoberflächen im Vergleich zu unbehandelten Oberflächen [Satou 1991]. Im Gegensatz dazu konnten AHN *et. al.* bei ihren Untersuchungen keinen signifikanten Einfluss der Speichelbehandlung auf die Adhäsion von *S. mutans* an dentalen Materialien nachweisen. Bei Verlängerung der Inkubationszeit mit Speichel konnte lediglich die Tendenz eines reduzierenden Effektes auf die Adhäsion aufgezeigt werden [Ahn 2007].

Somit ist ein Pellikel nicht Voraussetzung für die Anlagerung dieses Bakteriums an soliden Oberflächen [Tinanoff 1979], was einen Versuchsaufbau ohne Pellikelbeschichtung durchaus zulässt.

### **6.1.2 Experimentelle Bakterienanlagerung *in vitro***

Bei der Betrachtung von Bakterienanlagerungstests *in vitro* ist grundsätzlich zu unterscheiden, welche Bakterienspezies verwendet und welcher Fokus auf die Untersuchung gelegt wurde. Das Adhäsionsverhalten der intraoral vorkommenden Mikroorganismen zeigt unterschiedliche Adhäsionsmechanismen an Festkörperoberflächen, was ein gegensätzliches Verhalten ohne und mit Pellikel zur Folge hat. So konnte beispielsweise für die *Streptokokken*-Stämme *S. sanguis* und *S. mitis* bei Anwesenheit einer experimentell gebildeten Pellikelschicht aus Speichelproteinen eine signifikant

höhere Adhärenz bei den Studien von GIBBONS et al. nachgewiesen werden [Gibbons 1989]. In anderen Untersuchungen bewirkte die Inkubation von Speichel bei *S. sanguis* eine Inhibition der Adhäsion [Orstavik 1974, Satou 1991]. Im Gegensatz dazu, bewirkte die Adsorption von Speichelproteinen eine Abnahme der mikrobiellen Anheftung von *S. mutans* [Orstavik 1974, Satou 1991, Busscher 1992, Weerkamp 1988, Pratt-Terpstra 1989], *S. salvarius* [Clark 1978] und *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) [Clark 1978, Ahn 2007, Busscher 1992].

*S. mutans* bindet eher über elektrostatische Interaktionen, verursacht durch die Oberflächenspannung verschiedener Materialien. Die Anwesenheit eines Speichelüberzuges reduziert die Oberflächenspannung des Materials [Satou 1991, Weerkamp 1988] und erklärt die Beobachtung aus zahlreichen Studien, dass *S. mutans* nach einer Pellikelbeschichtung in geringerem Ausmaß adhäriert [Orstavik 1974, Satou 1991, Busscher 1992, Weerkamp 1988, Pratt-Terpstra 1989].

Ein weiteres wesentliches Unterscheidungsmerkmal von *in vitro* Bakterienanlagerungstests ist, ob der Betrachtungsfokus auf die initialen Bindungsvorgänge oder die Plaquebildung und Reifung gelegt wurde. Für die Untersuchung initialer Bindungsvorgänge sind kurze Inkubationszeiten der Proben mit der jeweiligen Bakterien suspension erforderlich, wohingegen bei Versuchen zum Studium der Plaquereifung längere Inkubationszeiten von Tagen [Kawai 2001b, Einwag 1991] und Wochen notwendig sind. In *in vitro*-Studien zu initialen Adhäsionsvorgängen erfolgte die Inkubation der zu untersuchenden Oberflächen mit der Bakterienlösung über Zeiträume von weniger als zwei [Carlen 2001, Olsson 1992] oder zwei [Satou 1988] bis vier [Montanaro 2004] Stunden. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Silanproben mit der Bakterienlösung für zweieinhalb Stunden inkubiert, um sicher von einer Adhäsion von *S. mutans* an den Silanoberflächen ausgehen zu können.

Determiniert wird die initiale Adhäsion von *S. mutans* an glatten Oberflächen, wie bereits erwähnt, durch elektrostatische Wechselwirkungen [Satou 1988]. Die weiteren Anheftungsvorgänge unterliegen dagegen extrazellulären

enzymatischen Aktivitäten. Die verwendete Bakterienspezies besitzt mittels des Enzyms Glucosyltransferase die Fähigkeit zur Synthese von extrazellulären Polysacchariden bzw. Glucanen aus Saccharose. ROSAN *et. al.* unterstrich die Bedeutung von Glucanen als Promotoren interbakterieller Bindungsvorgänge bei *S. mutans* und *S. sobrinus* [Rosan 2000]. Zudem gibt es neben Adhäsine Glykosyltransferase, verschiedene als Glucan-bindende-Proteine bezeichnete Oberflächenproteine, die als Bindungsmediatoren aktiv sind [Rosan 2000]. In einigen Studien wird aus diesem Grund dieses Enzym und Saccharose in den Versuchsaufbau integriert, um eine Synthese von Glucanen *in vitro* zu ermöglichen [Shahal 1998, Steinberg 2002]. Die pellicelbedeckten Proben werden dazu eine Stunde mit einer Glykosyltransferasesuspension, anschließend mit *S. mutans* und Saccharose, je nach Versuchsaufbau entweder zusammen [Steinberg 2002] oder hintereinander [Shahal 1998] inkubiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde weder eine Pellicelbildung, noch eine Zugabe des Enzyms Glykosyltransferase sowie Saccharose zur Bakteriensuspension durchgeführt.

Bindungsstellen für *S. mutans* an Polysacchariden stellen einen wichtigen Faktor der bakteriellen Anheftung dar, allerdings werden diese Mechanismen zur sekundären Phase der mikrobiellen Adhäsion gezählt [Rosan 2000]. Ein Polysaccharidüberzug durch Zugabe von Saccharose im Überschuss würde zudem jegliche materialspezifischen Unterschiede maskieren [Shahal 1988]. Für die vorliegende Untersuchung war die initiale Adhäsion von *S. mutans* sowie das unterschiedliche Adhäsionsverhalten auf den chemisch unterschiedlichen Silanoberflächen von Interesse.

In einigen Studien erfolgte eine Normierung der verwendeten Bakterienlösung mittels photometrischer Verfahren um etwaige Schwankungen der Bakteriendichte zu eliminieren [Satou 1991, Shahal 1998, Grivet 2000]. Eine Schwankung der Anzahl, der mit den zu untersuchenden Proben inkubierten Mikroorganismen, kann einen Einfluss auf die Adhäsionswerte haben. Nach Untersuchungen in der eigenen Poliklinik, ist nach zwölfstündiger Inkubation der

Mikroorganismen von einer stationären Phase, hinsichtlich des Wachstumsverhaltens von *S. mutans* auszugehen.

### 6.1.3 Versuchsbedingungen

Aussagekräftige *in vitro* Untersuchungen bedingen genau definierte, der Realität möglichst ähnliche Versuchsbedingungen.

In diesem Zusammenhang kommt Versuchsparametern wie der Temperatur, dem Vorhandensein von Speichel sowie intraoral auftretenden Scher- und Selbstreinigungskräften große Bedeutung zu.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein semistatischer Versuchsaufbau ohne die Verwendung von Speichel gewählt. Die Inkubation der Silanoberflächen mit der Bakteriensuspension wurde bei 37 °C durchgeführt, um Bedingungen ähnlich den der Mundhöhle zu erzeugen [Satou 1991, Steinberg 2002]. Adhäsionsversuche werden in vielen Studien ebenfalls bei 37 °C durchgeführt [Satou 1991, Shahal 1998, Steinberg 2002, Bürgers 2008, Hahnel 2008]. Bei semistatischen Bedingungen ist es im Gegensatz zu statischen Versuchsaufbauten möglich, die in der Mundhöhle auftretenden Scherkräfte nachzuahmen. Nach der Inkubation der Silanproben mit der Bakterienlösung wurden die Proben mittels eines Schüttelgerätes bewegt.

Um möglichst realistische Bedingungen der Adhäsionsprozesse von Mikroorganismen *in vitro* simulieren zu können, bedarf es komplexer Versuchssysteme bei denen die in der Mundhöhle wirksame Speichelsekretion und die Scherkräfte Beachtung finden. Diesen Anforderungen wird bei Verwendung eines Fließkammersystems Rechnung getragen, da auf diese Weise die *in vivo* auftretenden Scherkräfte und die kontinuierliche Speichelsekretion imitiert und ihre Intensität variiert werden kann [Busscher 1995, Busscher 1992, Rosentritt 2008, Eick 2004].

Bei *in vitro* Untersuchungen, die die Adhäsion von Mikroorganismen an Festkörperoberflächen unter dynamischen Bedingungen untersuchten, wurde die Bedeutung der Scherkräfte [Newmann 1974, Quirynen 1995, Christersson 1989] und die Auswirkung des Speichelflusses [Christersson 1989]

herausgestellt. CHRISTERSSON *et. al.* konnten bei ihren Untersuchungen zeigen, dass sich bei einer Steigerung der Fließgeschwindigkeit, die bakterielle Adhäsion um 70-80% reduziert [Christersson 1989]. Versuchsaufbauten mit Fließkammersystemen sind allerdings technisch sensibel. Es ist daher notwendig eine exakte Definition von Parametern wie Scherkraft und Fließgeschwindigkeit des Speichels in Vorversuchen zu ermitteln, um den Versuchsaufbau optimal nutzen zu können. Bei Inkubationszeiten über 24 Stunden haben statische Versuchsaufbauten, bei denen die Proben nur mit der entsprechenden Suspension inkubiert werden [Montanaro 2004, Bürgers 2007, Hahnel 2007] gegenüber dynamischen Bedingungen den Nachteil, dass aufgrund einer Akkumulation von toxischen bakteriellen Stoffwechselprodukten mit einer Abnahme der metabolisch aktiven Mikroorganismen gerechnet werden muss [Eick 2004].

Problematiken in Hinblick auf die Ansammlung und Einflussnahme von toxischen Stoffwechselprodukten ergaben sich bei der geringen Versuchsdauer von zweieinhalb Stunden nicht.

#### **6.1.4 Auswertmethodik**

Die Methoden für die Quantifizierung von adhärenenten Bakterien auf Oberflächen sind vielfältig.

Sehr verbreitet ist die quantitative Auswertung mittels rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen mit einer manuellen oder computergestützten Auszählung der auf den Proben anheftenden Bakterien [Satou 1988, Satou 1991, Tanner 2000]. Zu der indirekten Technik der Quantifizierung von Mikroorganismen nach der Entfernung von Oberflächen mittels Ultraschall, zählen die Zählung per Szintillation von radioaktiv markierten Organismen [Kawai 2001a, Shahal 1998, Steinberg 1999] sowie die Quantifizierung von Metaboliten (5-cyano-2,3-ditolyltetrazoliumchlorid) [An 1997, Kawai 2001a] und die Zählung mit Hilfe des sogenannten *Coulter Counter*, der Zytofluorometrie [Logan 1998, Pils 2006] oder der Spektrophotometrie [An 1997]. Dabei erfordert die Anwendung von

Szintillationsmethoden einen verhältnismäßig großen technischen und finanziellen Aufwand. Durch Inkubation mit einer Tritium oder  $^{35}\text{S}$ -Methionin angereicherten Nährlösung erfolgt die radioaktive Markierung der Mikroorganismen, deren Quantifizierung mit Hilfe eines Szintillationsgerätes durchgeführt wird [Kawai 2001a, Steinberg 1999, Carlen 2001]. Bei dem wenig sensitiven Verfahren der Färbemethoden, werden die abgelösten Bakterien in der entstandenen Lösung angefärbt. Die Auswertung kann aufgrund der Korrelation zwischen der Farbintensität und der Anzahl der in Lösung enthaltenen Bakterien durchgeführt werden. Ein einfaches Verfahren für die Bestimmung des Wachstums von Bakterienkolonien stellt dagegen die kulturelle Anzucht auf Agarplatten dar. Die Bakterien werden mittels Ultraschall von den Proben abgelöst, auf Agarplatten inkubiert und nach Proliferation wird die Quantifizierung der Mikroorganismen vorgenommen [Fijan 2005, Olsson 1976]. Weniger häufig finden die Gewichtsbestimmung der Plaque und die optisch mikroskopische Planimetrie Verwendung. Die Bakteriengewichtsbestimmung ist ein einfaches Verfahren, allerdings sind Mindestmengen von Mikroorganismen nötig, um eine Auswertbarkeit zu ermöglichen. Dies wird durch lange Inkubationszeiten erreicht, wodurch diese Methode zur Betrachtung der initialen Adhäsionsvorgänge nicht geeignet ist [Sissons 1995].

Die quantitative Messung der bakteriellen Adhäsion auf den Silanoberflächen erfolgte in dieser Untersuchung durch Ermittlung der relativen Fluoreszenzintensität. Der Vorteil dieses Verfahrens gegenüber den oben beschriebenen Methoden, liegt in der Möglichkeit genaue Messungen bei einer verhältnismäßig einfachen Handhabung durchzuführen. O'BRIEN *et al.* beschrieb in seinen Untersuchungen, dass bereits 80 mikrobielle Zellen ein hinreichend genaues und reproduzierbares Fluoreszenzsignal emittieren [O'Brien 2000]. Eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der adhärenen Mikroorganismen mit metabolisch aktiven Zellen und der Reduktion des Resazurin zu fluoreszierenden Resorufin konnte nachgewiesen werden [Nakayama 1997, O'Brien 2000, Voytik-Harbin 1998]. Es ist möglich durch Ermittlung der Fluoreszenzintensität das quantitative Ausmaß der bakteriellen

Adhäsion auf festen Oberflächen zu ermitteln [Bürgers 2007, Collins 1997, O'Brien 2000]. O'BRIEN *et. al.* beschrieben als nachteiligen Effekt der Resazurin-Reduktionsmethode, dass nach Reduktion von Resazurin zu Resorfin ein weiterer Reduktionsprozess erfolgen kann, bei dem das nicht fluoreszierende Hydroresazurin entsteht [O'Brien 2000]. Die lange Halbwertszeit von Resorufin kann in Hinblick auf die Quantifizierung dazu führen, dass nicht aktive Zellen aufgrund des vorhandenen Resorufin in die quantitative Ermittlung einbezogen werden, aber Zellen, in denen noch Reduktionsprozesse ablaufen und in denen Hydroresazurin gebildet wird, quantitativ nicht erfasst werden [O'Brien 2000]. Derartige Probleme werden bei Versuchen mit langen Inkubationszeiten beobachtet. Bei einer Inkubation von zwei Stunden wurde lediglich eine geringe Fluoreszenz von metabolisch nicht aktiven Zellen gegenüber aktiven Zellen nachgewiesen [O'Brien 2000].

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Beeinflussung der Messergebnisse durch nicht adhärente Bakterien eliminiert, indem ein zweimaliger Waschvorgang mit PBS nach zweieinhalbstündiger Inkubation der Silanoberflächen mit *S. mutans* erfolgte. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass bei dieser Vorgehensweise Zellen von der Probenoberfläche gelöst wurden und somit eine geringere Menge an adhärennten *S. mutans* quantifiziert wurde.

## 6.2 Diskussion der Ergebnisse

### 6.2.1 Fourier-Transformations- Infrarot-Spektroskopie (FT/IR)

Zur Überprüfung der Silanbeschichtungen vor und nach den Adhäsionsversuchen wurde das Verfahren der Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FT/IR) herangezogen. Diese Methode ermöglichte es wertvolle Informationen über die Qualität beziehungsweise Beschaffenheit der Silanproben zu gewinnen; das resultierende Spektrum repräsentiert die molekulare Absorption und Transmission [Günzler 1996]. Für die Identifikation der Peaks und der Zuordnung zu einzelnen chemischen Molekülstrukturen existieren unterschiedliche Aussagen in der Literatur [Coates 2000, Günzler 1996, Matinlinna 2004, Vaz 2002, Söderholm 1993, Plueddemann 1982].

In Vorversuchen wurde mit Hilfe dieses Verfahrens die Konzentration für die Silanverdünnungen ermittelt, die eine eindeutige Darstellung der jeweiligen chemisch unterschiedlichen Silanhaftvermittler als Transmissionsspektrum zuließ. Spezifische Transmissionsspektren konnten für die neun unterschiedlichen Silanverbindungen, bei einer Konzentration von 5,0 % und einer Applikationsmenge von 40 µl, für Glaskörper mit einem Durchmesser von zwölf Millimetern dargestellt werden. Bei dieser Applikationsmenge wurde eine gleichmäßigere Benetzung der Oberfläche mit der Silanlösung ermöglicht.

Die deutlichsten Peaks der Spektren wurden bei den dreifach beschichteten Proben beobachtet, folglich war bei diesen Proben die Beschichtung im Vergleich zur einmaligen Behandlung deutlich effektiver.

Als Probekörper wurden Glasplättchen verwendet, die im Wesentlichen zu 70-80% aus Siliciumdioxid sowie Natriumoxid, Kaliumoxid, Aluminiumoxid und Bortrioxid bestehen. Bei Wellenlängen zwischen 400 bis 1500 cm<sup>-1</sup> war die Menge des transmittierten Lichtes des Probekörpers Glas sehr gering, wodurch der Nachweis von spezifischen Schwingungsbanden in diesem Bereich aufgrund von Überlappungen nicht möglich bzw. schwierig ist.

Alle in dieser Untersuchung verwendeten Silanverbindungen besitzen in ihrem molekularen Aufbau einen Propylenverbinder ( $\text{R-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-R}$ ), dessen Streckschwingungen bei einer Wellenlänge von 700 bis  $1300\text{ cm}^{-1}$  zu erwarten ist [Coates 2000]. In einem Wellenlängenbereich von 1650 bis  $1790\text{ cm}^{-1}$  zeigten alle Silanverbindungen, die in molekularer Hinsicht eine Methacryloxygruppe aufweisen (Silane 1, 2, 3, 4, 5, 8) eine identische Anordnung von zwei aufeinander folgenden Peaks, die auf die Valenzschwingungen des Carbonsäureesters ( $\text{R-CO-O-R}$ ) bei  $1735\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$  sowie der Alkenylgruppe ( $\text{C=C}$ ) bei etwa  $1630\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$  zurückzuführen ist. Einige Untersuchungen beschrieben zum Nachweis von 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan, dass eine deutliche Absorption in einem Wellenlängenbereich von etwa  $1720\text{ cm}^{-1}$  aufgrund der Valenzschwingung einer Carbonylbindung ( $\text{C=O}$ ) auftritt [Coates 2000, Plueddemann 1982, Söderholm 1993]. In anderen Untersuchungen wurde dieser Peak zwischen  $1731\text{ cm}^{-1}$  [Vaz 2002] und  $1735\text{ cm}^{-1}$  [Matinlinna 2004] gefunden. Ein schwächeres Schwingungsband wird durch die Alkenyl-Bindung ( $\text{C=C}$ ) bei  $1635\text{ cm}^{-1}$  gefunden [Coates 2000, Plueddemann 1982, Söderholm 1993, Matinlinna 2004]. Die Verbindungen 6, 7 und 9 enthalten auf molekularer Ebene statt des Methacryloxyanteils Fluorid bzw. eine Aminogruppe. Eine Streckschwingung von gebundenen Fluorid ( $\text{R-C-F}$ ) ist zwischen  $1000$  und  $1150\text{ cm}^{-1}$  zu erwarten [Coates 2000], wurde aber bei unseren Versuchen nicht gefunden. Das Spektrum von 3-Aminopropyltrimethoxysilan (Silan 7) wies einen Peak im Bereich  $2480\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$  aufgrund der Streckschwingung der primären Aminogruppe ( $\text{R-C-N}$ ) sowie einen weiteren Peak bei  $3300\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$  auf, der auf Schwingungen der Ammoniakgruppe ( $\text{NH}_2$ ) beruht [Coates 2000].

Bei der Betrachtung von Aminopropyltrialkoxysilan wurden Siloxanbindungen zusammen mit einer Verschiebung des  $\text{NH}_2$ -Bandes von  $1600\text{ cm}^{-1}$  nach  $1575\text{ cm}^{-1}$  nachgewiesen. Das Valenzschwingungsband bei  $1575\text{ cm}^{-1}$  entspricht dabei der Hydrogenbindung zu  $\text{NH}_2$ , während das Band bei  $1600\text{ cm}^{-1}$  den freien  $\text{NH}_2$ -Gruppen zugeordnet wird. PLUEDDEMANN schlussfolgerte, dass Aminopropyltrialkoxysilan in zwei Strukturformen nebeneinander besteht. Eine Form ist eine offene und die andere eine cyclische hydrogen gebundene

Aminstruktur. Ein schwaches Absorptionsband bei  $2150\text{ cm}^{-1}$  lässt einen partiellen Protonentransfer in der Ringstruktur vermuten. Diese Ringstruktur würde zudem die Stabilität des Silans in einer wässrigen Lösung erklären [Plueddemann 1982]. Die Silanverbindung 9 enthält eine quaternäre Aminogruppe, die im Spektrum bei  $1150\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  Streckschwingungen der Bindung zwischen Kohlenstoff und Stickstoff abbilden kann [Coates 2000].

In der Untersuchung von MATINLINNA *et al.* konnten desweiteren ein deutliches Schwingungsband bei etwa  $1055\text{ cm}^{-1}$  als Zeichen für die Ausbildung von Siloxanbindungen (Si-O-Si) gefunden werden [Matinlinna 2004]. Lediglich 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan in einer Silankonzentration von 15,0 % zeigte in unserer Untersuchung eine schwache Bande im Bereich zwischen  $1000$  und  $1100\text{ cm}^{-1}$ , welche der Ausbildung von Siloxanbindungen zur Glasoberfläche zu zuordnen wäre. COATES zufolge wären im Transmissionsspektrum in einem Bereich von  $1080\text{-}1120\text{ cm}^{-1}$  Siloxangruppen (der Form Si-O-C) und zwischen  $1150\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$  Schwingungsbänder der Silanolgruppen (Si-OH) zu erwarten [Coates 2000]. Die bereits beschriebenen zwei Peaks zwischen  $2800$  und  $3250\text{ cm}^{-1}$  bei den Silanen 1, 2, 3, 9 sind auf die Methyl- und Methoxygruppen zurück zuführen. Diese Beobachtung spricht für die Tatsache, dass nicht alle Methoxysilan-Gruppen zu einer Siloxanbindung (Si-O-Si) reagiert haben und sich keine Monolayer gebildet haben können. Bei den Silanen 4 und 8 zeigten sich in diesem Bereich drei aufeinanderfolgende Peaks, die im Zusammenhang mit der gemeinsamen Molekülstruktur der Ethoxygruppen stehen.

Das Transmissionsspektrum von 3-Methacryloxypropyltrichlorosilan (Silan 5) unterscheidet sich von denen der Silane 1-4 deutlich durch die intensiv ausgeprägte Bande bei  $3000\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$ , chemisch unterscheidet sich diese Verbindung von den anderen Silanen durch die Chlorosilan-Gruppe. Ein Schwingungsband bei diesen Wellenlängen findet sich außerdem bei den Silanen 6, 7, 8, 9. MATINLINNA *et al.* führten das Auftreten von intensiven Banden in Bereichen von  $3300$  bis  $3650\text{ cm}^{-1}$  auf den Anstieg von freien Hydroxylgruppen auf der Oberfläche zurück und werteten dies als Indikator für die Bildung von Silanolgruppen [Matinlinna 2004]. Silan 8 weist im Gegensatz

zu den anderen Silanen eine Carbonsäureamidgruppe (R-O-CO-N-R) auf, die im Spektrum durch einen kleinen Peak bei etwa  $2650\text{ cm}^{-1}$  sichtbar ist [Coates 2000].

Eine Veränderung der Transmissionsspektren nach der Durchführung der Adhäsionsversuche mit *S. mutans* war zu erwarten. Die Spektren aller untersuchten Silane zeigten eine Veränderung der Transmissionswerte. Es ist davon auszugehen, dass 3-Methacryloxypropyltrichlorosilan (Silan 5) die stabilste Beschichtung von allen Proben war, da die Spektren vor und nach Adhäsionsversuch die geringsten Abweichungen aufwiesen. Bei den Silanen 6 und 8 wurde eine Verschiebung der jeweiligen Spektren zu höheren Transmissionen beobachtet, daher kann davon ausgegangen werden, dass ein Teil der Silanbeschichtung auch nach den Adhäsionsversuchen eine Bindung zur Glasoberfläche hatte. Ungebundene Silanmoleküle wurden demzufolge weggespült bzw. abgelöst. Die Spektren der Silanen 1-4, 7 und 9 zeigten deutliche Unterschiede zwischen den Messungen vor und nach Durchführung der Adhäsionsversuche. Bei den Silanen 1-4 verschwanden die für die Silanverbindung charakteristischen Peaks in den Wellenlängenbereichen  $1650$  bis  $1790\text{ cm}^{-1}$  sowie  $2800$  bis  $3250\text{ cm}^{-1}$ . Für ein solches Ergebnis sind verschiedene Ursachen möglich. Zum Einen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Stabilität der Beschichtung der Glaskörper mit dem Silanhaftvermittler nicht gegeben ist. Die FT/IR-Ergebnisse legen zudem die Vermutung nah, dass die aufgetragenen Silane kein Monolayer auf den Glasplättchen gebildet haben. Die Ausbildung einer Siloxanschicht ist zum Einen abhängig von der Silankonzentration, zum Anderen orientieren sich die Silan-Moleküle eher ungerichtet und es entsteht eine Schicht zwischen  $50$ - $100\text{ nm}$  [Matinlinna 2004]. Es ist denkbar, dass sich die Beschichtung während der Adhäsionsversuche teilweise gelöst hat und die nicht über eine Siloxangruppe gebundenen Moleküle daher im Spektrum nicht mehr sichtbar sind. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass mit Hilfe der verwendeten Lösungen die chemische Struktur der Silanverbindungen teilweise verändert wurde und mikrobielle Bestandteile sowie Resorfin auf den Proben nach den Adhäsionsversuchen verblieben sind. Bei Wellenlängen zwischen  $2250$  und

2350  $\text{cm}^{-1}$  fällt bei den Spektren der Silane 6, 7, 8, 9 ein zusätzlicher deutlicher Peak, sowie bei der Referenzprobe Glas, Silan 3 und 5 ein schwacher Peak auf der auf einen solchen Sachverhalt hinweist. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um mögliche Probleme bei der Methode zur Prüfung der bakteriellen Adhäsion auf Silanoberflächen vermeiden zu können.

### 6.2.2 Rauigkeiten

Die Oberflächenrauigkeit der verwendeten Probekörper kann einen deutlichen Einfluss auf die ermittelten Kontaktwinkel besitzen. BUSSCHER *et al.* belegten in ihren Untersuchungen, dass eine Veränderung der Oberflächenrauigkeit ( $R_a$ ) unter 0,1  $\mu\text{m}$  keinen Einfluss auf die Kontaktwinkel hat. Bei größeren Werten für die Oberflächenrauigkeiten als 0,1  $\mu\text{m}$  kommt es zu einer Abnahme des ermittelten Kontaktwinkels, wenn der initiale Kontaktwinkel unter  $60^\circ$  liegt. Für den Fall, dass der initiale Kontaktwinkel größer als  $86^\circ$  ist, führt die steigende Oberflächenrauigkeit zu einer Vergrößerung des Kontaktwinkels. Der Kontaktwinkel bleibt dagegen unverändert bei steigenden Oberflächenrauigkeiten und initialen Kontaktwinkeln der Oberfläche zwischen  $60^\circ$  und  $86^\circ$  [Busscher 1984]. Für alle mit Silan beschichteten Oberflächen, ausser Silan 9 konnte die Forderung nach einer Oberflächenrauigkeit  $R_a$  unter 0,1  $\mu\text{m}$  erfüllt werden. Die mit 3-(trimethoxysilyl)propyldimethyloctadecyl-ammoniumchlorid (QAS, Silan 9) beschichtete Glasoberfläche wies einen Medianwert für  $R_a$  von 0,23  $\mu\text{m}$  auf.

Bei dentalen Materialien besteht ein materialunabhängiger Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Oberflächenrauigkeit und einer erhöhten mikrobiellen Adhäsion [Hannig 1999]. HANNIG wies auf den Einfluss der Oberflächenrauigkeiten und Mikrokratzern als Ausgangspunkte für die bakterielle Besiedlung *in vivo* hin. Diese Unebenheiten werden als initiale Besiedlungspunkte favorisiert, da sie den adhärenen Bakterien Schutz vor Scherkräften bietet [Hannig 1999]. BOLLEN *et al.* ermittelten einen Schwellenwert für die mittlere Rauheit  $R_a$  von 0,2  $\mu\text{m}$ . Rauigkeitswerte die unter

0,2  $\mu\text{m}$  liegen, haben somit unter Fließkammerkonditionen keinen Einfluss auf die bakterielle Adhäsion [Bollen 1997]. ZISSIS *et al.* kamen zum gleichen Ergebnis, dass unterhalb einer arithmetischen Rauigkeit von 0,2  $\mu\text{m}$  nicht mehr von einem Einfluss der Oberflächenrauigkeit auf die bakterielle Adhäsion auszugehen ist [Zissis 2000]. LI *et al.* zeigte anhand von Titanoberflächen, dass bei Rauigkeitswerten unter 0,4  $\mu\text{m}$  keine Unterschiede in der mikrobiellen Besiedlung festzustellen sind [Li M 2001].

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte für die arithmetische Rauigkeit  $R_a$  der silanbeschichteten Oberflächen wiesen fast alle einen Wert von 0,04  $\mu\text{m}$  auf. Nur die mit 3-(trimethoxysilyl)propyldimethyloctadecylammoniumchlorid (QAS, Silan 9) beschichtete Glasoberfläche hatte einen Medianwert für  $R_a$  von 0,23  $\mu\text{m}$  und lag damit knapp über dem erwähnten Schwellenwert von 0,2  $\mu\text{m}$ . Einen direkten Zusammenhang zwischen der bakteriellen Adhäsion und den einzelnen Rauigkeiten im Sinne der erwähnten Postulate [Bollen 1997, Zissis 2000] konnte nicht ermittelt werden, wenngleich die Silanprobe 3-(trimethoxysilyl)propyldimethyloctadecylammoniumchlorid (QAS, Silan 9) die höchsten Werte für die relative Fluoreszenzintensität und damit für das quantitative Ausmaß der Adhäsion von *S. mutans* aufwies. Die Rauigkeit liegt zwar über 0,2  $\mu\text{m}$ , allerdings nicht deutlich und kann aus diesem Grund nicht die alleinige Ursache für die hohen Adhäsionswerte dieser Silanoberfläche sein.

### 6.2.3 Kontaktwinkelmessung

Die goniometrischen Messungen zu Wasser wurden in der vorliegenden Untersuchung mit unbehandelten silanbeschichteten Proben durchgeführt.

Entscheidend für die bakterielle Adhäsion an Festkörperoberflächen, bei Betrachtung ohne Anwesenheit eines Pellicels, sind die physikalisch-chemischen Faktoren [Scheie 1994]. Dies sind die freie Oberflächenenergie, Zeta Potential, Hydrophobie und Oberflächenrauigkeit.

Hochenergetische Oberflächen sammeln vermehrt Plaque an und begünstigen die Adhäsion spezifischer Bakterien [Quirynen1995]. Anziehend wirkt auf viele

Bakterien zudem ein hohes Zeta Potential und Hydrophobie der Oberfläche [Van Loosdrecht 1990]. RATNER *et al.* befasste sich mit dem physikalisch-chemischen Zusammenhang von Bakterien und Oberflächen. Die Anhaftung ist in hohem Ausmaß abhängig von der Oberflächenspannung des Werkstoffes sowie vom Berührungswinkel der Bakterien mit der Oberfläche [Ratner 2004]. Diese Abhängigkeit der Bakterienanlagerung von physikalisch-chemischen Eigenschaften wird in der vorliegenden Untersuchung als wichtiges Ergebnis beobachtet. Untersuchungen zur Adhäsion an Festkörperoberflächen haben gezeigt, dass Bakterienstämme mit niedriger freier Oberflächenenergie (*S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguis*) in höherer Anzahl an hydrophoben Oberflächen anhaften [Grivet 2000, Nesbitt 1982, Weerkamp 1985, Weerkamp 1988]. Im Gegensatz dazu tendieren Bakterienstämme mit hoher freier Oberflächenenergie (*S. mitis*) zu hydrophilen Oberflächen [Weerkamp 1985]. Es ist abhängig von der Bakterienspezies ob Zeta Potential, Hydrophobie oder Oberflächenenergie den Ausschlag für die Anlagerung gibt. Die meisten oralen Bakterien besitzen eine hohe freie Oberflächenenergie und haften bevorzugt an Oberflächen mit hoher Energie [Weerkamp 1985]. Für einige Stämme oraler Mikroorganismen mit niedrig hydrophober Oberfläche und hohem Zeta-Potential könnte das Zeta-Potential der Substratoberfläche eine wichtigere Rolle als deren Oberflächenenergie spielen. Elektrostatische Wechselwirkungen, freie Oberflächenenergie und hydrophobe Wechselwirkungen beeinflussen somit die bakterielle Adhäsion im Rahmen des thermodynamischen Modells [Weerkamp 1988, Satou 1988].

Bei allen zu untersuchenden Silanproben der vorliegenden Untersuchung, ließen sich Unterschiede im Kontaktwinkel im Vergleich zur Referenzprobe Glas nachweisen. Die Referenzprobe Glas wies Kontaktwinkelwerte um 72 Grad auf. Aufgrund der ähnlichen chemischen Struktur der Silane 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan, 3-Methacryloxypropylmethyldimethoxysilan, 3-Methacryloxypropyldimethylmethoxysilan, 3-Methacryloxypropyltriethoxysilan, war zu erwarten, dass die Kontaktwinkelwerte keine großen Unterschiede aufweisen. In dieser Untersuchung lagen die Kontaktwinkel für diese Silanoberflächen zwischen 60° und 64°.

Die mit 3-Methacryloxypropyltrichlorosilan beschichtete Oberfläche wies den niedrigsten goniometrischen Wert mit etwa 41° auf und ist somit das Silan mit der größten Hydrophilität. Tendenziell hydrophob waren dagegen die Proben der Silane 3,3,3-(trifluoro)propyltrimethoxysilan, 3-Aminopropyltrimethoxysilan und 3-(trimethoxysilyl)-propyl-dimethyloctadecylammoniumchloride mit mittleren Kontaktwinkeln von 83°. Es wäre zu erwarten, dass die mit diesen Silanen beschichteten Oberflächen tendenziell hohe bakterielle Adhäsionswerte zeigen. Lediglich für 3-(trimethoxysilyl)-propyl-dimethyloctadecylammoniumchloride wurde diese Annahme bestätigt.

#### **6.2.4 Adhäsion von *Streptococcus mutans***

*In vivo* Untersuchungen konnten einen Zusammenhang zwischen der Bakterienanheftung und der manifesten Substrateigenschaften, trotz Existenz eines Pellikels nachweisen. QUIRYNEN *et al.* ermittelten nach intraoraler Exposition von Proben mit unterschiedlichen freien Oberflächenenergien, eine höhere Plaquebildung auf Substraten mit hoher freier Oberflächenenergie. Materialien mit niedriger freier Oberflächenenergie neigten dagegen im geringeren Maß zur Plaquebildung [Quirynen 1989]. PRATT-TERPSTRA *et al.* wiesen darauf hin, dass die ursprünglichen Eigenschaften der verwendeten Substratmaterialien bis zu einem gewissen Grad erhalten bleiben und insbesondere die Bindung von Mikroorganismen modulieren können [Pratt-Terpstra 1990]. Studien fanden einen Zusammenhang zwischen den Oberflächeneigenschaften der Substrate und den Oberflächeneigenschaften der Bakterienzellen. Dem thermodynamischen Modell entsprechend, adhärieren Bakterien mit einer hohen freien Oberflächenenergie (hydrophil) an Substratoberflächen mit hoher freier Oberflächenenergie (hydrophil) [Busscher 1984, Weerkamp 1985]. Analog gilt diese Korrelation für Mikroorganismen mit niedriger freier Oberflächenenergie. Für den in dieser Untersuchung verwendeten *S. mutans* NCTC 10449 konnten GRIVET *et al.* hydrophobe Oberflächeneigenschaften nachweisen [Grivet 2000]. Für die Silanoberfläche 3-

(trimethoxysilyl)-propyldimethyloctadecylammoniumchlorid (QAS) konnte ein Kontaktwinkel mit hydrophober Tendenz ermittelt werden und es zeigte sich eine, im Vergleich zu den anderen Silanproben deutlich erhöhte Adhäsion mit *S. mutans*. Eine Analogie, dass die hydrophilste Silanoberfläche (3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan) die geringste Adhäsionsneigung für den mit hydrophoben Oberflächeneigenschaften ausgestatteten *S. mutans* zeigt, ergab sich nicht. VAN PELT *et al.* kamen zu dem Schluss, dass die freie Oberflächenenergie und damit die Oberflächeneigenschaften möglicherweise zudem mit der Bindungsstärke der Mikroorganismen an die jeweilige Substratoberfläche korreliert. Es könnte durch die Oberflächeneigenschaften mehr die Qualität als die Quantität der bakteriellen Adhäsion beeinflusst werden [Van Pelt 1985].

#### 6.2.4.1 Bakterielle Adhäsion an Silanoberflächen

Elektrostatische und hydrophobe Kräfte sind wichtige Faktoren für die bakterielle Adhäsion. Nicht allein die Hydrophobie, sondern auch die Kenntnis über molekulare Details der Bakterien- und Substratoberflächen sind entscheidend für die Tendenz zur mikrobiellen Anheftung. SALERNO *et al.* zeigten, dass mit Alkylsilanen hydrophobisierte Oberflächen, im höheren Maß zur bakteriellen Adhäsion neigen als unbehandelte Silikatflächen. Die Adhäsionsneigung sank, als die sogenannte Debye-Länge der Lösung größer wurde als die Alkylsilanmoleküle und somit die Silanmoleküle die Bakterienoberfläche wohl nicht mehr erreichen konnten [Salerno 2004].

In der vorliegenden Untersuchung bewirkte eine Modifizierung der Glasoberfläche mit den Silanverbindungen 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan (Silan 1), 3-Methacryloxypropylmethyldimethoxysilan (Silan 2), 3-Methacryldimethylmethoxysilan (Silan 3), 3,3,3 (trifluoro)propyltrimethoxysilan (Silan 6) und 3-Aminopropyltrimethoxysilan (Silan 7), im Gegensatz zu unbehandeltem Glas, eine tendenziell geringere Adhäsion von *S. mutans*. Die Silanisierung mit 3,3,3 (trifluoro)propyltrimethoxysilan (Silan 6), 3-Aminopropyltrimethoxysilan (Silan 7) und 3-(trimethoxysilyl)-propyldimethyloctadecylammoniumchlorid

(QAS, Silan 9) bewirkte jeweils eine Hydrophobisierung der Glasoberfläche, jedoch zeigten diese drei Oberflächen eine unterschiedliche Tendenz zur bakteriellen Adhäsion. 3-Methacryloxypropyltrichlorosilan (Silan 5) zeigte die größte Hydrophilität und im Vergleich zu den anderen Silanproben, mit Ausnahme von QAS (Silan 9) signifikant höhere Werte für die relative Fluoreszenzintensität. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass Hydrophobie und Oberflächenrauigkeit der Silanoberflächen keine Vorhersage der zu erwartenden bakteriellen Adhäsion zulassen und weitere Parameter einen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten nehmen. Es ist anzunehmen, dass eine detailliertere Betrachtung der chemischen Oberflächenstrukturen von Bakterien und Proben weiteren Aufschluss über die Interaktionen auf molekularer Ebene geben.

Theoretisch kommt es bei der Behandlung von Oberflächen mit Silanen zur Ausbildung eines Monolayers. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen deuten aber darauf hin, dass sich eher ein Multilayer ausbildet. Diese Annahme ist auf folgende Beobachtungen gestützt. Die chemisch ähnlichen Silanverbindungen 1 bis 4, die bei theoretischer Ausbildung eines Monolayers an der Schichtoberfläche Methacryloxygruppen aufweisen sollten, zeigen ein unterschiedliches Hydrophobie- und Adhäsionsverhalten. Das spricht dafür, dass auch Molekülanteile des anorganischen Silananteils nicht mit der Glasoberfläche reagiert haben und möglicherweise ungerichtet angeordnet sind. MATINLINNA wies darauf hin, dass es zu einer ungerichteten Orientierung der Silan-Moleküle kommt und eine Schicht zwischen 50-100 nm entsteht [Matinlinna 2004]. Die FT/IR-Spektren dieser Silane weisen auf das Vorhandensein von Methoxygruppen hin, die sich am anorganischen Molekülanteil befinden. Ein weiteres Beispiel, das für eine Multilayerstruktur spricht ist 3-Methacryloxypropyltrichlorosilan (Silan 5). Dieses Molekül unterscheidet sich von den anderen Verbindungen (Silane 1-8) im anorganischen Teil durch Fehlen einer Methoxy- oder Ethoxygruppe. Im Adhäsionsversuch konnte für diese Verbindung die zweithöchste relative Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden.

3-(trimethoxysilyl)-propyldimethyloctadecylammoniumchlorid (QAS, Silan 9) nahm bei den Untersuchungsergebnissen eine Sonderstellung ein. Diese Silanverbindung war das größte untersuchte Molekül, das eine lange apolare Kohlenstoffkette enthielt. Es ist nicht auszuschließen, dass die hohe Oberflächenenergie, die Molekülgröße und die hydrophoben Molekülstrukturen einen positiven Effekt auf die bakterielle Adhäsion haben. Die Silane 6 und 7 unterschieden sich von den Silanverbindungen 1-5 durch das Fehlen einer organischen Gruppe der Form Methacryloxy. Trotz hydrophober Oberflächeneigenschaften wurden niedrige Adhäsionswerte gemessen, was die Vermutung zulässt, dass endständige Anteile von Silanmolekülen einen Einfluss auf die bakterielle Adhäsion haben.

Zahlreiche Studien gibt es zur Silanbehandlung von Silikonoberflächen. So zeigten Untersuchungen zur Oberflächenbehandlung von Silikon mit Aminopropyltriethoxysilan, 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan und Octadecyltrichlorosilan, dass die effektivste Hemmung der Adhäsion von *Staphylococcus epidermis* bei Verwendung von Octadecyltrichlorosilan erfolgte. Im Vergleich zu unbehandelten Silikonoberflächen konnte eine Verringerung der mikrobiellen Anheftung um 75 % ermittelt werden [Tang 2006]. Eine weitere Untersuchung ergab eine signifikante Verringerung der Anheftung von *Candida albicans* an mit Silan behandelten Silikonoberflächen, im Vergleich zu unbehandelten Proben. Diese Reduktion blieb auch nach Inkorporation mit Speichel evident [Price 2005]. Mehrere Studien beschäftigten sich mit dem antimikrobiellen Einfluss von QAS [Gottenbos 2002, Oosterhof 2006]. GOTTENBOS *et al.* kamen zu dem Schluss, dass mit QAS behandelter Silikongummi antimikrobielle Eigenschaften gegen adhärente Bakterien *in vivo* und *in vitro* zeigt. Die Lebensfähigkeit von adhärenenten *Staphylococci* sank von 90 % auf 0 % und von gram-negativen Bakterien von 90 % auf 25%, aufgrund der Bindung von QAS an der Substratoberfläche [Gottenbos 2002]. Dessen Moleküle reagieren in Lösung mit der Bilayerstruktur der mikrobiellen Zellmembran und verursachten eine Undichtigkeit dieser Membran sowie den Zelltod [Gottenbos 2002, Oosterhof 2006]. Experimente zur Titanoberflächenmodifikation durch PIER-FRANCESCO *et al.* konnten den hemmenden Einfluss sehr glatter

Oberflächen für die Adhäsion von *Porphyromonas gingivalis* verdeutlichen. Eine Veränderung der Hydrophobizität der Materialoberfläche mittels einer Silanlösung, veränderte bei dieser Studie das Adhäsionsverhalten nicht [Pier-Francesco 2006].

Vergleichbare Studien zum Adhäsionsverhalten von *S. mutans* auf Silanoberflächen liegen nicht vor.

In Vorversuchen wurde eine mögliche Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität von der Konzentration der Silanbeschichtung untersucht. Die Ergebnisse ergaben für die Silanbeschichtung mit einer 10% Lösung den höchsten Wert für die relative Fluoreszenzintensität, den niedrigsten für eine Konzentration von 0,5%. Die durchgeführten goniometrischen Messungen zeigten bei den Silankonzentrationen 0,5% bis 10,0% ansteigende Kontaktwinkel, bei 15,0% sank der Wert wieder deutlich ab. Unsere Untersuchung legt die Vermutung nahe, dass bei einer Silankonzentration von etwa 10,0% ein Schwellenwert für die maximale bakterielle Adhäsion erreicht ist. Gründe hierfür könnten in der Schichtdicke des sich bildenden Silanlayers liegen, die abhängig von der verwendeten Lösungskonzentration ist. Auch die entstehende verdunstungsbedingte Tertiärstruktur der Silanmoleküle zueinander könnte die Bakterienadhäsion entscheidend beeinflussen. Voraussetzung für diese Überlegungen sind mögliche Langstreckeninteraktionen des Bakteriums mit den tieferliegenden Schichten der Oberfläche.

Die höchsten Adhäsionswerte zeigte die Silanverbindung QAS (Silan 9), die geringsten Werte zeigten sich bei dem Silan 3-Aminopropyltrimethoxysilan (Silan 7). Die Werte der relativen Fluoreszenzintensität für QAS (Silan 9) war gegenüber allen anderen Proben signifikant höher.

Untersuchungen von GOTTENBOS *et al.* und OOSTERHOF *et al.* kamen zu ähnlichen Ergebnissen für gram-negative Bakterien. Mit QAS bedeckte Oberflächen weisen eine hohe positive Oberflächenenergie auf und üben eine starke Anziehungskraft auf negativ geladene gram-negative Bakterien aus [Gottenbos 2002, Oosterhof 2006].

### 6.3 Schlussfolgerung

Die bakterielle Anheftung in der vorliegenden Untersuchung war, bis auf das Silan 3-(trimethoxysilyl)propyldimethyloctadecylammoniumchlorid (Silan 9) kaum abhängig von der Oberflächenrauigkeit. Physikalisch-chemischen Faktoren ist in den Versuchen der größte Einfluss auf die bakterielle Adhäsion zuzuschreiben. Das gewählte Testverfahren zur Bestimmung der Quantität adhärenter Bakterien, mittels der Resazurin-Reduktionsmethode und Messung der relativen Fluoreszenzintensität wies eine gute Sensitivität auf. Die Standardisier- und Reproduzierbarkeit des Versuchsaufbaus ist gegeben.

Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse von *in vitro* Studien auf die Verhältnisse, die sich bei bakteriellen Adhäsionsprozessen in der Mundhöhle ergeben, ist nicht möglich. Im intraoralen Milieu findet die Pellikelbildung unter dynamischen Bedingungen der Speichelneubildung und des Schluckens statt. Desweiteren wird die bakterielle Adhäsion durch das Zusammenwirken unterschiedlicher Mikroorganismen bestimmt, so dass sich im Gegensatz zu experimentellen Verhältnissen ein komplexer Biofilm bildet.

## 7 Zusammenfassung

Das Thema der vorliegenden Untersuchung ist der Einfluss von Silanhaftvermittlern auf die bakterielle Adhäsion *in vitro*. Es sollte die quantitative Untersuchung der Adhäsion von *Streptococcus mutans* an neun chemisch unterschiedlichen Silanhaftvermittlern erfolgen.

In Vorversuchen wurde ein geeigneter Versuchsaufbau für die Bakterienquantifizierung auf Silanoberflächen etabliert. Als Nachweismethoden für die tatsächliche Silanbeschichtung der Trägeroberflächen wurden die Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FT/IR) und die Kontaktwinkel-messung verwendet. Um die Korrelation zwischen Quantität der adhärenenten Bakterien und den spezifischen Eigenschaften der Silanoberflächen zu prüfen, wurden die Rauigkeit mittels Perthometer und der Grad der Hydrophobie mit Hilfe der Goniometrie erfasst.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile:

Der erste Teil beschäftigte sich mit der Abhängigkeit der Konzentration des Silans, am Beispiel von 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan (Silan 1) auf das quantitative Ausmaß der Adhäsion von *S. mutans*. Es wurden Konzentrationen von 0,5 % bis 15 % untersucht. Die Quantifizierung der Bakterienadhäsion erfolgte durch Messung der Fluoreszenzintensität mittels der Resazurin-Reduktionsmethode. Die höchsten Adhäsionswerte wurden für eine Silankonzentration von 10 % ermittelt, die wenigsten Bakterien adhärten an einer Silanoberfläche mit einer Konzentration von 0,5 %.

Im zweiten Teil erfolgte die Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von *S. mutans* an neun chemisch unterschiedlichen Silanhaftvermittlern. Die Beschichtung der Trägeroberfläche Glas wurde hierzu mit einer Silankonzentration von 5 % durchgeführt. Mit Hilfe der Ermittlung der Fluoreszenzintensität wurde die bakterielle Anheftung erfasst.

Die Untersuchung zeigt den deutlichen Einfluss der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Silanoberflächen. Die Rauigkeit spielt eher eine

untergeordnete Rolle. Die Hydrophobie, die freie Oberflächenenergie sowie die molekulare Struktur der Substratoberfläche scheinen ausschlaggebend für die Adhäsionstendenz von *S. mutans in vitro* zu sein. Die höchste Neigung zur bakteriellen Adhäsion wies die Silanverbindung 3-(trimethoxysilyl)-propyldimethyloctadecylammoniumchlorid (Silan 9) auf, die geringste Adhäsionstendenz zeigte 3-Aminopropyltrimethoxysilan (Silan 7).

Der in dieser Untersuchung verwendete standardisierbare Versuchsaufbau ist durchaus geeignet, um das initiale Adhäsionsverhalten von *S. mutans* sowie die elektrostatischen Interaktionen, verursacht durch die Oberflächenspannung der Substratoberflächen zu beleuchten. Die Nachweismethode der Silanbeschichtung mittels Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FT/IR) sowie die Fluoreszenzmethode zur Ermittlung der Adhäsion zeigten eine hohe Sensitivität. Aufgrund dessen, dass die Anwesenheit eines Speichelüberzuges die Oberflächenspannung des Materials reduziert und die intraoralen physiologischen Bedingungen imitieren kann, wären weitere Adhäsionsversuche mit Pellikelüberzug der Silanproben sinnvoll.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Absolom DR, Lamberti FV, Policova Z, Zingg W, Van Oss CJ, Neumann AW: Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Appl Environ Microbiol* 1983; 46 (1): 90-97
2. Adamczyk E, Spiechowicz E: Plaque accumulation on crowns made of various materials. *Int J Prothodont* 1990; 3: 285-291
3. Ahn SJ, Lee SJ, Lim BS, Nahm DS: Quantativ determination of adhesion patterns of cariogenic streptococci to various orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007; 132 (6): 815-821
4. Ahimou F, Semmens MJ, Novak PJ, Hangstad G: Biofilm cohesiveness measurement using a novel atomic force microscopy methodology. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73 (9): 2897-2904
5. An YH, Friedmann RJ: Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *J Microbiol Methods* 1997; 30: 141-152
6. An YH, Friedmann RJ: Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater res* 1998; 43: 338-348
7. An YH, McGlohorn JB, Bednarski BK, Martin KL, Friedmann RJ: An open channel flow chamber for characterizing biofilm formation on biomaterial surfaces. *Methods Enzymol* 2001; 337: 79-88
8. Ansar Ahmed S, Gogal RM, Walsh JE: A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to 3H-thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 1994; 170: 211-224
9. Atkins, PW, de Paula J: *Physikalische Chemie*. Wiley-VCH, Weinheim, 3., korr. Aufl. 2001
10. Augthun M, Branner A: Antibakterielle Wirkung unterschiedlicher Dentallegierungen auf Keime der oralen Mikroflora *in vitro*. *Dtsch Zahnärztl Z* 1988; 43: 869-873
11. Baker CN, Banerjee SN, Tenover FC: Evaluation of almar colorimetric MIC method for antimicrobial susceptibility testing of gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1261-1267

12. Batchelor RH, Zhou M: Use of cellular glucose-6-phosphate dehydrogenase of cell quantification: applications in cytotoxicity and apoptosis assays. *Anal Biochem* 2004; 329: 35-42
13. Bennick A, Cannon A, Madapallimattam T: The nature of the hydroxyapatite- binding site in salivary acidic prolin-rich proteins. *Biochem J* 1979; 183: 115-126
14. Bennick A: Structural and genetic aspects of prolin-rich proteins. *J Dent Res* 1987; 66: 457-461
15. Blomberg E, Claesson PM: Protein at surfaces studied with the surface force technique.  
In: Horbett T. A., Brash J. L.: *Protein at Interfaces II*.  
American Chemical Society, Washington, DC 1995; 296-310
17. Blunden RE, Oliver RG, O’Kane C: Microbial growth on the surfaces of various orthodontic bonding cements.  
*British J Orthodont* 1994; 21: 125-132
18. Bollen CM, Lambrecht P, Quirynen M: Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature.  
*Dent Mater* 1997; 13 (4): 258-269
19. Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ: Influence of ionic strength and substratum hydrophobicity on adhesion of oral microbial pairs.  
*Microbiology* 1996; 142: 2355-2361
20. Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ: Co-adhesion of oral microbial pairs under flow in the presence of saliva and lactose.  
*J Dent Res* 1996; 75 (2): 809-815
21. Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ: Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study.  
*FEMS Microbiol Rev* 1999; 23: 179-230
22. Braden M: *Polymeric dental materials*. Springer Verlag, Berlin 1997
23. Bradway SD, Bergey EJ, Jones PC, Levine MJ: Oral mucosal pellicle. *Biochem J* 1989; 261: 887-896

24. Brash JL, Horbett TA: Proteins at interfaces – an overview.  
In: Horbett T. A., Brash J. L. (Hrsg): Proteins and Interfaces II.  
American Chemical Society, Washington, DC 1995; 1-23
25. Brezesinski G, Mögel H-J: Grenzflächen und Kolloide.  
Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford 1993
26. Bürgers R, Rosentritt M, Handel G: Bacterial adhesion of  
*Streptococcus mutans* to provisional fixed prosthodontic material.  
J Prosthet Dent 2007; 98 (6): 461-469
27. Busscher HJ, Weerkamp AH, Van der Mei HC, Van Pelt AWJ, De Jong  
HP, Arends J: Measurement of the surface free energy of bacterial cell  
surfaces and its relevance for adhesion.  
Appl Environ Microbiol 1984; 48 (5): 980-983
28. Busscher HJ, Doornbusch GI, Van der Mei HC: Adhesion of streptococci  
to glass with and without a salivary coating as studied in a parallel-plate  
flow chamber. J Dent Res 1992; 71 (3): 491-500
29. Busscher HJ, Bos R, van der Mei H: Initial microbial adhesion is a  
determinant for the strength of biofilm adhesion.  
FEMS Microbiol Lett 1995; 128: 229-234
30. Busscher HJ, van der Mei HC: Use of flow chamber devices and image  
analysis methods to study microbial adhesion.  
Methods Enzymol 1995; 253: 455-477
31. Busscher HJ, van der Mei HC: Physico- chemical interactions in initial  
microbial adhesion and relevance for biofilm formation.  
Adv Dent Res 1997; 11: 24-32
32. Busscher HJ, van der Mei HC: Microbial adhesion in flow displacement  
systems. Clin Microbiol Rev 2006; 19: 127-141
33. Carlén A, Nikdel K, Wennerberg A, Holmberg K, Olsson J: Surface  
characteristics and *in vitro* biofilm formation on glass ionomer and  
composite resin. Biomaterials 2001; 22 (5): 481-487
34. Chan C, Weber H: Plaque retention on teeth restored with full-ceramic  
crowns: a comparativ study. J Prosthet Dent 1986; 56: 666-667

35. Clark WB, Bammann LL, Gibbons RJ: Comparative estimates of bacterial affinities and adsorption sites on hydroxyapatite surfaces. *Infect Immun* 1987; 19: 846- 853
36. Coates J: Interpretation of infrared spectra, a practical approach, *Encyclopedia of Analytical Chemistry* R.A. Meyers (Ed.). John Wiley & Sons Ltd, Chichester 2000; 10815-10837
37. Collins LA, Franzblau SG: Microplate almarBlue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997; 1004-1009
38. Costerton J, Lewanowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G: Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 1994; 176: 2137-2142
39. Costerton JW: Overview of microbial biofilm. *J Ind Microbiol Biot* 1995; 15: 137-140
40. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell D, Korber D, Lappin-Scott H: Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 711-745
41. Christersson CE, Dunford RG, Glantz PO, Baier RE: Effect of critical surface tension on retention of oral microorganisms. *Scand J Dent Res* 1989; 97: 247- 256
42. Deligeorgi V, Mjör IA, Wilson NHF: An overview of reasons for the placement and replacement of restorations. *Primary Dental Care* 2001; 8 (1): 5-11
43. Deutsches Institut für Normung DIN4768, 1990
44. Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ, Kolenbrander PE: Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72 (2) : 2837-2848
45. Dörfler H-D: Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme – Physik und Chemie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 2002

46. Douglas CWI, Russell RRB: The adsorption of human salivary components to strains of the bacterium *Streptococcus mutans*. Archives of Oral Biology 1984; 29: 751-757
47. Ebi N, Imazato S, Noiri Y, Ebisu S: Inhibitory effects of resin composite containing bactericide-immobilized filler on plaque accumulation. Dent Mater 2001; 17: 485-491
48. Edgerton M, Lose SE, Scannapieco FA: Experimental salivary pellicles formed on titanium surfaces mediate adhesion of *streptococci*. The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants 1996; 11: 443-449
49. Eichner K, Kappert H: Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung. Hüthig Verlag, Heidelberg 1996
50. Eick S, Glockmann E, Brandl B, Pfister W: Adherence of streptococcus mutans to various restorative materials in a continuous flow system. J Oral Rehabil 2004; 31 (3): 278-285
51. Einwag J, Ulrich A, Gehring F: In-vitro Plaqueanlagerung an unterschiedliche Füllungsmaterialien. Oralprophylaxe 1990; 12: 22-27
52. Ellen R, Lepine G, Nghiem P: *In vitro* models that support adhesion specify in biofilms of oral bacteria. Adv Dent Res 1997; 11: 33-42
53. Elangovan S, Margolis HC, Oppenheim FG, Beniash E: Conformational changes in salivary proline-rich protein I upon adsorption to calcium phosphat crystals. Langmuir 2007; 23 (7): 11200-11205
54. Englander HR, Jordan HV: Relation between *streptococcus mutans* and smooth surface caries in the deciduous dentition. J Dent Res 1972; 51: 1505
55. Faltermeier A, Bürgers R, Rosentritt M: Bacterial adhesion of *streptococcus mutans* to orthodontic adhesives with various filler-volume fractions. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2007; 132 (6): 728.e7-728.e11
56. Fang HH, Chan KY, Xu LC: Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy (AFM). J Microbiol Methods 2000; 40 (1): 89-97

57. Fields RD, Lancaster MV: Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/ cytotoxicity. *Am Biotechnol Lab* 1993; 11(4): 48-50
58. Fijan S, Sostar-Turk S, Cencic A: Implementing hygiene monitoring systems in hospital laundries in order to reduce microbial contamination of hospital textiles. *J Hosp Infect* 2005; 61: 30-38
59. Fisher S, Prakobphol A, Kajisa L, Murray P: External radiolabelling of components of pellicle on human enamel and cementum. *Arch Oral Biol* 1987; 32, 509-517
60. Folwaczny M, Hickel R: Biofilm – Problem oder Perspektive?. *Dtsch Zahnärztl Z* 2003; 58: 648-657
61. Friedl KH, Hiller KA, Schmalz G: Placement and replacement of composite restorations in Germany. *Oper Dent.* 1994; 19 (6): 228-231
62. Friedl KH, Schmalz G, Hiller KA, Shams M: Resin-modified glass ionomer cements: fluoride release and influence on *Streptococcus mutans* growth. *Eur J Oral Sci* 1997; 105: 81-85
63. Fries de R, Mitsuhashi M: Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of almarBlue assay to 3H-thymidine incorporation assay. *J Clin Lab Anal* 1995; 9 (2): 89-95
64. Gibbons RJ, van Houte J: On the formation of dental plaques. *J Periodontol* 1973; 44: 347-360
65. Gibbons R. J, van Houte J: Dental caries. *Annu Rev Med* 1975; 26: 121-136
66. Gibbons RJ: Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res* 1989; 68: 750-760
67. Glantz P, Arnebrant T, Nylander T, et al.: Bioadhesion – a phenomenon with multiple dimensions. *Acta Odontol Scand* 1999; 57: 238-241
68. Goegan P, Johnson G, Vincent R: Effects of Serum Protein and Colloid on AlamarBlue Assay in Cell Cultures. *Toxic In Vitro* 1995; 9 (3): 257-266
69. Göpel W, Ziegler C: Einführung in die Materialwissenschaften: Physikalisch-chemische Grundlagen und Anwendung. Teubner-Verlag 1996

70. Gottenbos B, Van der Mei HC, Klatter F, Nieuwenhuis P, Busscher HJ: *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of covalently coupled quaternary ammonium silane coatings on silicone rubber. *Biomaterials* 2002; 23: 1417-1423
71. Griffith PR, de Haseth JA: *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. John Wiley & Sons Ltd, New York 1986
72. Grimm WD: Mikrobiell bedingte Plaqueakkumulation an verschiedenen dentalen Werkstoffen. *Quintess* 1989; 6: 1133-1141
73. Grivet M, Morrier JJ, Benay G, Barsotti O: Effect of hydrophobicity on *in vitro* streptococcal adhesion to dental alloys. *J Mater Sci Mater Med* 2000; 11 (10): 637-642
74. Günzler H, Heise HM: *IR-Spektroskopie - Eine Einführung*. VCH, Weinheim, 3., neubearb. Aufl. 1996
75. Hahn R, Netuschil L, Löst C: Initiale Plaquebesiedlung keramischer Restaurationsmaterialien. *Dtsch Zahnärztl Z* 1992; 47: 330-334
76. Hahn R, Weiger R, Netuschil L, Bruch M: Microbial accumulation and vitality on different restorative materials. *Dent Mater* 1993; 9: 312-316
77. Hahnel S, Rosentritt M, Bürgers R, Handel G: Surface properties and *in vitro* *Streptococcus mutans* adhesion to dental resin polymers. *J Mater Sci: Mater Med* 2008; 19 (7): 2619-2627
78. Hall- Stoodley L, Stoodley P: Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr Opin Biotechnol* 2002; 13: 228-233
79. Hammer B, Hotz P: Inspection of 1 to 5 year old amalgam, composite and cast gold fillings. *Schweizer Monatsschr Zahnheilkd* 1979; 89: 301-314
80. Hannig C, Hannig M, Rehmer O, Braun G, Hellwig E, Al-Ahmad A: Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel *in situ*. *Arch Oral Biol* 2007; 52 (11): 1048-1056
81. Hannig M: Transmission electron microscopic study of *in vivo* pellicle formation on dental restorative materials. *Eur J Oral Sci* 1997; 105: 422-433

82. Hannig M: Elektronenmikroskopische Untersuchungen der initialen Bioadhäsionsprozesse an Festkörperoberflächen in der Mundhöhle. Eine klinisch- experimentelle Studie. Habilitationsschriften der ZMK, Quintessenz Verlag GmbH, Berlin 1998
83. Hannig M: Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period.  
Clin Oral Investig 1999; 3: 88-95
84. Hasty DL, Ofek I, Courtney HS, Doyle RJ: Multiple adhesins of *streptococci*. Infect Immun 1992; 60: 2147-2157
85. Hellwig E, Klimek J, Attin T: Einführung in die Zahnerhaltung. Urban & Schwarzenberg, München, 3. Aufl. 2003
86. Horbett T A: Protein adsorption on biomaterials.  
Adv Chem Ser 1982; 199: 233-244
87. Hultgren S, Abraham S, Caparon M, Falk P, Geme J, Normark S: Pilus and non pilus bacteria adhesion: assembly and function in cell recognition. Cell 1993; 73: 887-901
88. Kawai K, Takaoka T: Inhibition of bacterial and glucan adherence to various light-cured fluoride-releasing restorative materials.  
J Dent 2001; 29: 119-122
89. Kawai K, Urano M: Adherence of plaque components to different restorative materials. Oper Dent 2001; 26 (4): 396-400
90. Kawashima M, Hanada N, Hamada T, Tagami J, Senpuku H: Real-time interaction of oral streptococci with human salivary components.  
Oral Microbiology and Immunology 2003; 18: 220-225
91. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM: Medizinische Mikrobiologie.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 2001; 10. Auflage
92. Kinniment S, Wimpenny J, Adams D, Marsh P: Development of a steady-state oral microbial biofilm community using the constant-depth film fermenter. Microbiology 1996; 142: 631-638

93. Klimek J, Hellwig E: Kariesäthiologie und –diagnose; in Heidemann D (Hrsg.) Kariologie und Füllungstherapie (Praxis der Zahnheilkunde 2), Urban & Schwarzenberg München, 4. Auflage 1999
94. Kolenbrander PE: Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. *Annu Rev Microbiol* 1988; 42: 627-656
95. Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LVH: Intrageneric coaggregation among strains of human bacteria: potential role in primary colonization of the tooth surface. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56 (12): 3890-3894
96. Kolenbrander PE, London J: Ecological significance of coaggregation among oral bacteria. *Adv Microb Ecol* 1992; 12: 183-217
97. Kolenbrander PE, London J: Adhere today, adhere tomorrow: oral bacterial adhesion. *J Bacteriol* 1993; 175: 3247-3252
98. Krämer A, Geis-Gerstorfer J, Weber H, Kratzenstein B: Zur Benetzbarkeit verschiedener Zahnersatzmaterialien. *Dtsch Zahnärztl Z* 1989; 44: 788-790
99. Krämer A, Netuschil L, Simonis A: Plaqueanlagerung an verschiedenen Verblendkunststoffen. *Dtsch Zahnärztl Z* 1990; 45: 482-484
100. Krasse B, Jordan HV, Edwardsson S, Svensson I, Trelle L: The occurrence of certain „caries-inducing“ *streptococci* in human dental plaque material. *Archives of Oral Biology* 1968; 13: 911-918
101. Krekeler G, Kappert H, Pelz K: Die Affinität der Plaque zu verschiedenen Werkstoffen. *Schweiz Mschr Zahnmed* 1984; 7
102. Krummenauer F, Wojciechowski C, Baulig C, Al-Nawas B: Boxplots - die flexible Alternative zum „Antennen-Bildchen“. *Z Zahnärztl Impl*, 2007; 23(4): 308-311
103. Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG: Saliva and dental pellicle – A review. *Adv Dent Res* 2000; 14: 22-28

104. Levine MJ, Tabak LA, Reddy M, Mandel ID: Nature of salivary pellicles in microbiologic adherence: role of salivary mucins.  
In: Mergenhagen S. E., Rosan B. (Hrsg.): Molecular basis of oral microbiologic adhesion. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1. Aufl. 1985; 125-130
105. Li M, Yang S, Wang Z: The influence of surface roughness on bacteria adhesion on titanium.  
Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 2001; 36: 431-433
106. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS, Oppenheim FG: Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. J Appl Microbiol 2004; 97: 1311-1318
107. Liljemark WF, Fenner LJ, Bloomquist CG: In vivo colonization of salivary pellicle by *Haemophilus*, *Actinomyces* and *Streptococcus* species. Caries Res 1986; 20: 481-497
108. Liljemark WF, Bloomquist C, Reilly B, Bernhards C, Townsend D, Pennock A: Growth dynamics in a natural biofilm and its impact on oral disease management. Adv Dent Res 1997; 11: 14-23
109. Logan RP, Robins A, Turner GA, Cockayne A, Boriello SP, Hawkey CJ: A novel flow cytometric assay for quantitating adherence of *Helibacter pylori* to gastric epithelial cells. J Immunol Methods 1998; 213 (1): 19-30
110. Lundin SA, Emilson CG: Microflora in plaque from approximal posterior composite resin restorations.  
Quintessence Int 1989; 20: 413-416
111. Mabboux F, Ponsonnet L, Morrier JJ, Jaffrezic N, Barsotti O: Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials – an *in vitro* study.  
Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2004; 39: 199-205
112. Maeda H, Matsu-ura S: Resazurin as an electron acceptor in glucose oxidase-catalyzed oxidation of glucose.  
Chem Pharm Bull 2001; 49(5): 622-625
113. Marsh PD: Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. J Dent Res 1992; 71: 1431-1438

114. Marsh PD: The Role of Microbiology in Models of Dental Caries.  
Adv Dent Res 1995; 9 (3): 244-254
115. Marsh PD, Bradshaw D: Dental plaque as a biofilm.  
J Ind Microbiol Biot 1995; 15: 169-175
116. Marsh P, von Martin M: Oral Microbiology. Reed Educational and  
Professional Publishing Ltd., Oxford, 4. Aufl., 1999
117. Matinnlinna JP, Lassila LVJ, Özcan M, Yli-Urpo A, Vallittu PK:  
An introduction to silanes and their chemical applications in dentistry.  
Int J Prosthodont 2004; 17: 155-164
118. Matinnlinna JP, Ozcan M, Lassila LV, Valittu PK: The effect of a 3-  
methacryloxypropyltrimethoxysilane and vinyltriisopropoxysilane blend  
and tris(3-trimethoxysilylpropyl)isocyanurate on the shear bond strength  
of composite resin to titanium metal. Dent Mater 2004; 20 (9): 804-813
119. Meschede D, Gerthsen C: Gerthsen Physik.  
Springer-Verlag, Berlin 23.Auflage 2006
120. Montanaro L, Campoccia D, Rizzi S, Donati ME, Breschi L, Prati C, *et al.*:  
Evaluation of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental  
restorative materials. Biomaterials 2004; 25 (18): 4457-4463
121. Moreno EC, Kresak M, Hay DI: Adsorption of molecules of biological  
interest onto hydroxyapatite. Calcif Tissue Int 1984; 36: 48-49
122. Morgan TD, Wilson M: The effects of surface roughness and type of  
denture acrylic on biofilm formation by *streptococcus oralis* in a constant  
depth film fermentor. J Appl Microbiol 2001; 91 (1): 47-53
123. Müller H: Parodontologie. Thieme-Verlag, Stuttgart 2001
124. Müller R, Gröger G, Hiller K-A, Schmalz G, Ruhl S: Fluorescence-  
based bacterial overlay method for simultaneous in situ quantification of  
surface-attached bacteria.  
Appl Environ Microbiol 2007; 73 (8): 2653-2660
125. Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z: Assessment of the  
almarBlue assay for cellular growth and viability in vitro.  
J Immunol Methods 1997; 204: 205-208

126. Nesbitt W, Doyle R, Taylor K: Hydrophobic interactions and the adherence of *Streptococcus sanguis* to hydroxylapatite. *Infect Immun* 1982; 38: 637-644
127. Newman, HN: Diet, attrition, plaque and dental disease. *Br Dent J* 1974; 136: 491-497
128. Norde W: Adsorption of biopolymers and its relevance for particle adhesion: a physio- chemical approach.  
In: Ten Cate J.M., Leach S. A., Arends J. (Hrsg): *Bacterial adhesion and preventive dentistry*. IRL Press Ltd., Oxford 1. Aufl., 1984; 1-17
129. Novak SM, Hindler J, Bruckner DA: Reliability of two novel methods, Almar and E test, for detection of methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 3056-3057
130. Nyvad B, Kilian M: Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Research* 1990; 24: 267-272
131. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F: Investigation of the almarBlue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 2000; 267 (17): 5421-5426
132. Olsson J, Krasse BA: Method for studying adherence of oral *streptococci* to solid surfaces. *Scand J Dent Res* 1976; 84: 20-28
133. Olsson J, Glantz P, Krasse B: Surface potential and adherence of oral *streptococci* to solid surfaces. *Scand J Dent Res* 1976; 84: 240-242
134. Olsson J, van der Heijde Y, Holmberg K: Plaque formation *in vivo* and bacterial attachment *in vitro* on permanently hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Caries Research* 1992; 26: 428-433
135. Oosterhof JJH, Buijssen KJDA, Busscher HJ, Van der Laan BFAM, Van der Mei HC: Effects of quaternary ammonium silane coatings on mixed fungal and bacterial biofilms on tracheoesophageal shunt prostheses. *Applied and Environmental Microbiology* 2006; 72 (5): 3673-3677
136. Orstavik DAG, Kraus FW, Henshaw LC: *In vitro* attachment of streptococci to the tooth surface. *Infection and Immunity* 1974; 9 (5): 794-800

137. Palmer RJ, Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE: Coaggregation-mediated interactions of *streptococci* and *actinomyces* detected in initial human dental plaque. J Bacteriol 2003; 185 (11): 3400-3409
138. Palenik CJ, Behnen MJ, Setcos JC, Miller CH: Inhibition of microbial adherence and growth by various glass ionomers *in vitro*. Dent Mater 1992; 8 (1): 16-20
139. Peyton B, Characklis W: Microbial microfilms and biofilm reactors. Bioprocess Technol 1995; 20: 187-231
140. Pier-Francesco A, Adams RJ, Waters MG, Williams DW: Titanium surface modification and its effect on the adherence of *Porphyromonas gingivalis*: an in vitro study: Clin Oral Implants Res 2006; 17 (6): 633-637
141. Pils S, Schmitter T, Neske F, Hauck CR: Quantification of bacterial invasion into adherent cells by flow cytometry. J Microbiol Methods 2006; 65 (2): 301-310
142. Plueddemann EP: Silane Coupling Agents. Plenum Press, New York 1982
143. Prakobphol A, Burdsal CA, Fisher SJ: Quantifying the strength of bacterial adhesive interactions with salivary glycoproteins. J Dent Res 1995; 74: 1212-1218
144. Pratt-Terpstra IH, Weerkamp AH, Busscher HJ: Adhesion of oral *streptococci* from a flowing suspension to uncoated and albumin-coated surfaces. J Gen Microbiol 1987; 133: 3199-3206
145. Pratt- Terpstra IH, Weerkamp AH, Busscher HJ: The effect of pellicle formation on streptococcal adhesion to human enamel and artificial substrat with surface free energies. J Dent Res 1989; 68: 463-467
146. Price CL, Williams DW, Waters MG, Coulthwaite L, Verran J, Taylor RL, Stickler D, Lewis MA: Reduced adherence of *Candida* to silane-treated silicon rubber. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2005; 74 (1): 481-487

147. Quirynen M, Marechal M, Busscher H, Weerkamp A, Arends J, van Steenberghe D: The influence of surface free energy on planimetric plaque growth in man. *J Dent Res* 1989; 68: 796-799
148. Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, Van Stenberghe D: The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An *in vivo* study in man. *J Clin Periodontol* 1990; 17 (3): 138-144
149. Quirynen M, Bollen C: The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 1-14
150. Radford DR, Sweet SP, Challacombe SJ, Walter JD: Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *J Dent* 1998; 26 (7): 577-583
151. Ratner B, Hoffmann A, Schoen F, Lemons J: *Biomaterial Science*. Society for Biomaterials 2004; 2: 40-57
152. Rosan B, Lamont RJ: Dental plaque formation. *Microbes and Infection* 2000; 1599-1607
153. Rosenberg E, Gottlieb A, Rosenberg M: Inhibition of bacterial adherence to hydrocarbons and epithelial cells by emulsan. *Infekt Immun* 1983; 39: 1024-1028
154. Rosentritt M, Hahnel S, Gröger G, Mühlfriedel B, Bürgers R, Handel G: Adhesion of *Streptococcus mutans* to various dental materials in a laminar flow chamber system. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2008; 86 (1): 36-44
155. Roosjen A, Boks NP, van der Mei HC, Busscher HJ, Norde W: Influence of shear on microbial adhesion to PEO-brushes and glass by convective-diffusion and sedimentation in a parallel plate flow chamber. *Colloids Surf B* 2005; 46: 1-6
156. Sachs L: *Angewandte Statistik, Anwendung statistischer Methoden*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 2002

157. Salerno MB, Logan BE, Velegol D: Importance of molecular details in predicting bacterial adhesion to hydrophobic surfaces.  
Langmuir 2004; 20 (24): 10625-10629
158. Satou J, Fukunaga A, Satou N, Shintani H, Okuda K: Streptococcal adherence on various restorative materials.  
J Dent Res 1988; 67 (3): 588-591
159. Satou J, Fukanaga A, Morikawa A, Matsumae I, Satou N, Shintani H: Streptococcal adherence to uncoated and saliva-coated restoratives.  
J Oral Reahabil 1991; 18 (5): 421-429
160. Savitt ED, Malament KA, Socransky SS, et al.: Effects on colonisation of oral microbiota by a castglass ceramic restoration.  
Int J Periodont Rest Dent 1987; 7: 22-35
161. Shahal Y, Steinberg D, Hirschfeld Z, Bronshteyn M, Kopolovic K: *In vitro* bacterial adherence onto pellicle-coated asthetic restaurative materials. J Oral Rehab 1998; 25 (1): 52-58
162. Scheie A: Mechanisms of dental plaque formations.  
Adv Dent Res 1994; 8: 246-253
163. Schwuger MJ: Lehrbuch der Grenzflächenchemie.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1996
164. Shaw DJ: Introduktion to Colloid and Surface Chemistry, 3<sup>rd</sup>Ed..  
Butterworths, London 1980
165. Sissons CH, Wong L, Cutress TW: Pattern and rates of growth of microcosm dental plaque biofilms.  
Oral Microbiology and Immunology 1995; 10: 160-167
166. Slaughter MR, Bugelski PJ, O'Brien PJ: Evaluation of almarBlue reduction for the *in vitro* assay of hepatocyte toxicity.  
Toxicology in vitro 1999; 13: 587-569
167. Söderholm KJ, Shang SW: Molecular orientation of silane at the surface of colloidal silica. J Dent Res. 1993; 72(6):1050-1054
168. Sönju T, Rölla G: Chemical analysis of the aquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth *in vivo*. Rate of formation and amino acid analysis. Caries Res 1973; 7: 30-38

169. Sönju T, Skjörland K: Pellicle composition and initial bacterial colonisation on composite and amalgam *in vivo*.  
Microbiol 1976; 1: 133-141
170. Steinberg D, Mor C, Dogan H, Zacks B, Rotstein I: Effect of salivary biofilm on the adherence of oral bacteria to bleached and non-bleached restorative material. Dent Mater 1999; 15 (1): 14-20
171. Steinberg D, Eyal S: Early formation of *streptococcus sobrinus* biofilm on various dental restorative materials. J Dent 2002; 30: 47-51
172. Suljak JP, Reid G, Wood SM, McConnell RJ, Van der Mei HC, Busscher HJ: Bacterial adhesion to dental amalgam and three resin composites. J Dent 1995; 23 (3): 171-176
173. Svanberg M, Mjor IA, Orstavik D: *Mutans streptococci* in plaque from margins of amalgam, composite, and glass-ionomer restorations. J Dent Res 1990; 69 (3): 861-864
174. Tang H, Wang A, Liang X, Cao T, Salley SO, McAllister JP 3rd, Ng KY: Effect of surface proteins on *staphylococcus epidermis* adhesion and colonization on silicone.  
Colloids of Surf B Biointerfaces 2006; 51 (1): 16-24
175. Tanner J, Vallitu PK, Soderling E: Adherence of *Streptococcus mutans* to an E-glass fiber-reinforced composite and conventional restorative materials used in prothetic dentistry.  
J Biomed Mater Res 2000; 49 (2): 250-256
176. Taylor RL, Verran J, Lees GC, Ward AJ: The influence of substratum topography on bacterial adhesion to polymethyl methacrylate. J Mater Sci Mater Med 1998; 9 (1): 17-22
177. Taylor R, Maryan C, Verran J: Retention of oral microorganisms on cobalt-chromium alloy and dental acrylic resin with different surface finishes. J Prothet Dent 1998; 80 (5): 592-597
178. Tinanoff N, Glick PL, Weber DF: Ultrastructure of organic films on enamel surface. Caries Res 1979; 10: 19-32

179. Trautwein A, Kreibitz U: Physik für Mediziner, Biologen, Pharmazeuten. de Gruyter, Berlin 6. Auflage 2004
180. Van Dijk J, Herkstroter F, Busscher H: Surface free energy and bacterial adhesion. An *in vivo* study in beagle dogs. J Clin Periodontol 1987; 14: 300-304
181. Van Dijken JWV, Sjöström S, Wing K: The effect of different types of composite resin fillings on marginal gingiva. J Clin Periodontol 1987; 14: 185-189
182. Van Dijken JWV, Sjöström S: The effect of glass ionomer cement and composite resin fillings on marginal gingiva. J Clin Periodontol 1991; 18: 200-203
183. Van Loosdrecht MCM, Norde W, Zehnder A: Physical chemical description of bacterial adhesion. J Biomater Appl 1990; 5: 91-106
184. Van Loosdrecht MCM, Lyklema J, Norde W, Schraa G, Zehnder AJB: The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. Appl Environ Microbiol 1987; 53 (8):1993-1997
185. Van Loosdrecht MCM, Lyklema J, Norde W, Schraa G, Zehnder AJB: Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. Appl Environ Microbiol 1987; 53 (8):1998-1901
186. Van Pelt AWJ, Weerkamp AH, Uyten MHWJC, Busscher HJ, De Jong HP, Arends J: Adhesion of streptococcus sanguis CH3 to polymers with different surface free energies. Applied and Environmental Microbiology 1985; 49: 1270-1275
187. Vaz CM, Reis RL, Cunha AM: Use of coupling agents to enhance the interfacial interactions in starch-EVOH/hydroxylapatite composites. Biomaterials 2002; 23 (2): 629-635
188. Voytik-Harbin SL, Brightman AO, Waisner B, Lamar CH, Badylak SF: Application and evaluation of the alamarBlue assay for cell growth and survival of fibroblasts. In Vitro Cell Dev Biol Anim 1998; 34(3): 239-246

189. Weerkamp AH, van der Mei HC, Busscher H: The surface free energy of oral *streptococci* after being coated with saliva and its relation to adhesion in mouth. J Dent Res 1985; 64: 1204-1210
190. Weerkamp AH, Yen HM, Busscher HJ: Effect of zeta potential and surface energy on bacterial adhesion to uncoated and saliva-coated human enamel and dentin. J Dent 1988; 67 (12): 1483-1487
191. Weerkamp AH, Quirynen M, Marechal M, van der Mei HC, van Steenberghe D, Busscher HJ: The role of surface free energy in the early *in vivo* formation of dental plaque on human enamel and polymeric substrata. Microbiol Ecology in Health and Disease 1989; 2: 11-14
192. Wilson M: Use of constant depth film fermenter in studies of biofilms of oral bacteria. Method Enzymol 1999; 310: 264-279
193. Yao Y, Grogan J, Zehnder M, Lendenmann U, Nam B, Wu Z, Costello CE, Oppenheim FG: Compositional analyses of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. Archives of Oral Biology 2001; 46: 293-303
194. Yao Y, Berg EA, Costello CE, Troxler RE, Oppenheim FG: Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. The Journal of Biological Chemistry 2003; 278: 5300-5308
195. Yoshida A, Kuramitsu H: Multiple *streptococcus mutans* genes are involved in biofilm formation. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 6283-6191
196. Yoo JH, Kho HS, Kim YK, Lee SW, Chung SC: Experimental salivary pellicles formed on the surface of self-curing resin. Journal of Oral Rehabilitation 2003; 30 : 251-259
197. Zissis AJ, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A: Roughness of denture materials. Int J Prosthodont 2000; 13: 136-140

## 9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aq. dest.	Aqua destillata
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
cm <sup>-1</sup>	1/cm
d.h.	das heißt
etc.	et cetera
et al.	Et alia
FTIR	Fourier-Transformations- Infrarot-Spektroskopie
°	Grad
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
Mmol	Milli-Mol
n	Anzahl der Proben
pH	Pondus Hydrogenii
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
%	Prozent
sog.	Sogenannt
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Units pro Milliliter
usw.	und so weiter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

## 10 Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Themas sowie die Bereitstellung der Arbeitsmittel und des biologischen Labors der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik der Universität Regensburg gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. G. Handel.

Herrn Dr. Dipl.-Ing. M. Rosentritt und Herrn Dr. med. dent. R. Bürgers möchte ich herzlich für die Übernahme der Betreuung der Dissertationsarbeit nach dem Ausscheiden von Herrn Dr. med. dent. G. Gröger und der intensiven Betreuung sowie Geduld bei der Erstellung des Manuskriptes und der Korrektur danken.

Herrn Dr. med. dent. G. Gröger danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Planung und Durchführung der Versuche.

Herrn Dr. rer. nat. R. Müller recht herzlichen Dank für die Einweisung in die Nutzung der Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie sowie des Goniometers im Labor für Physikalische und Theoretische Chemie der Universität Regensburg.

Weiterhin gebührt mein besonderer Dank Frau MTA G. Held für die freundliche Zusammenarbeit und umfangreiche Hilfe bei der Durchführung der praktischen Versuche.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Dr. med. dent. S. Hahnel recht herzlich für die wertvollen Ratschläge bei Erstellung des Manuskriptes bedanken.

Schließlich gilt mein größter Dank meinen Eltern und Geschwistern, die mir diesen Weg in vielerlei Hinsicht erst ermöglicht und mich immer unterstützt haben.

## 11 Lebenslauf

### Persönliche Information:

Name: Klemm  
Vorname: Antje Anne  
Geburtsdatum/-ort: 25.01.1980, Strausberg  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung:

1986-1991 Polytechnische Oberschule in Strausberg  
1991-1992 Grundschule in Strausberg  
1992-1996 Theodor-Fontane-Gymnasium in Strausberg  
1996-1997 High-School Jahr in Cumming/Georgia in den USA  
1997-1999 Theodor-Fontane-Gymnasium in Strausberg  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulbildung:

1999- 2000 Universität Wien, Studiengang Sprachwissenschaften  
seit 2000 Universität Regensburg, Studiengang Zahnmedizin  
2001 Naturwissenschaftliche Vorprüfung  
2004 Zahnärztliche Vorprüfung  
2006 Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit: seit 01.01.2007 Vorbereitungsassistentin  
Praxis Dr. Schneller in Bergen